

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

Papel de las isomorfias de endogлина en el linaje mieloide

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mikel Aristorena San Adrián

Directores

Carmelo Bernabéu Quirante
Francisco Javier Blanco López

Madrid, 2014

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Genética



**PAPEL DE LAS ISOFORMAS DE ENDOGLINA EN EL LINAJE
MIELOIDE**

Memoria presentada por

MIKEL ARISTORENA SAN ADRIÁN

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) bajo la dirección de los doctores
D. Carmelo Bernabéu Quirante y D. Francisco Javier Blanco López



Madrid, 2014

VºBº Directores de Tesis

VºBº del doctorando

**Dr. Carmelo Bernabéu Quirante
Dr. Francisco Javier Blanco López**

Mikel Aristorena San Adrián

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:

SAF2007-61827 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional de I+D: “Mecanismos moleculares del receptor de TGF-beta endotelial en la fisiopatología vascular”. Período Octubre 2007-Octubre 2010. Madrid. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

SAF2010-19222 del Ministerio de Ciencia e Innovación, Plan Nacional de I+D: “Estudios moleculares sobre endoglin y ALK1, dos componentes del receptor endotelial de TGF-beta implicados en la fisiopatología vascular”. Período: 1 Enero 2011-31 Diciembre 2013. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

MEICA de Genoma España. “Molecular and cellular mechanisms in chronic inflammatory and autoimmune diseases”. Período: 15 Enero 2009 a 14 Enero 2012. Coordinador Científico: Francisco Sánchez Madrid. Investigador Principal subproyecto: Carmelo Bernabéu Quirante.

Y gracias a las becas disfrutadas por el doctorando:

Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2008-003888 del Ministerio de Ciencia e Innovación. Dirección General de Investigación. Beca asociada al proyecto SAF2007-61827. Investigador Principal: Carmelo Bernabéu Quirante.

Beca lanzadera intramural CIBERER asociada a la unidad 707. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

D. CARMELO BERNABÉU QUIRANTE, Profesor de Investigación en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y D. FRANCISCO JAVIER BLANCO LÓPEZ, Post-doctoral sénior en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN

Que D. Mikel Aristorena San Adrián, Licenciado en Biología y Bioquímica por la Universidad de Navarra, ha realizado bajo su dirección el proyecto correspondiente a su Tesis que lleva por título: "**Papel de las isoformas de endoglina en el linaje mieloide**" y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

LOS DIRECTORES,

Fdo:

Fdo:

D. Carmelo Bernabéu Quirante, PhD

D. Francisco Javier Blanco López, PhD

A mis aitas.

AGRADECIMIENTOS

Después de 5 años de trabajo, vienen a mi mente muchas personas a las que quiero agradecer su contribución, ayuda y apoyo ya sea en el plano profesional o en el personal. No lo hubiera conseguido sin vosotros, para vosotros son estas líneas.

En primer lugar me gustaría agradecer a Carmelo la confianza que ha depositado en mí. Mis primeras experiencias en la investigación van a estar inevitablemente ligadas al laboratorio 108 y al grupo del Dr. Carmelo Bernabéu. Desde el día que entré dubitativo a tu despacho para la entrevista, hasta el momento presente, he aprendido lo que supone trabajar en un laboratorio de investigación. Si a día de hoy me siento "científico" es gracias a tu confianza, tu experiencia y tu trabajo como director de tesis. Y qué voy a decir de mi otro codirector... Muchas gracias, Blanco. Por enseñarme tanto, por obligarme a ser metódico y no conformarme, por ser (en una gran paradoja) tan buen jefe como amigo, por tener siempre la paciencia y la disposición adecuada para sacar adelante este proyecto. Eres el espejo en el que me gustaría mirarme en el futuro.

Laboratorios 108-109, deberíamos tirar el tabique y fusionarnos. En los momentos en los que se me ha pasado por la cabeza tirar la toalla, habéis sido la motivación necesaria para seguir adelante. Luisa, gracias por tu entrega y generosidad. Eva, te he echado mucho en falta en el laboratorio. He aprendido mucho de ti, esta tesis también es un poco tuya. Lu, ¡ay mi Lu! Eres un ejemplo de perseverancia y perfeccionismo en el trabajo. Tienes que ser un poco menos dura contigo misma. El día que te veas con los ojos que te vemos los demás, te comes el mundo. Kraiss, has sido un gran apoyo en el día a día. Hace 4 años lo veíamos todo muy negro, hoy lo hemos conseguido. Eunatita, Virginia, Lucía, Elisa, Zbynek y Carmen. Gracias de corazón por estos años, por hacer de este grupo el mejor sitio para trabajar.

Realizar la tesis en el CIB ha sido otro golpe de suerte. No me voy a olvidar de las personas que he conocido aquí, las que me han hecho sentir como en casa. Las cañas, los disfraces en las casas rurales, las fiestas de primavera, están llenas de momentos inolvidables. Rodri, el núcleo de las actividades extra-laborales. Espero tenerte como amigo durante muchos años. Pow, siempre consigues alegrarme el día. Estás tardando en moverte a Londres (¡con Alfon5!). Carol, Virginia, Kike, Asier, Carlos, Pericacho, Cris, Amaia, Rubén, Fernando, Jenny, muchas gracias por tantos y tan buenos momentos. También quiero dar las gracias a toda la gente con la que, en mayor o menor medida he tenido la suerte de trabajar, en especial a Mateo, por conseguir (con su peculiar pesimismo optimista) renovar mis ganas de seguir investigando. Gracias también a todos los que, a pesar de los disgustos que suele dar esta profesión,

mantienen el buen humor y siguen peleando. Gracias también al CIB Athletic y a sus integrantes por conseguir despegarme del sofá (de vez en cuando). A los servicios generales del CIB, sobre todo al de proteómica (qué complicado es un SILAC triple) y a Pedro por su trabajo en citometría. A todo el personal que hace funcionar el centro (esterilización, compras, gestión, mantenimiento...), muchas gracias. Mención aparte para el servicio de limpieza, por seguir trabajando a pesar de todo. Me gustaría igualmente expresar mi agradecimiento a la facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, en especial al Departamento de Genética y al que ha sido mi tutor, el Dr. Francisco Javier Gallego.

No me puedo ni me quiero olvidar de los años en Pamplona. Me parece increíble que el azar haya puesto en un mismo lugar y simultáneamente a un grupo de gente que se haga querer tanto como vosotros. Josetxo, eres único como amigo. Encuentras siempre el equilibrio perfecto entre ayudarme sin excepción y motivarme para salir adelante. No cambies. Irene, que nuestras vidas paralelas lo sigan siendo toda la vida. Sara, mi hermanastra. Iker, eres grande. Pienso en ti más de lo que te lo demuestro. Jon, el mejor compañero de Erasmus (¡grazie Roma!) que podía haber tenido. Después de Madrid, nos toca Londres. Gracias también a la toda la Biopiña. Jaime y Turu (la mejor combinación desde el vino con Coca-Cola), Botxan (pequeño gran hombre), Terefi (¡vuelve pronto de las antípodas!). A todos los punkplonautas; Galas, Unai, Pedro, Laura, Ari, Rakel, Antton, Jaimolas, Aizea, Javi, Agus, Dani, Maiki, gallegos, Lorena, Teresa, Lucía, Marta...gracias por el cariño que me demostráis cada vez que voy a veros.

Y qué puedo de decir de mis amigos de Donosti. Llevo más de 10 años fuera y, aunque suene a tópico, cuando vuelvo parece que no me he ido. Señor Corres, somos amigos desde el inicio de los tiempos. Todos los recuerdos que tengo contigo me darían para otra tesis. Gracias a ti formo parte de la cuadrilla más chanante de todo Amara Viejo (y barrios periféricos). Jon (el mayor fan de Fernando Alonso), Ander (tus chistes son tan buenos como tus golpes de billar), Unai (un visionario que vio mi futuro en Londres, Underground), Iratitz (¡me alegro un montón de que estés de vuelta culofino!), Manolo (vísteme despacio que tengo prisa), EDO (si tiene motor, y lo echan por la tele, lo ves) y al resto de la cuadrilla (y respectivas); Etx, Iñaxio, Pello, Ales, Iñako, Miren, Josune, Eli...muchas gracias por estar siempre ahí cuando puedo escaparme al hogar. Espero teneros más cerca en un futuro. Y ya no sé si englobarte en Donosti o en Madrid...pero muchas gracias Nerea. Sé que esté donde esté puedo contar contigo.

Muchas gracias de corazón a la gran familia que tengo. Os veo menos de lo que os merecéis (y de lo que me gustaría). Atita (seguiré haciendo tus croquetas), Abobo (¡ya soy doctor!), Ilu (pues chico...), a mis tíos Félix, Juanmi, Elena, Fernando, Lourdes y a mis primos Iñigo, María, Marta, Elena, Jon Mikel y Luka (¡una cena al año por lo

menos!). Jon, tú me metiste el gusanillo investigación. Siempre has estado ahí, cuando te he necesitado, eres un gran hermano mayor (¡y me has buscado una gran cuñada!). Y sobre todo, gracias a mis aitas. Por ser tan buenos padres. Si he llegado hasta aquí, si soy como soy, es gracias a vosotros. Gracias a vuestro esfuerzo, sacrificio y confianza. Porque os quiero y por todas las veces que me habéis demostrado lo mucho que me queréis, esta tesis es para vosotros.

Y como haces tú con los bocadillos, dejo lo mejor para el final. Muchas gracias Noe. Gracias por estar siempre a mi lado y confiar en mí más que yo mismo. Por ayudarme siempre. Contigo la vida es mejor, más alegre. Siempre lo das todo por la gente que quieres, sin excepción. Tengo la suerte de haberte encontrado y no pienso soltarte. Eres la persona con la que quiero expresar endoglina corta, la persona con la que quiero envejecer. Como dijiste en tu tesis: "*gracias CIB por ponernos en el mismo camino*".

Mikel.

ABREVIATURAS

- aa:** Aminoácidos
- ACN:** Acetonitrilo
- ACVRL/ ALK1:** *Activin A receptor type II-like 1*
- AIFM:** *Apoptosis-inducing factor*
- ANKRD1:** *Ankyrin repeat domain-containing protein 1*
- APC:** Células presentadoras de antígeno
- ARNm:** Acido Ribonucleico Mensajero
- ASF/SF2:** Factor de ajuste alternativo 2
- AVM:** Malformación arteriovenosa
- BCA:** Ácido Bicinconínico
- BID:** *BH3-interacting domain death agonist*
- BMP:** Proteínas morfogenéticas del hueso
- BSA:** Albúmina de Suero Bovino
- C.F:** *Carrier free*
- CCl:** Ligando de Quimioquina
- CD:** *Cluster* de diferenciación
- CDC:** *Cell Division Cycle* (proteína)
- CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- CDTA:** Ácido ciclohexilendinitrilotetraacético
- CID:** Disociación inducida por colisión
- CMP/CLP:** Células progenitoras Mieloides/Linfoides
- COS7:** Fibroblastos de mono verde africano
- COSY:** *Correlation Spectroscopy*
- COX-2:** Ciclo-oxigenasa 2
- CT:** Citoplasmático
- DAMP:** Señales endógenas asociadas a daño tisular
- DFFA:** *DNA fragmentation factor subunit alpha*
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

DOSY: *Diffusion Ordered Spectroscopy*

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ENG: Gen de endoglina

EngL: Isoforma Larga de endoglina

EngS: Isoforma Corta de endoglina

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

ESI: *Electrospray Ionization*

FCS: Suero fetal bovino

FLT1: Gen del receptor de VEGF

FOLR2: Receptor de Folato

FPLC: *Fast protein liquid chromatography*

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GSN: Gelsolina

His6X: Hexa-histidina

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HSC: Células madre hematopoyéticas

HUVECS: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

Id1: Inhibidor de la diferenciación 1

IL: Interleuquina

INHBA: *Activina-A (Gen)*

IPA: *Ingenuity Pathways Analysis*

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Log: Logaritmo

LPM: *Large Peritoneal Macrophages*

LPS: Lipopolisacárido de membrana (bacteria gram negativa)

LXR/RXR: Receptor X hepático/Receptor X retinoide

m/z: Relación masa/carga

MAFB: Factor de transcripción MafB

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

MAPKs: *Mitogen Activated Protein Kinases*

MAVS: *Mitochondrial antiviral-signaling protein*

MCP: *Monocyte Chemotactic Protein*

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MDM: Macrófagos humanos derivados de monócitos

MEC: Matriz extracelular

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MMP: Metaloproteasa de Matriz

MS: Espectrometría de Masas

m-Sp: Espliceosoma Menor

M-Sp: Espliceosoma Principal

MST: *Serine/threonine-protein kinase*

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NK: *Natural Killer*

NOD: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Protein*

NOESY: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.*

OD: Dominio “Huérfano”

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

Pai1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampón fosfato salino

PCit-S: Peptido correspondiente al dominio citoplasmático de EngS

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDB: *Protein DataBank*

PEG: Polietilenglicol

PKC: Proteína Quinasa C

PMA: Ésteres de Forbol

PRDX: Peroxirredoxina

PS: Péptido señal.

PVDF: *Polyvinylidene difluoride*

Q: Cuadrupolo

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* (medio de cultivo)

rtPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SARA: *Smad Anchor for Receptor Activator*

SDS: Dodecil sulfato sódico

sEng: Endoglina Soluble

SERPIN: *Serin Protease Inhibitor*

SILAC: Marcaje estable con isótopos no radioactivos de células en cultivo

snRNPs: Pequeñas Ribonucleoproteínas Nucleares

SOD: Superóxido dismutasa

SPM: *Small Peritoneal Macrophages*

STAB: Estabilina

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

Taq: *Termus aquaticus*

TBS-T: Tris-tampón salino Tween

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

Th: *T Helper*

THH/HHT: Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria/Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia

TIMP: *Tissue Inhibitor of Metaloproteinases*

TLR: *Toll Like Receptor*

TM: Transmembrana.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α

TOCSY: *Total Correlation Spectroscopy*

TOF: *Time of Flight*

TXN: Tiorredoxina

U937: Células de linfoma histiocítico agudo

UBE2V1: *Ubiquitin-conjugating enzyme E2*

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

WB. *Western Blot*

ZP: Zona Pelúcida

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. Endogлина | 3 |
| 1.1 Distribución celular y expresión | 3 |
| 1.2 Vías de señalización e interacción | 4 |
| 1.3 Isoformas de endogлина | 9 |
| 1.4 Ajuste (<i>Splicing</i>) alternativo de endogлина | 11 |
| 1.5 Endogлина soluble | 13 |
| 1.6 Enfermedades relacionadas con endogлина | 14 |
| 1.6.1 Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria | 14 |
| 1.6.2 Cáncer | 16 |
| 1.6.3 Preeclampsia | 18 |
| 1.6.4 Aterosclerosis | 20 |
| 1.6.5 Psoriasis | 21 |
| 1.6.6 Artritis reumatoide | 21 |
| 2. Metaloproteasas | 22 |
| 2.1 Metaloproteasa de matriz 12 (MMP12) | 23 |
| 3. Estructura de proteínas | 23 |
| 3.1 Microscopía electrónica | 25 |
| 3.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 25 |
| 3.3 Cristalografía de rayos X | 26 |
| 3.4 Estructura y características bioquímicas de endogлина | 27 |
| 4. Proteómica | 29 |
| 4.1 Espectrometría de masas | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Marcaje estable con isótopos no radiactivos de células en cultivo (SILAC) | 32 |
| 5. El sistema inmune | 33 |
| 5.1 Inflamación | 34 |
| 5.2 Macrófagos | 36 |
| 5.3 Polarización de macrófagos | 37 |
| 5.4 Inmunosenescencia | 40 |
| 5.4.1 Monocitos y macrófagos | 42 |
| II. OBJETIVOS | 45 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 49 |
| 1. Expresión, purificación y estructura | 51 |
| 1.1 Síntesis y purificación de péptidos | 51 |
| 1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN) | 52 |
| 1.3 Vectores de expresión de proteínas | 53 |
| 1.4 Expresión de proteínas, purificación por columnas de afinidad y ensayos de cristalización | 55 |
| 2. Marcaje estable con isótopos no radiactivos de células en cultivo (SILAC) | 57 |
| 2.1 Incorporación de los isótopos en el proteoma de los transfectantes estables de endoglina | 57 |
| 2.2 Separación de péptidos y análisis por espectrometría de masas (MS) | 60 |
| 3. Inmunodetección y Western Blot | 61 |
| 4. Análisis funcionales en células | 63 |
| 4.1 Proliferación, supervivencia y apoptosis | 63 |
| 4.2 Medida de las especies reactivas del oxígeno (ROS) | 64 |
| 4.3 Adhesión celular a fibronectina | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4 Senescencia inducida por estrés oxidativo en macrófagos humanos y de ratón | 65 |
| 5. Diferenciación-polarización de la línea U937 y de macrófagos humanos | 66 |
| 6. Ensayos con animales | 66 |
| 6.1 Obtención de macrófagos peritoneales | 66 |
| 6.2 Respuesta inflamatoria <i>in vivo</i> e inhibición de MMP12 | 67 |
| 7. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) | 67 |
| 8. Actividad de MMP12 y liberación de endogлина soluble <i>in vitro</i> | 69 |
| 8.1 Ensayo de inhibición de actividad para MMP12 recombinante | 69 |
| 8.2 Zimografía | 69 |
| 8.3 Transfección transitoria de los vectores de expresión de endogлина y MMP12 | 70 |
| 8.4 Cultivo de células endoteliales (HUVEC) en medio condicionado de macrófagos polarizados | 70 |
| 9. Análisis estadístico | 70 |
| IV. RESULTADOS | 71 |
| 1. Determinación estructural del dominio citoplasmático de las isoformas larga y corta de endogлина | 73 |
| 1.1 Análisis del tallo citoplasmático de EngS por RMN | 73 |
| 2.1 Expresión, purificación y cristalización del dominio citoplasmático de la isoforma larga de endogлина | 74 |
| 2. Función diferencial de las isoformas de endogлина en el linaje mieloide | 76 |
| 2.1 Endogлина corta como marcador de senescencia en macrófagos | 76 |
| 2.2 Identificación proteómica de proteínas diferencialmente expresadas en transfectantes estables (EngL/EngS) | 80 |

| | |
|--|------------|
| 2.3 Validación del análisis proteómico y estudio bioinformático de las proteínas alteradas | 82 |
| 2.4 Isoformas de endoglina y polarización de macrófagos | 90 |
| 3. Polarización de macrófagos y endoglina soluble | 94 |
| 3.1 Endoglina soluble en macrófagos M1 y M2 | 94 |
| 3.2 Niveles de expresión de endoglina en la polarización de macrófagos M1/M2 | 95 |
| 3.3 Metaloproteasas en polarización de macrófagos | 96 |
| 3.4 Ensayos de actividad con MMP12 recombinante | 97 |
| 3.5 Actividad de MMP12 en macrófagos y células endoteliales en cultivo | 100 |
| 3.6 Actividad de MMP12 y liberación de endoglina soluble <i>in vivo</i> | 102 |
| V. DISCUSIÓN | 105 |
| 1. Estructura tridimensional de la región citoplasmática de las isoformas larga y corta de endoglina | 107 |
| 2. Isoformas de endoglina en el linaje mieloide | 108 |
| 3. Endoglina soluble y polarización de macrófagos | 114 |
| VI. CONCLUSIONES | 121 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 125 |
| ANEXOS | 145 |
| Publicaciones relacionadas con la tesis | 147 |
| Tabla Suplementaria - Lista completa SILAC | 149 |
| Resumen en inglés | 167 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de la señalización del TGF- β desde la membrana hasta el núcleo de la célula. | 6 |
| Figura 2. Modelo hipotético simplificado de las funciones de endoglina corta en la senescencia endotelial. | 9 |
| Figura 3. Mecanismo de ajuste alternativo. | 12 |
| Figura 4. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y sintomatología asociada. | 15 |
| Figura 5. Modelo de liberación de sEng en preeclampsia. | 19 |
| Figura 6. Características generales de las técnicas estructurales más habituales. | 24 |
| Figura 7. Modelo tridimensional del dominio extracelular de endoglina. | 28 |
| Figura 8. Modelo esquemático de los componentes y funcionamiento de un triple cuadrupolo (QQQ). | 31 |
| Figura 9. Modelo simplificado de polarización de macrófagos. | 38 |

III. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| Figura 10. Purificación del péptido citoplasmático de EngS. | 52 |
| Figura 11. Proteína recombinante correspondiente al tallo citoplasmático de la isoforma larga de endoglina. | 54 |
| Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar los distintos vectores de expresión. | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 12. Perfiles de inyección y elución de proteínas mediante cromatografía de afinidad. | 56 |
| Figura 13. Cultivos y marcaje SILAC. | 59 |
| Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección. | 62 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para detectar los niveles de mRNA por PCR cuantitativa. | 68 |

IV. RESULTADOS

| | |
|---|----|
| Figura 14. Espectro TOCSY del tallo citoplasmático de endoglina corta. | 73 |
| Figura 15. Expresión y purificación de proteínas para su posterior determinación estructural por cristalografía de rayos X. | 75 |
| Figura 16. El estrés oxidativo induce senescencia en macrófagos peritoneales de ratón. | 77 |
| Figura 17. Inducción de senescencia por estrés oxidativo en macrófagos humanos. | 78 |
| Figura 18. Efecto del envejecimiento en macrófagos peritoneales de ratón. | 79 |
| Figura 19. Comprobación previa de la expresión estable de las isoformas de endoglina en U937. | 80 |
| Figura 20. Distribución de las ratios de los datos en crudo del SILAC. | 81 |
| Figura 21. Diagrama de Venn agrupando las proteínas que presentan expresión diferencial en los transfectantes estables de endoglina. | 82 |
| Figura 22. Validación del análisis proteómico. | 83 |
| Tabla 4. Listado de las 10 moléculas más inducidas y reprimidas en los transfectantes de endoglina larga y corta. | 84 |

| | |
|---|-----|
| Figura 23. Análisis bioinformático (IPA) de la lista proteómica obtenida mediante SILAC. | 86 |
| Figura 24. Niveles de integrinas y adhesión celular. | 87 |
| Figura 25. Ensayos funcionales de procesos afectados exclusivamente en una de las isoformas de endoglina. | 89 |
| Figura 26. Polarización de los transfectantes estables de endoglina. | 91 |
| Figura 27. Niveles de citoquinas secretadas por los transfectantes estables de endoglina. | 92 |
| Figura 28. Niveles de activina en el sobrenadante de los transfectantes estables. | 93 |
| Figura 29. Endoglina soluble en poblaciones de macrófagos M1 y M2 polarizados <i>in vitro</i> . | 94 |
| Figura 30. Niveles de endoglina a nivel de ARNm y de proteína de membrana. | 96 |
| Figura 31. Niveles de transcripción de MMP12 y MMP14 en macrófagos M1 y M2. | 97 |
| Figura 32. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad de MMP12 recombinante. | 98 |
| Figura 33. Zimografía de caseína. | 99 |
| Figura 34. Comprobación de la eficacia de transfección y expresión de los vectores de MMP12 y endoglina generados. | 99 |
| Figura 35. Niveles de endoglina soluble en células COS7 lipofectadas. | 100 |
| Figura 36. Actividad proteolítica de MMP12 en macrófagos pro-/anti-inflamatorios y en células endoteliales. | 101 |
| Figura 37. Transcripción de MMP12 en respuesta al tratamiento con GM-CSF. | 102 |

Figura 38. Actividad *in vivo* de MMP12 en un contexto de respuesta inflamatoria y niveles asociados de endoglina soluble. 103

V. DISCUSIÓN

Figura 39. Expresión de endoglina durante el proceso de diferenciación de los precursores hematopoyéticos. 111

Figura 40. Modelo hipotético del papel de endoglina en el balance entre macrófagos M1 y M2. 118

Introducción---

“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas”.

— Mario Benedetti.

I. INTRODUCCIÓN

1. Endogлина

1.1 Distribución celular y expresión

Endogлина o CD105 es una glicoproteína transmembrana homodimérica con un papel crucial en el remodelado vascular y la angiogénesis. Fue descrita en 1990 como una glicoproteína que se expresaba en la membrana plasmática de células endoteliales. Su estudio se ha centrado, por tanto, dentro de su relevante papel en la fisiología endotelial (Bernabeu *et al.*, 2007; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). En relación con el sistema vascular, endogлина no sólo se expresa en la célula endotelial, sino también en otras células que participan en el mantenimiento de la estructura y función de los vasos sanguíneos como son los fibroblastos del estroma perivascular (Matsubara *et al.*, 2000) y las células musculares lisas que rodean dichos vasos (Gougos *et al.*, 1992; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Esta expresión diferencial se hace más patente en células endoteliales involucradas en procesos activos de angiogénesis como la vasculatura tumoral, tejidos inflamados, cierre de heridas, piel psoriásica, artritis sinovial inflamada, daño vascular y desarrollo embrionario (Torsney *et al.*, 2002; Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003; Leong *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2012). Por este motivo, se utiliza como marcador de procesos de neovascularización.

Dentro del desarrollo del sistema cardiovascular, endogлина se localiza en el endotelio del embrión durante todo el proceso de desarrollo a partir de la 4ª semana de gestación y está sobreexpresada transitoriamente en el mesénquima del tejido esponjoso durante la formación de los septos del corazón. Endogлина se sobreexpresa también en células endoteliales de riñón y corazón después de un proceso de isquemia-reperfusión (Docherty *et al.*, 2006).

Fuera del contexto endotelial, endogлина también se emplea como marcador funcional de células hematopoyéticas ya que se ha descrito su expresión en proeritroblastos (Buhning *et al.*, 1991), precursores de células B (Zhang *et al.*, 1996), macrófagos

(Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992) y células estromales de la médula ósea (St-Jacques *et al.*, 1994; Robledo *et al.*, 1996). También se ha descrito la expresión de endoglina en algunas células tumorales, como es el caso de melanomas (Altomonte *et al.*, 1996), cáncer de próstata (Liu *et al.*, 2002), coriocarcinomas (Letamendia *et al.*, 1998) y tumores de origen hematopoyético, en concreto de los linajes monocíticos (Lastres *et al.*, 1996) y de linfocitos B (Zhang *et al.*, 1996); en las células mesangiales de riñón (Rodríguez-Barbero *et al.*, 2001); en los sincitiotrofoblastos de placenta, componentes fetales de la interfase materno-fetal los cuales forman una capa de células multinucleadas que actúa como barrera protectora e intercambiadora de nutrientes para el feto (Gougos *et al.*, 1992; St-Jacques *et al.*, 1994); en condrocitos humanos de cartilago (Parker *et al.*, 2003) y queratinocitos epidérmicos de folículos pilosos y glándulas sudoríparas (Quintanilla *et al.*, 2003).

Dentro del ámbito de la presente tesis doctoral, se ha centrado la atención en la expresión de endoglina en el linaje mieloide, más concretamente en el proceso de diferenciación monocito-macrófago.

1.2 Vías de señalización e interacción

En el contexto de señalización celular, endoglina se engloba en el sistema de señalización de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). TGF- β es el miembro prototipo de una gran superfamilia de citoquinas conservadas a lo largo de la evolución. Hasta la fecha, más de sesenta miembros de la superfamilia han sido identificados en el genoma de múltiples organismos, y entre treinta y cuarenta se han hallado en el genoma humano. De entre los miembros que se han encontrado expresados como proteína en el ser humano, se incluyen tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), cinco activinas y al menos ocho proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) (Shi y Massague, 2003; Schmierer y Hill, 2007; Santibanez *et al.*, 2011). Los miembros de la familia de TGF- β son importantes durante el desarrollo embrionario y, en el organismo adulto, regulan la homeostasis

tisular y están frecuentemente implicados en diversas condiciones patológicas, como por ejemplo la transformación epitelio-mesenquimal que tiene lugar durante la malignización tumoral (Gordon y Blobe, 2008; Lenferink *et al.*, 2010). TGF- β 1 se expresa predominantemente en el sistema inmune y es una importante citoquina pleiotrópica con un potente papel en la inmunorregulación (Chang *et al.*, 2002; Govinden y Bhoola, 2003). Los ratones deficientes en TGF- β 1 desarrollan una afección inflamatoria autoinmune y multiorgánica que desemboca en la muerte de los mismos pocas semanas después de su nacimiento (Kulkarni *et al.*, 1993). Asimismo, dentro de las activinas, se ha identificado la activina-A como una citoquina clave para la expresión diferencial y funciones efectoras mostradas por macrófagos pro (M1) y anti-inflamatorios (M2), siendo determinante para la adquisición de un fenotipo M1 y dificultando su polarización a M2 (Sierra-Filardi *et al.*, 2011).

Los miembros de la superfamilia de TGF- β llevan a cabo sus acciones mediante la unión a un complejo receptor que consta de dos receptores (tipo I y tipo II) con actividad Ser/Thr quinasa. Hay seis receptores tipo II (RII) y siete receptores tipo I (RI) descritos hasta la fecha en mamíferos (Shi y Massague, 2003; Schmierer y Hill, 2007; Santibanez *et al.*, 2011). En el caso de TGF- β , el receptor tipo II es T β RII y el receptor tipo I es T β RI/ALK5 (*Activin receptor-like kinase-5*). En células endoteliales, TGF- β puede señalizar, además de por ALK5, por ALK1 (*Activin receptor-like kinase-1*), ya que ambos receptores tipo I se co-expresan de modo particular en estos tipos celulares (Oh *et al.*, 2000; Goumans *et al.*, 2002; Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004).

El acceso de TGF- β a los receptores tipo I y II está regulado por la unión del ligando a proteínas solubles del medio extracelular y por la modulación llevada a cabo por los correceptores o receptores tipo III (T β RIII, endoglina o betaglicano). Es en este punto de la ruta de señalización donde endoglina y betaglicano tienen su papel modulador.

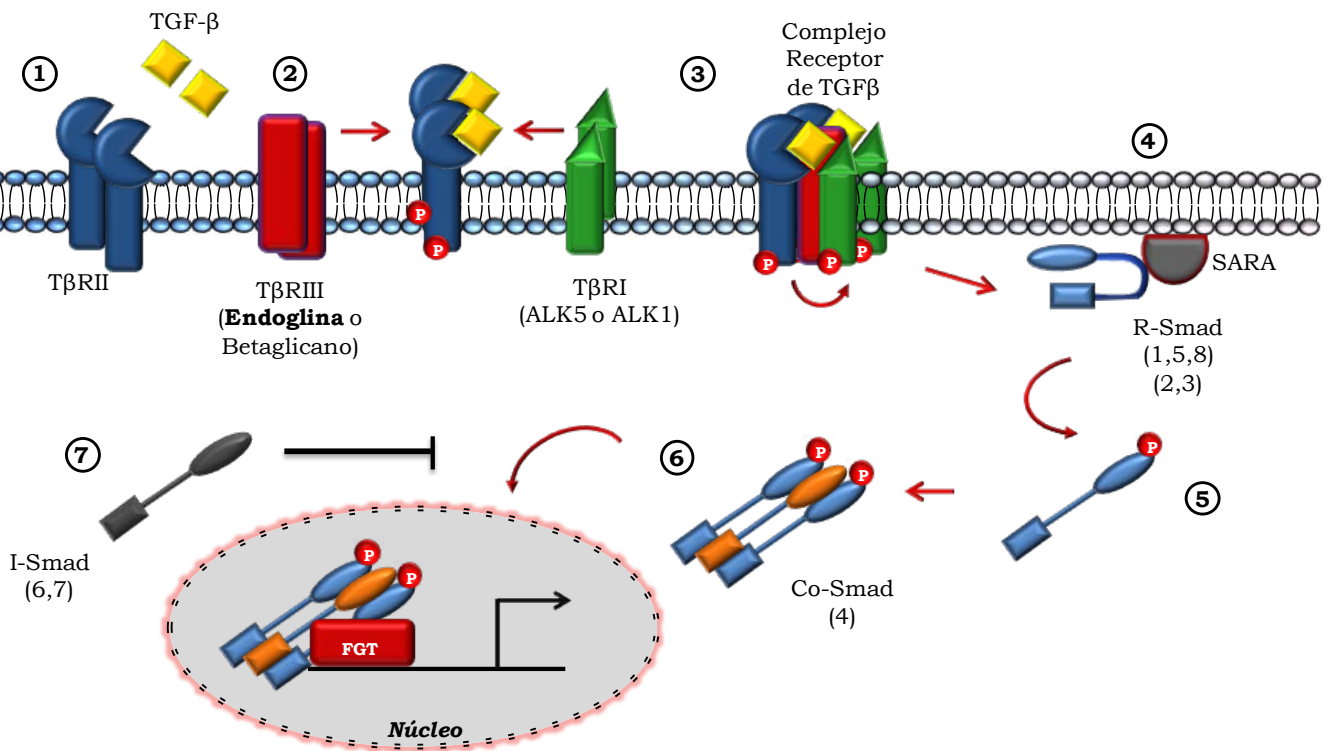


Figura 1. Esquema de la señalización del TGF-β desde la membrana hasta el núcleo de la célula. El TGF-β circula por el torrente sanguíneo y es captado en la membrana del macrófago o la célula endotelial por el dímero de receptor tipo II (1) (TβRII), que se autofosforila en residuos Ser-Thr (2). Esto produce el reclutamiento del dímero de receptor tipo I (TβRI/ALK5 ó ALK1) y del correceptor endoglina o betaglicano (también conocido como TβRIII). La unión del ligando estabiliza la formación del complejo y el TβRII fosforila residuos Ser-Thr del dominio GS del TβRI, activando el complejo (3). Tras ello, las Smads dependientes de receptor (R-Smads), que son atraídas a las inmediaciones de la membrana gracias a proteínas de anclaje como SARA (4), son fosforiladas en su dominio C-terminal, lo cual cambia su conformación (5) y crea un sitio de unión para la Smad cooperadora (Co-Smad), que en mamíferos es siempre Smad4. Smad4 puede asociarse en el citoplasma y entrar al núcleo como complejo con las R-Smads o puede asociarse dentro del núcleo tras la traslocación de las R-Smads activadas (6). Una vez allí, el complejo interacciona con el ADN de los genes diana, con los factores generales de transcripción (FGT) y con una gran diversidad de coactivadores y co-represores específicos en cada caso, y como resultado se obtiene la modulación de la expresión génica en respuesta al entorno celular. Este proceso está regulado negativamente por las Smads inhibidoras (ISmad) (7). Las R-Smad se desfosforilan y pueden ser recicladas o bien marcadas con ubiquitina por la familia Smurf de ubiquitina-ligasas y degradadas por el proteasoma (no mostrado).

Como correceptores, no poseen un dominio quinasa con actividad catalítica pero son capaces de interactuar con los receptores de tipo II y mejorar su respuesta ante un determinado estímulo (Bernabeu *et al.*, 2007; ten Dijke y Arthur, 2007; ten Dijke *et al.*, 2008; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Cuando el TGF-β circulante se une al dímero de membrana TβRII (que está constitutivamente activado por autofosforilación en residuos Ser-Thr) (Lin *et al.*, 1992) (Fig. 1.1), el dímero TβRI (ALK5 ó ALK1) es

reclutado al complejo y fosforilado por T β RII en residuos Ser específicos en la región yuxtamembrana (Wieser *et al.*, 1995; Massague, 1998). A su vez, el correceptor (T β RIII, endoglina o betaglicano) se une a ellos (Fig. 1.2) y el complejo activo modula la transducción de la señal hacia el interior de la célula mediante las proteínas Smads (Fig. 1.3). Las Smads reguladas por receptor (R-Smads) se encuentran en el citoplasma en estado basal, ancladas a microtúbulos por interacción con α y β -tubulina (Dong *et al.*, 2000). Las R-Smads interaccionan con ciertas proteínas de anclaje, como SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*), Dab2, TRAP1 etc. (Tsukazaki *et al.*, 1998; Derynck y Zhang, 2003), que las localizan en las cercanías de la membrana (Fig. 1.4). SARA recluta a las R-Smads al T β RI y la afinidad de la unión de las R-Smads a SARA decrece tras la fosforilación por T β RI en dos residuos serina del extremo carboxi-terminal de las R-Smads, ya que estos residuos están implicados en la interacción entre ambas proteínas. ALK5 fosforila Smad2 y Smad3, mientras que ALK1 es el responsable de la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8 (Goumans *et al.*, 2009). Las R-Smads activadas forman un complejo con la Smad cooperadora (co-Smad) (Fig. 1.6), que en mamíferos es Smad4, y se translocan al núcleo, donde regulan, junto con otros factores de transcripción, la expresión de genes diana específicos tales como *SERPINE1* (*Plasminogen Activator Inhibitor*) o *Id1* (*Inhibitor of DNA Binding-1*) (ten Dijke and Arthur 2007). Como mecanismo regulador negativo, las Smads inhibitoras (I-Smads) (Fig. 1.7) Smad6 y Smad7 pueden inhibir la activación de las R-Smads mediante competición por los receptores tipo I y mediante el reclutamiento de ubiquitina-ligasas o de fosfatasas específicas hacia el receptor activado, marcándolo para degradación proteosomal o defosforilándolo, respectivamente (Heldin *et al.*, 1997; Shi y Massague, 2003; Valdimarsdottir *et al.*, 2006; Schmierer y Hill, 2007).

Las Smads interaccionan con coactivadores como por ejemplo CBP/p300, lo que permite al complejo Smad intensificar la actividad transcripcional inherente a otros factores transcripcionales con los que pueden formar complejos sobre ciertos genes diana. Por tanto, las Smads pueden ser consideradas como coactivadoras para

algunos factores de transcripción (Derynck y Zhang, 2003). Aunque las Smads son consideradas como las proteínas transductoras de la señal del TGF- β específicamente, pueden establecer reacciones cruzadas con rutas de señalización mediadas por otros ligandos. No obstante, no todas las señales que TGF- β ejerce en la célula están mediadas por las Smads, existiendo lo que se denominan respuestas “no-Smad” o “no canónicas” del TGF- β . Dentro de estas respuestas se incluyen las mediadas por la ruta de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), las mediadas por GTPasas similares a Rho, por la ruta de PI3K/AKT (*Phosphoinositide 3-Kinase/Akt*) y por TAK1 (*TGF- β Activated Kinase 1*) (Derynck y Zhang, 2003; Moustakas y Heldin, 2005; Delaney y Mlodzik, 2006; Zhang, 2009). Las señales nucleares transmitidas por estas vías de señalización pueden regular la transcripción en un modo independiente de las Smads o bien actuando sinérgicamente con ellas.

Al contrario que betaglicano, endoglina se expresa preferentemente en células endoteliales, las cuales no presentan prácticamente betaglicano en su superficie (Cheifetz *et al.*, 1992). Endoglina tiene la capacidad de interactuar con TGF- β 1, Activina-A, BMP2 y BMP7 en presencia de sus correspondientes receptores señalizadores (Letamendia *et al.*, 1998; Barbara *et al.*, 1999). Además, es capaz de interactuar directamente con BMP9 y BMP10 en ausencia de los receptores señalizadores (David *et al.*, 2009; Castonguay *et al.*, 2011; Alt *et al.*, 2012). De esta forma, endoglina potencia el efecto de TGF- β 1, BMP7 y BMP9 mediado por Smad1/Smad5 mientras que inhibe la respuesta dependiente de Smad3 (Lastres *et al.*, 1996; Borges *et al.*, 2012). Llegados a este punto es importante destacar que una forma de la proteína de la que hablaremos más adelante (endoglina soluble) puede tener un efecto antagónico al descrito hasta ahora.

1.3 Isoformas de Endoglina

Endoglina posee un corto tallo citoplasmático que tiene una longitud de 47 aminoácidos (aa) rico en serinas y treoninas susceptibles de ser fosforiladas. La inmensa mayoría de estudios relativos a endoglina hacen referencia a esta isoforma de la proteína, denominada endoglina larga (EngL), puesto que es la isoforma predominante. Sin embargo, también se ha descrito la existencia de una isoforma alternativa tanto en humanos (Bellon *et al.*, 1993) como en ratón (Perez-Gomez *et al.*, 2005). En humanos, ambas isoformas comparten el dominio extracelular y la región transmembrana; la única diferencia reside en la longitud de su tallo citoplasmático, que en la isoforma alternativa es de sólo 14 aa, por lo que se la ha denominado endoglina corta (*short endoglin*, EngS). La región citoplasmática de las isoformas sólo comparte 7 aminoácidos y la principal diferencia entre ambas es que endoglina corta no tiene la secuencia de interacción con proteínas PDZ. Esta secuencia sirve de punto de unión para proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto celular (Koleva *et al.*, 2006). Además, la isoforma S carece de la Ser-616, un sitio potencial de fosforilación de la proteína quinasa C (PKC) (Lastres *et al.*, 1994).

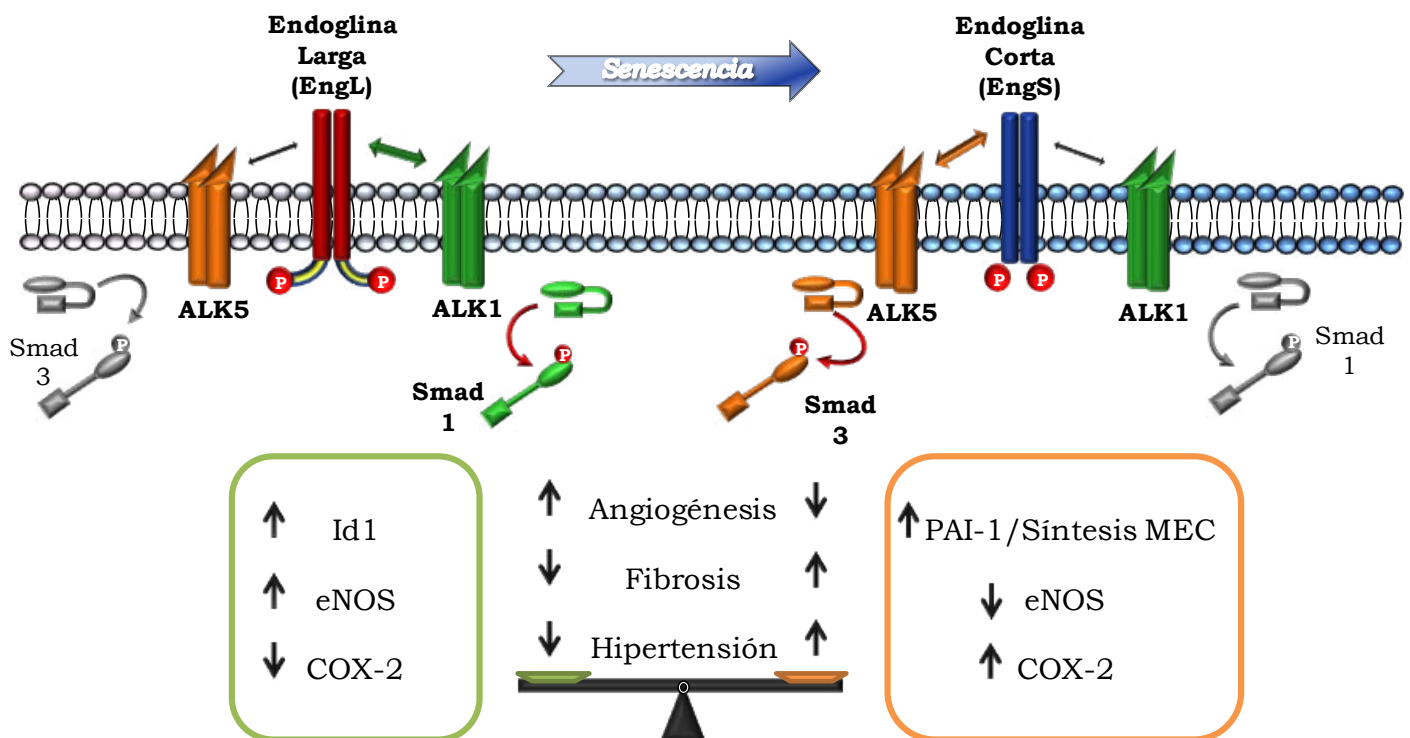


Figura 2. Modelo hipotético simplificado de las funciones de endogлина corta en la senescencia endotelial. En condiciones normales la respuesta a TGF- β se modula mediante EngL, pero, en senescencia, EngS esta aumentada y señala preferentemente por la vía de ALK5. De esta forma, EngS modula la expresión de algunos genes diana de TGF- β incluyendo *PAI-1*, *Id1*, *eNOS* y *COX2*. Este cambio en la expresión de la isoforma contribuye a la enfermedad vascular asociada al envejecimiento. El aumento en *PAI-1* y su consiguiente aumento en la síntesis de matriz extracelular (ECM) puede promover fibrosis. Por otra parte la disminución de *Id1* se asocia a una menor angiogénesis, mientras que la disminución de *eNOS* y el aumento de *COX-2* se relacionan con el fenotipo de hipertensión. (Adaptado de Blanco *et al.* 2008).

En función de la isoforma de endogлина que esté presente en la membrana, la señalización mediada por TGF- β puede variar, ya que cada una de ellas tiene preferencia por un receptor T β RI diferente (Fig. 2).

Se ha descrito recientemente que cuando la célula endotelial entra en senescencia muestra una inducción de la isoforma corta de endogлина. En este punto, la célula expresa ambas isoformas y presenta así una respuesta dual frente a TGF- β . En células endoteliales no senescentes, EngL señala interaccionando con el T β RI-ALK1/Smad1 teniendo como genes diana *Id1* o *eNOS*, favoreciendo así funciones efectoras como la angiogénesis (Fig. 2). A la vez que EngL potencia la vía de ALK1, también interfiere con la vía ALK5/Smad3, que a su vez es el ligando preferente de la isoforma corta (Perez-Gomez *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2008). Como consecuencia de esta interacción con ALK5, EngS aumenta la expresión de distintos genes diana de TGF- β tales como *PAI-1* o *COX-2* e inhibe la expresión de *Id1* (Fig. 2). Por tanto, se puede afirmar que la isoforma corta de endogлина tiene un papel antiangiogénico en endotelio y que puede explicar procesos fisiológicos observados en el envejecimiento vascular como la fibrosis, debida al aumento en la síntesis de matriz extracelular y la hipertensión (Blanco *et al.*, 2008; Velasco *et al.*, 2008). Por este motivo, se considera endogлина corta como un marcador de senescencia endotelial tanto en humano como en ratón, puesto que su expresión se correlaciona con la disfunción endotelial asociada al envejecimiento.

Está bien establecida la relación existente en la diferenciación de monocito a macrófago y el aumento en la expresión de endogлина de membrana. A pesar de ello, el papel de endogлина y sus isoformas es poco conocido en el linaje mieloide. En la

presente tesis doctoral se extrapola el nexo observado entre endoglina corta y senescencia al linaje mieloide. Los cambios fenotípicos y fisiológicos observados al expresarse la isoforma corta en macrófagos se engloban dentro del proceso de inmunosenescencia.

1.4 Ajuste (*Splicing*) alternativo de endoglina

La mayoría de los genes en eucariotas sufren un mecanismo de ajuste en su secuencia prematura de ARN mensajero (pre-ARNm). Este proceso aumenta considerablemente la complejidad del proteoma celular (Graveley, 2001; Kwan *et al.*, 2007). El ensamblaje de la maquinaria responsable de este proceso, el espliceosoma, está dirigido por un grupo de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) que reconocen los puntos de ajuste 5', 3' y los puntos de ramificación situados entre ellos (Burge 1999). Existen dos complejos de ajuste distintos; el espliceosoma principal (M-Sp) y el espliceosoma menor (m-Sp).

El espliceosoma principal está involucrado en la mayoría de procesos de ajuste. Se compone por 5 snRNPs (pequeñas ribonucleoproteínas nucleares) denominados U1, U2, U4, U5 y U6 y un grupo bastante numeroso de factores de ajuste no snRNP (Zhou *et al.*, 2002; Jurica y Moore, 2003). El espliceosoma menor interviene en el ajuste de los denominados intrones no canónicos (Patel y Steitz, 2003; Will y Luhrmann, 2005) y está compuesto por 4 snRNPs exclusivos (U11, U12, U4atac y U6atac) además del compartido con el M-Sp, U5 (Hall y Padgett, 1996; Tarn y Steitz, 1996). Una diferencia interesante entre ambos complejos es que mientras que el M-Sp se localiza en el núcleo, el m-Sp se ubica en el citoplasma (Konig *et al.*, 2007).

Se han identificado tres formas de ajuste alternativo: el salto de exones, la selección alternativa de puntos de ajuste y la retención de intrones (RI). De todos ellos, el menos estudiado es la RI debido a que casi siempre implica defectos en el transporte de ARNm al citoplasma y su posterior degradación debido a corrupción y secuencias

sin sentido (Nott *et al.*, 2003). Sin embargo, en ocasiones la retención de un intrón en el ARNm maduro da lugar a una isoforma biológicamente activa como sería el caso del gen cardíaco *ANKRD1* (Torrado *et al.*, 2009), la quimioquina *CCL27* (Ledee *et al.*, 2004) y el gen *FLT1* que puede dar lugar a la forma soluble de sFlt-1 (Thomas *et al.*, 2007). La isoforma corta de endoglina también se origina por RI. Su expresión es el resultado de la retención del último intrón situado entre los exones #13 y #14 en la forma madura del ARN mensajero. Como consecuencia, aparece un codón de parada prematuro en el marco de lectura de la proteína dando lugar a una forma truncada de endoglina (Blanco *et al.*, 2008) (Fig. 3).

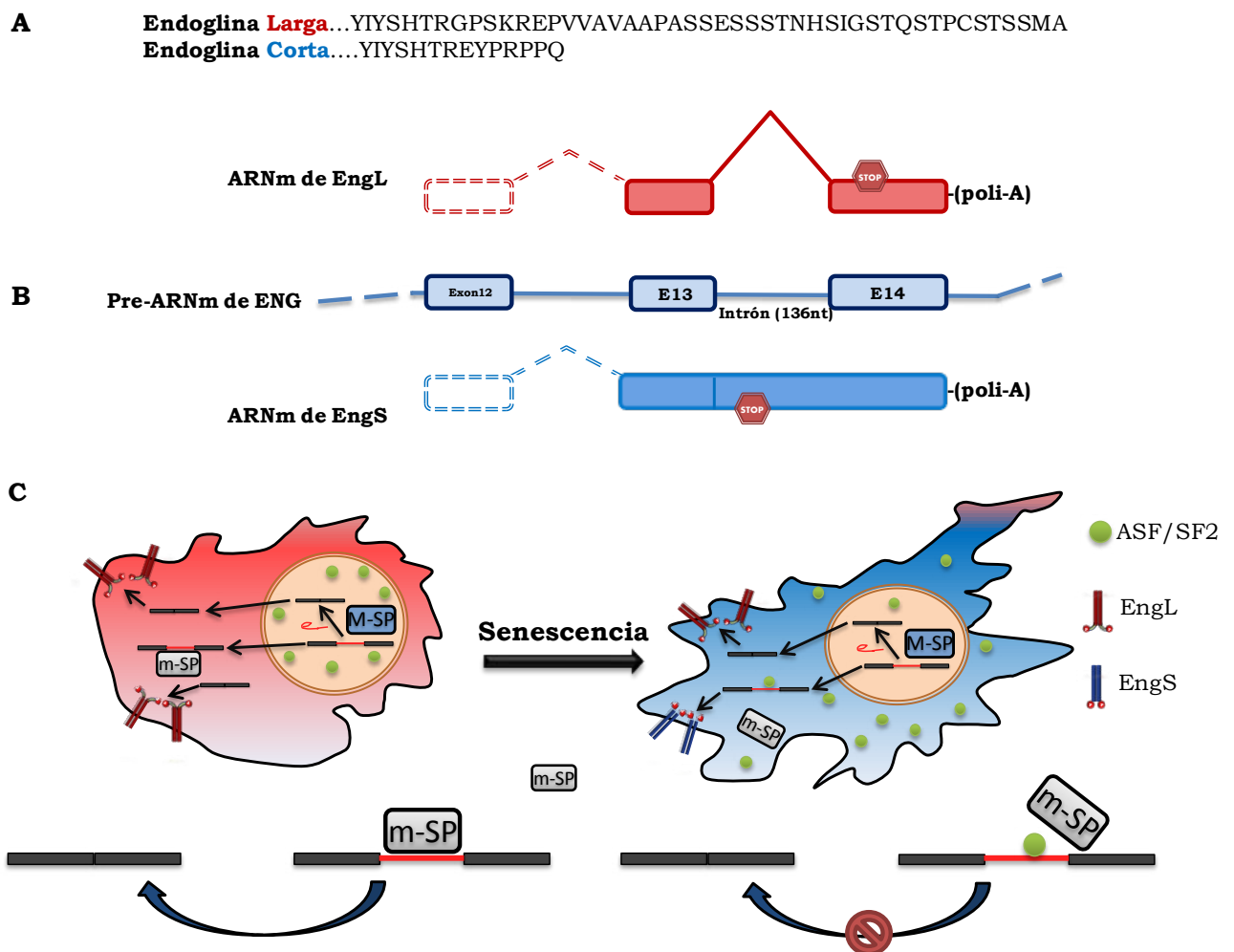


Figura 3. Mecanismo de ajuste alternativo. **A.** Secuencia de aminoácidos de ambas isoformas de endoglina. **B.** El pre-ARN mensajero se representa en la mitad de los transcritos maduros que originan cada isoforma. La retención de un intrón final por ajuste alternativo, con la consiguiente creación de un codón de parada, permite la expresión de la isoforma corta de la proteína.

C. Modelo hipotético del mecanismo mediante el cual se genera la isoforma corta de endoglina en senescencia endotelial. En células jóvenes, debido a la eliminación del último intrón mediado por el M-Sp y, en menor medida, por el m-Sp, se observa una expresión preferencial de la isoforma mayoritaria (EngL). La actividad del espliceosoma menor procesa algunos ARN mensajeros que todavía presentan retención de intrones (como el caso del intrón 14 de endoglina). Cuando la célula endotelial alcanza el estado senescente, el factor de ajuste ASF/SF2 transloca del núcleo (situación habitual) al citoplasma. Es entonces cuando el ASF/SF2 se une al elemento cis solapando el punto de ramificación del ARN mensajero de EngS y formando un complejo estable que interfiere con el acceso de m-Sp. De esta forma se estabiliza la retención del intrón y aumentan los niveles de endoglina corta. (Adaptado de Blanco et al. 2011).

Uno de los grupos mejor caracterizados dentro de los factores de ajuste es la familia de proteínas ricas en serina/arginina, dentro de las que destaca como prototipo de la misma el factor de ajuste alternativo tipo 2 (ASF/SF2) (Graveley, 2000). Este factor está involucrado en procesos de ajuste constitutivos y alternativos. A pesar de mostrar una localización preferencial en el núcleo, ASF/SF2 se puede mover al citoplasma dependiendo de su estado de fosforilación o metilación, que en última instancia determinará su actividad (Sanford *et al.*, 2005; Sanford *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2010). Dentro de este contexto se ha identificado recientemente el papel de ASF/SF2 en la regulación de la retención del intrón en la senescencia endotelial (Blanco y Bernabeu, 2011). En células endoteliales senescentes, la localización subcelular de este factor de ajuste es eminentemente citoplasmática, donde puede interferir con el m-Sp e impedir la eliminación del intrón responsable de la síntesis del ARNm de EngS. La función no nuclear del ASF/SF2 como inductor de senescencia va en línea con sus propiedades anti-angiogénicas puesto que la fosforilación de este factor promueve su localización citoplasmática y este hecho va asociado a un incremento de una isoforma anti-angiogénica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) (165b) (Nowak *et al.*, 2010).

1.5 Endoglina soluble

Ambas isoformas de membrana de endoglina (EngL y EngS) pueden dar lugar a una tercera forma de la proteína que, a pesar de no considerarse un isoforma propiamente dicha, puede encontrarse en forma soluble. A pesar de que endoglina es una proteína

de membrana, también se pueden detectar bajos niveles en plasma de la proteína en su forma soluble debido a un corte proteolítico, que, al igual que ocurre con betaglicano, es susceptible de ser producido por la metaloproteasa 1 (MT1 o MMP14) (Velasco-Loyden *et al.*, 2004; Hawinkels *et al.*, 2010; Valbuena-Diez *et al.*, 2012). La co-expresión de endogлина y MMP14 en la célula endotelial y la actividad de esta última tiene como consecuencia la liberación de la forma soluble de la proteína debido al corte que se produce preferentemente en la posición yuxtamembrana Gly-Leu **586** (dentro de los 4 sitios Gly-Leu potenciales: **299**, **387**, **453**, y **586**). Por tanto, la digestión por MMP14 da lugar a una forma soluble de endogлина que tiene el mismo tamaño que el descrito para el dominio extracelular de la misma. Si bien la mayoría de estudios han identificado endogлина soluble dentro de un contexto patológico, no se puede descartar un papel fisiológico (o incluso terapéutico) puesto que se conocen las propiedades anti-angiogénicas de endogлина soluble derivadas de su capacidad para reducir la angiogénesis inducida por VEGF (Hawinkels *et al.*, 2010).

1.6 Enfermedades relacionadas con endogлина.

1.6.1 Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) o Síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad vascular autosómica dominante que se caracteriza por la aparición de estructuras vasculares anormales en la región de contacto entre vénulas y arteriolas, dentro de la red capilar, lo que lleva a su desestructuración y pérdida de funcionalidad (Fig. 4A). Esta irregularidad en la vasculatura da lugar a frecuentes hemorragias nasales, telangiectasias y malformaciones arterio-venosas viscerales en hígado, pulmón y cerebro (AVMs) (Guttmacher *et al.*, 1995; Shovlin y Letarte, 1999; Shovlin, 2010).

La HHT es considerada una enfermedad rara cuya prevalencia es de 1/8.000 habitantes en las poblaciones analizadas hasta el momento (Shovlin, 2010). Desde un punto de vista genético, la HHT es una enfermedad heterogénea. El gen de endogлина

(*ENG*) fue el primero cuya mutación se asoció con HHT, localizando su *locus* en el cromosoma 9 dentro de la región 9q33-q34.1 (Fernandez-Ruiz *et al.*, 1993; McAllister *et al.*, 1994). Posteriormente se identificó el segundo *locus* que da lugar a la HHT tipo 2 (HHT2) y que se corresponde con el gen *ALK1/ACVRL1* (Johnson *et al.*, 1996), que, como ya se ha mencionado, es uno de los receptores tipo I del sistema de señalización de TGF- β (Fig. 4A). Más del 90% de los pacientes presentan mutaciones bien en *ENG* o en *ACVRL1*. El 10% restante presenta, al menos, mutaciones en dos *loci* adicionales cuyos genes no han sido identificados todavía: i) Los individuos HHT tipo 3 (HHT3) presentan mutaciones en un *locus* del cromosoma 5 (Cole *et al.*, 2005) y ii) Los HHT tipo 4 (HHT4) mapean en un *locus* del cromosoma 7 (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006). Además de las mutaciones anteriormente mencionadas, también se ha descrito una enfermedad asociada a la HHT, el síndrome de Poliposis Juvenil Familiar causada por mutaciones en el gen *MADH4* que codifica la proteína Smad4 (Gallione *et al.*, 2006). Por último, recientemente se han identificado mutaciones en el gen de BMP9 (*CDR2*) que son causantes de un síndrome vascular con características que solapan con HHT (Wooderchak-Donahue *et al.*, 2013).

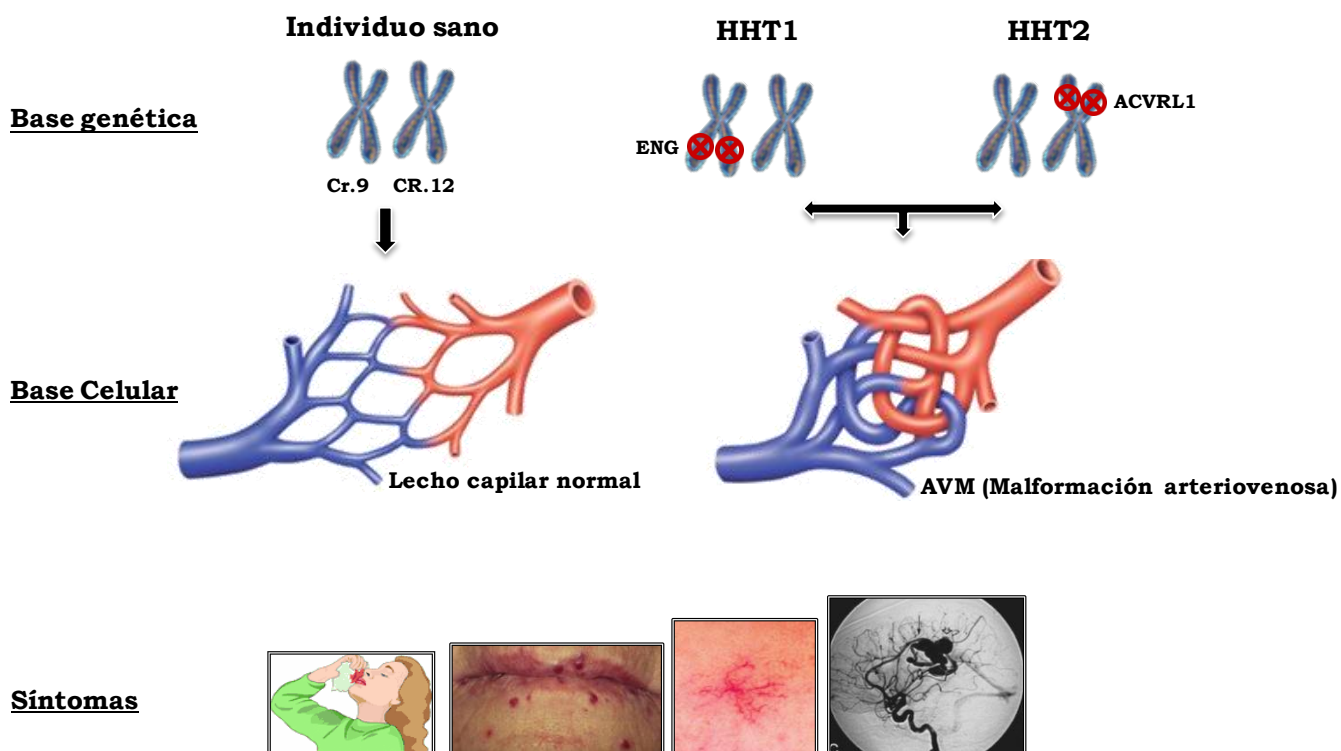


Figura 4. Bases moleculares y celulares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y sintomatología asociada. La HHT es una enfermedad vascular autosómica dominante que se caracteriza por hemorragias espontáneas y recurrentes. Mutaciones en los genes de *ENG* o *ACVRL1* derivan en una haploinsuficiencia que es en el 90% de los casos la base genética de la enfermedad. Como consecuencia, el balance de la señalización de TGF- β en endotelio se desregula, la pared vascular se vuelve frágil, su citoesqueleto se desestructura, y la angiogénesis aumenta de modo descontrolado, produciendo vasos de morfología aberrante y calibre ensanchado, y perdiéndose la red capilar. La aparición de estas malformaciones arteriovenosas tiene como consecuencia un peor intercambio de oxígeno y nutrientes con los tejidos, da lugar a telangiectasias en piel y mucosas y a fistulas en órganos internos (fundamentalmente en cerebro, hígado, pulmón y tracto gastrointestinal). La rotura de estas frágiles estructuras da lugar a los síntomas, que incluyen sangrados nasales (epistaxis) por rotura debido a la abrasión de la mucosa nasal, detección de telangiectasias y fistulas en órganos internos e historia familiar. El diagnóstico clínico de la enfermedad se realiza en base a estos síntomas según los criterios de Curaçao, si bien el diagnóstico ha de confirmarse genéticamente.

La HHT se diagnostica a nivel clínico, existiendo 4 criterios consenso que fueron definidos por el comité asesor científico de la Fundación Internacional de HHT en la isla de Curaçao en 1999, conocidos como los Criterios de Curaçao (Shovlin *et al.*, 2000; Faughnan *et al.*, 2011) (Fig. 4). Los pacientes de HHT son heterocigotos para el gen afectado, siendo letal la situación homocigótica. De hecho, los ratones modificados genéticamente para anular la expresión de ambos alelos de *Eng* o *Acrv11* mueren antes de llegar a término la gestación del feto (días 10,5-11,5). Al presentarse la mutación en heterocigosis en la enfermedad, se propone la haploinsuficiencia de estas proteínas del sistema de señalización de TGF- β como la causa última que desencadena los síntomas de la misma. Además, la observación de que la severidad de los síntomas, la edad de aparición de los mismos y la localización de las lesiones varían mucho entre individuos (incluso de una misma familia), ha llevado a proponer recientemente la necesidad de un segundo evento (*second hit*), que sumado a la haploinsuficiencia, contribuya a la aparición de la sintomatología.

1.6.2 Cáncer

El proceso de angiogénesis es clave en el crecimiento y progresión de los tumores. Los niveles de expresión de endoglina en un endotelio "quiescente" no son tan elevados como en las células endoteliales en fase proliferativa y en la formación de vasos. Estos hechos sugieren que endoglina puede tener relevancia en el diagnóstico, pronóstico y

como diana terapéutica en cáncer debido a la angiogénesis asociada al crecimiento tumoral (Duff *et al.*, 2003; Fonsatti *et al.*, 2003; Bernabeu *et al.*, 2009). Además, varios autores han demostrado que la expresión de endogлина se encuentra muy aumentada en la vasculatura de tumores sólidos (Burrows *et al.*, 1995; Thorpe y Burrows, 1995). De hecho, en los vasos de tejidos adultos no malignos, incluyendo lesiones preneoplásicas, la expresión de endogлина es mucho más débil que en los vasos de los tumores y con frecuencia se restringe a los capilares (Fonsatti *et al.*, 2000). Así mismo, se ha descrito que endogлина es un potente marcador en la vasculatura de tumores sólidos y hematopoyéticos como mama (Kumar *et al.*, 1999), próstata (Kassouf *et al.*, 2004), cérvix (Brewer *et al.*, 2000), colorrectal (Akagi *et al.*, 2002), pulmón de células macrocíticas (Tanaka *et al.*, 2001), tumores escamosos de cabeza y cuello (Kyzas *et al.*, 2006), carcinoma renal (Duff *et al.*, 2003), adenocarcinoma esofágico (Saad *et al.*, 2005), carcinoma endometrial (Saad *et al.*, 2003), mieloma múltiple (Pruneri *et al.*, 2002) y tricoleucemia (Pruneri *et al.*, 2003).

Ensayos *in vitro* con células provenientes de vasos tumorales relacionan directamente su capacidad proliferativa y los niveles aumentados de endogлина. Se ha correlacionado también la positividad de endogлина con el riesgo de desarrollar metástasis en tumores de colon, cáncer oral, carcinoma hepatocelular y cáncer endometrial (Kumar *et al.*, 1999; Saad *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2006; Erdem *et al.*, 2006; Romani *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). En este sentido, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han confirmado el enorme potencial de endogлина como diana terapéutica del cáncer humano, observándose que los anticuerpos monoclonales anti-CD105 conjugados con toxinas inducen supresiones duraderas del crecimiento tumoral y las metástasis en los modelos oncológicos animales (Fonsatti *et al.*, 2003; Maio *et al.*, 2006; Bernabeu *et al.*, 2009; Seon *et al.*, 2011).

La relación que se establece entre endogлина y cáncer no se restringe solo a los procesos de angiogénesis, puesto que se ha comprobado que ciertos tipos de células tumorales expresan endogлина. Este es el caso de los melanomas (Altomonte *et al.*, 1996), coriocarcinomas (Letamendia *et al.*, 1998) y tumores de origen hematopoyético,

en concreto de linajes monocíticos (Lastres *et al.*, 1996) y de linfocitos B (Zhang *et al.*, 1996). En células de cáncer de próstata endoglina suprime la adhesión celular, la motilidad y la invasión mediante la activación de la vía TGF- β 1/ALK2/Smad1 (Craft *et al.*, 2007). El papel de endoglina en estas células está íntimamente ligado con el efecto modulador de TGF- β puesto que la pérdida del efecto antiproliferativo de TGF- β es un punto clave en el desarrollo de muchos procesos tumorales (Serra y Moses, 1996; Jahn *et al.*, 2012). En este sentido, se ha relacionado la sobreexpresión de endoglina en células mieloides tumorales con la pérdida del mencionado efecto antiproliferativo (Calabro *et al.*, 2003). Por este motivo, se considera endoglina como modulador en carcinogénesis epidérmica (Perez-Gomez *et al.*, 2007) y se le atribuye un papel dual en cáncer de piel; puesto que inhibe la formación inicial del tumor pero una vez formado puede acelerar su conversión a un carcinoma maligno (Quintanilla *et al.*, 2003; Bernabeu *et al.*, 2009; Perez-Gomez *et al.*, 2010).

1.6.3 Preeclampsia

La preeclampsia es una enfermedad asociada al embarazo caracterizada por hipertensión sistémica, proteinuria y edema en torno al tercer trimestre de gestación (Sibai *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2010). Afecta tanto a la madre como al feto y ocurre en el 5% de todos los embarazos. La manifestación severa cursa con la aparición del denominado HELLP en el que se observa alta hemólisis (H), enzimas hepáticas elevadas (*Enzymatic Liver*, EL), bajo recuento de plaquetas (*Low Platelets*, LP) y convulsiones que pueden derivar en la muerte del feto. Aunque se desconoce el motivo último de la enfermedad, parece que es consecuencia de una placentación anormal que resulta a su vez de invasión trofoblástica inadecuada de las arterias espirales maternas (Khong *et al.*, 1986). Mientras que la placentación anómala parece un importante factor que predispone a la enfermedad, la disfunción endotelial tiene un papel central en los cambios fisiopatológicos. También se postula la hipoxia seguida de estrés oxidativo como un hecho crucial que desencadena el proceso patogénico de la preeclampsia (Soleymanlou *et al.*, 2005; Al-Gubory *et al.*, 2010). La hipoxia unida a las

señales pro-inflamatorias pueden favorecer la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Nakagawara *et al.*, 1982; Duranteau *et al.*, 1998) que no puede ser mitigada completamente por los sistemas antioxidantes y afectar así a procesos reproductivos tales como el desarrollo folicular, la ovulación, fertilización, embriogénesis, la implantación del feto y la diferenciación y crecimiento de la placenta (Al-Gubory *et al.*, 2010).

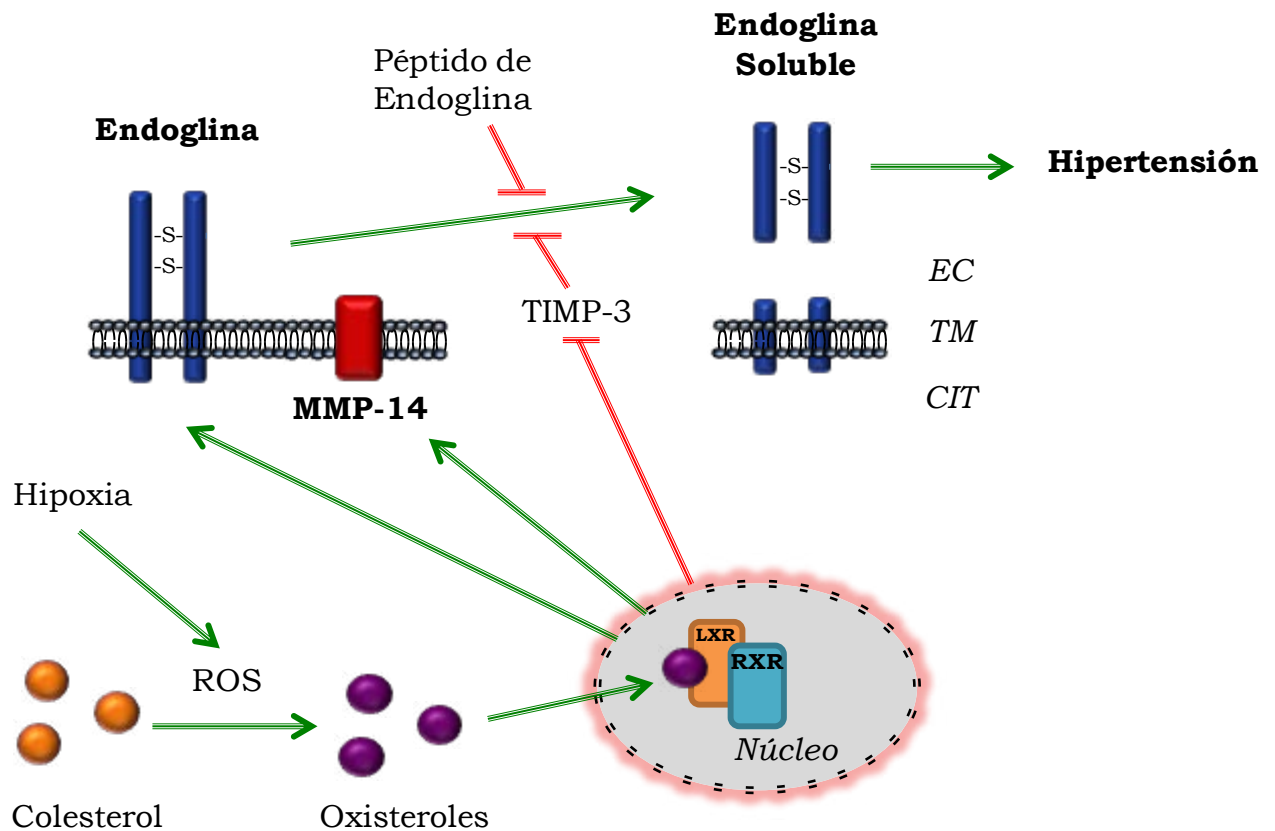


Figura 5. Modelo de liberación de endogлина soluble en preeclampsia. La situación hipóxica de la enfermedad induce la formación de ROS, que favorecen la conversión del colesterol en oxisteroles. Los oxisteroles se unen específicamente al dímero de receptores nucleares LXR/RXR, induciendo un aumento de los niveles de MMP14 y una disminución de los niveles del inhibidor de MMP14, TIMP3. Como resultado, se produce un aumento de la actividad de MMP14, que corta proteolíticamente la región yuxtamembrana de la endogлина unida a la membrana y genera así la forma soluble. El aumento de los niveles de endogлина soluble conduce al aumento de la presión arterial sistémica en ratones. El tratamiento con un péptido de endogлина, que es sustrato de MMP14, contrarresta la hipertensión producida por los oxisteroles *in vivo*. (Adaptado de Valbuena-Diez et al. 2012)

En los últimos años se ha establecido la presencia de la forma de soluble de endogлина y del receptor de VEGF (sFlt-1) como factores diagnósticos de la enfermedad además

de su contribución a la sintomatología clínica de la misma (Levine *et al.*, 2006; Venkatesha *et al.*, 2006). Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio plantean un modelo hipotético que relaciona el fenómeno de hipoxia y los altos niveles de endoglina soluble en el plasma de las pacientes con preeclampsia. Así, los altos niveles de ROS inducidos por hipoxia, promueven la formación de oxisteroles a partir del colesterol. A su vez, los oxisteroles se unen de forma específica a los receptores LXR/RXR (Receptores X del hígado/Receptor X retinoide) que estimulan la expresión de la metaloproteasa de matriz MMP14 y la disminución de un inhibidor de MMP14 como es TIMP3 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3*). Como consecuencia, aumenta tanto la cantidad de MMP14 en la superficie de las células endoteliales como su actividad, lo que deriva en un aumento de la forma soluble de endoglina debido al corte proteolítico. Asimismo, los elevados niveles de la forma soluble propician el cuadro de hipertensión observado en las pacientes con preeclampsia (Valbuena-Diez *et al.*, 2012).

1.6.4 Aterosclerosis

Endoglina puede estar participando en el proceso de aterogénesis. Se ha confirmado un aumento de expresión de endoglina en vasos ateroscleróticos especialmente en células endoteliales y de músculo liso (Conley *et al.*, 2000), en varios tipos de vasos y en modelos tanto humanos como murinos. Además, se ha relacionado su expresión con el aumento de eNOS en endotelio, reparación de la pared del vaso, neo-angiogénesis en la placa, producción de colágeno, y estabilización de las lesiones ateroscleróticas (Higashi *et al.*, 2009; Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). El aumento de los niveles de endoglina soluble se asocia también a la hipercolesterolemia e infarto agudo de miocardio; en parte, por su acción inhibitoria de TGF- β en la pared vascular (Blann *et al.*, 1996; Nachtigal *et al.*, 2009; Walshe *et al.*, 2009; Blazquez-Medela *et al.*, 2011). En este sentido se ha comprobado la reducción de endoglina soluble después de una serie de eliminaciones extracorpóreas (diminución de LDL) en pacientes con hipercolesterolemia familiar (Blaha *et al.*, 2008). Así mismo, el tratamiento con

estatinas conduce a una disminución de la forma soluble de endoglina y el aumento de forma de membrana en modelos de ratón con aterosclerosis (Strasky *et al.*, 2011; Vecerova *et al.*, 2012). Por todas estas evidencias experimentales, se ha propuesto endoglina (sobre todo en su forma soluble) como un marcador del desarrollo de la enfermedad y como una futura diana terapéutica para el tratamiento de esta dolencia.

1.6.5 Psoriasis

La psoriasis es una de las afecciones de piel más frecuentes, llegando a afectar aproximadamente al 2-5% de la población mundial. Se caracteriza por una hiperproliferación de queratinocitos mediada por células T (Sabat *et al.*, 2007). Dentro de esta proliferación exacerbada de la epidermis, también hay un aumento en la actividad angiogénica (Leong *et al.*, 2005). En las lesiones psoriásicas se establece además una regulación que involucra interacciones célula-célula, humorales, citoquinas, factores de crecimiento y diferenciación, metaloproteasas (con sus respectivos inhibidores) y varios productos de la coagulación sanguínea y la fibrinólisis (Bhushan *et al.*, 2002). Ya sea por el aumento de la angiogénesis o por una inflamación crónica, se ha observado un aumento en la expresión de endoglina en las lesiones psoriásicas (van de Kerkhof *et al.*, 1998) y un incremento en el plasma de los pacientes de la forma soluble de la misma. Tratamientos efectivos para paliar los síntomas de la enfermedad se relacionan con la disminución en plasma de la mencionada forma soluble de endoglina (Pohl *et al.*, 2011).

1.6.6 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es un desorden inflamatorio crónico de causa desconocida, caracterizado por una inflamación sinovial poli-articular que deriva en una destrucción progresiva de las articulaciones afectadas. Durante la patogénesis, macrófagos de tejido junto a linfocitos, se acumulan en la membrana sinovial contribuyendo a la progresión de la inflamación. Se considera un mal pronóstico de

desarrollo de la enfermedad la presencia de un elevado número de macrófagos en la zona mencionada (Mulherin *et al.*, 1996). Además del conocido papel regulador de TGF- β en el proceso inflamatorio de la artritis reumatoide, se han detectado niveles más elevados de endogлина tanto en el endotelio como en macrófagos si los comparamos con los valores observados normalmente en el líquido sinovial (Szekanecz *et al.*, 1998). Este aumento está relacionado con la inflamación crónica y la angiogénesis, que se considera como un proceso clave en el desarrollo de la enfermedad (Maruotti *et al.*, 2006; Honsawek *et al.*, 2009).

2. Metaloproteasas

Las metaloproteasas de membrana (MMPs) son una familia de proteínas responsables principalmente de la ruptura de matriz extracelular (ECM). La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios característicos: i) un péptido señal que dirige la secreción al exterior de la célula; ii) un propéptido que mantiene a la enzima inactiva (zimógeno) hasta que se elimina por un corte proteolítico y iii) un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Se han descrito 28 genes distintos que codifican diferentes MMPs. Las MMPs se clasificaron en un primer momento en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas, etc.), aunque actualmente se tiende a la clasificación en función de la estructura de la metaloproteasa (Verma y Hansch, 2007). Como familia de proteínas, las MMPs son capaces de degradar todo tipo de componentes de matriz extracelular y están relacionadas con muchos procesos de remodelado tisular y desarrollo (Bode, 2003). Su actividad está regulada por numerosas moléculas endógenas como los inhibidores de tejido (TIMPs) e inhibidores plasmáticos como la macroglobulina α_2 . Además, existe una regulación a nivel transcripcional y modificaciones post-transcripcionales/traduccionales (estabilización de ARNm, glicosilaciones, etc.) que se activan en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento, agentes químicos e interacciones con la matriz extracelular. El desequilibrio entre la expresión de MMPs y

sus correspondientes inhibidores se relaciona con diversos estados patológicos entre los que destacan la aterosclerosis, la artritis reumatoide, la fibrosis y el cáncer (Yoon *et al.*, 2003).

2.1 Metaloproteasa de matriz 12 (MMP12)

MMP12, también conocida como elastasa de macrófagos, se identificó por primera vez como una metaloproteasa elastolítica secretada por macrófagos pro-inflamatorios humanos (Banda y Werb, 1981). Al igual que otras MMPs, es una endopeptidasa dependiente de zinc. Se secreta como una forma inactiva de 54 kDa que sufre un proceso autocatalítico de activación que genera varias formas activas del enzima (Shapiro *et al.*, 1993). Además de la mencionada actividad elastolítica, se ha descrito su capacidad para degradar un amplio espectro de componentes de matriz extracelular incluyendo colágeno IV, fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos o condroitin sulfato (Gronski *et al.*, 1997). Otra importante función catalítica de MMP12 es la activación de otras metaloproteasas (MMP2 y MMP3) que en última instancia pueden exacerbar la cascada proteolítica (Matsumoto *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista de las subpoblaciones de macrófagos, MMP12 se considera como un marcador de fenotipo pro-inflamatorio (M1) y su expresión está fuertemente inducida por la citoquina GM-CSF (de las Casas-Engel *et al.*, 2013). La presencia de MMP12 se ha relacionado con enfermedades asociadas a procesos inflamatorios como la aterosclerosis, artritis reumatoide o psoriasis, aunque la mayoría de los ensayos se han centrado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Suomela *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2011; Chaudhuri *et al.*, 2012).

3. Estructura de proteínas

La función de una proteína está íntimamente ligada a la estructura que evolutivamente ha ido adquiriendo siguiendo criterios de eficacia funcional y estabilidad dentro del sistema biológico. Su forma de actuar y relacionarse con el

proteoma se asume en función de la orientación y plegamiento de sus aminoácidos. Por lo tanto, la organización de los aminoácidos en el espacio determinará en gran medida las funciones asociadas a la misma. En este sentido, las características del enlace peptídico entre aminoácidos y la naturaleza de las cadenas laterales que conforman la secuencia de la proteína marcarán las pautas de una forma de ordenación espacial secundaria determinada (Ramachandran *et al.*, 1963).

Además de la información funcional, las técnicas estructurales aportan información sobre la capacidad de interacción con otras proteínas, plegamiento y la dinámica (flexibilidad). Por este motivo, la determinación tridimensional de distintas macromoléculas ha sido una de las herramientas más utilizadas en el desarrollo y diseño de fármacos (Pitt *et al.*, 2013). A pesar de existir otras técnicas como el dicroísmo circular o la predicción de estructura secundaria por análisis bioinformático, casi la totalidad de las estructuras proteicas disponibles en el PDB (*Protein DataBank*) se han obtenido utilizando cristalografía de rayos X (90%), resonancia magnética nuclear (9%) y microscopía electrónica (1%) (<http://www.rcsb.org>). Es importante destacar que las técnicas de resolución estructural no son excluyentes entre sí, puesto que la información obtenida con cualquiera de ellas puede servir de modelo a las otras para obtener estructuras más complejas y con una mejor resolución.



Figura 6. Características generales de las técnicas estructurales más habituales. El tamaño de la proteína, la solubilidad, las características físico-químicas, el objetivo del estudio o la cantidad de proteína disponible son los parámetros más habituales a tener en cuenta a la hora de seleccionar la técnica más adecuada.

3.1 Microscopía electrónica

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una técnica estructural que se ha utilizado durante muchos años para observar la ultraestructura de las células. Sin embargo, durante la última década, las mejoras desde un punto de vista metodológico y sobre todo técnico, han contribuido a su adaptación al análisis de proteínas (Llorca, 2005). La utilización de mejores microscopios, algoritmos y plataformas de software más complejas y sobre todo una mayor potencia de los ordenadores, han permitido aumentar de forma exponencial el número de estructuras resueltas mediante esta técnica en el banco de datos de proteínas PDB.

La proteína de interés debe ser pura y homogénea puesto que la determinación se realiza asumiendo la totalidad de las imágenes adquiridas. Para obtener dichas imágenes la proteína es adsorbida en unas rejillas especiales y teñida con una tinción negativa (acetato de uranilo, formiato de uranilo, etc) lo que hará a la muestra más resistente y reactiva al haz incidente de electrones. Las moléculas se identifican sobre el ruido de fondo y se toman imágenes (del orden de cientos) que son posteriormente escaneadas y procesadas para asignar a cada una de ellas el denominado ángulo de proyección (Baumeister y Steven, 2000). La asignación de ángulo realizada por refinamiento angular es un proceso iterativo en el que los resultados obtenidos en las sucesivas asignaciones sirven de modelo para las siguientes rondas. De esta forma a partir de las imágenes en 2D que se obtienen inicialmente se puede generar un volumen tridimensional muy preciso de la proteína adsorbida en la rejilla (van Heel *et al.*, 2000).

3.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es una técnica ampliamente utilizada para la resolución estructural de péptidos y proteínas de pequeño tamaño. Se fundamenta en el espín nuclear que tienen intrínsecamente algunos átomos y su reactividad a la radiofrecuencia cuando son excitados dentro de un campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al

campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia (Kennedy *et al.*, 2002). La mayor ventaja de la técnica es el análisis de proteínas en solución frente a la determinación estática intrínseca a la cristalografía. Esto permite ver la respuesta a las posibles variaciones que se pueden introducir en el entorno de la proteína en solución (temperatura/estabilidad, disolvente/plegamiento, pH/pKas o ligandos/reconocimiento) (Prestegard *et al.*, 2001). Por otra parte, la limitación más evidente es la baja sensibilidad, que se traduce en la necesidad de una gran cantidad de proteína para el análisis, largos tiempos de adquisición de espectros (días) y un rango modesto en lo que se refiere al tamaño de la proteína a analizar (no suele ser superior a 400 aminoácidos). Estos factores unidos al alto coste instrumental (equipo de RMN, marcaje de las muestras etc.) y a la dificultad del análisis de datos obtenidos refuerzan la necesidad en la complementariedad de las técnicas de resolución estructural de proteínas (Yee *et al.*, 2005).

3.3 Cristalografía de rayos X

El fundamento de esta técnica de resolución estructural se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X. Podemos definir el material cristalino o cristal como un material sólido cuyos elementos constitutivos (átomos, iones, moléculas) se repiten de manera paralela y ordenada y cuya distribución en el espacio cumple ciertas condiciones de simetría. A este conjunto mínimo, que repetido en las tres direcciones genera todo el cristal, se le denomina celda unidad.

Para obtener un cristal de la proteína de la cual queremos determinar su estructura es necesario partir de una gran cantidad de muestra que sea homogénea y con un alto grado de pureza. Las condiciones de cristalización pueden ser tantas como proteínas se quieran analizar. Dependen, entre otros, de factores tales como la concentración inicial, la solubilidad de la proteína, los agentes precipitantes utilizados (sales, disolventes, PEG, etc.), el pH, la temperatura o los aditivos necesarios para la formación del cristal (iones metálicos, inhibidores, agentes reductores, etc.).

Actualmente existe la posibilidad de realizar cribados masivos para encontrar la condición óptima de cristalización. Aún así no siempre es posible la obtención de un cristal de la proteína.

Una vez obtenido el cristal se somete a un haz de rayos X cuya longitud de onda es inferior al tamaño de la muestra. El espectro o patrón de difracción obtenido por la desviación de los rayos del haz es exclusivo y característico de la proteína cristalizada. Su posterior análisis permite generar un mapa de densidad electrónica con el que en última instancia se conseguirá el modelo tridimensional de la proteína. La calidad del cristal y la potencia de la fuente emisora de rayos X determinan en gran medida la resolución de la estructura tridimensional obtenida.

3.4 Estructura y características bioquímicas de endoglina

La endoglina humana es una proteína transmembrana homodimérica cuya estructura primaria consta de 658 aminoácidos. En su secuencia, los primeros 25 residuos constituyen el péptido señal rico en leucinas que dirige la proteína a través del retículo endoplasmático y aparato de Golgi hasta la membrana plasmática, donde finalmente es eliminado. La forma anclada a membrana está formada por un dominio extracelular de 561 aminoácidos (aa), una región transmembrana de 25 aa y un dominio intracelular rico en Ser-Thr, que en su forma mayoritaria (isoforma larga), posee 47 residuos (Gougos y Letarte, 1990). Desde el punto de vista estructural, endoglina pertenece a la familia de proteínas ZP (Zona Pelúcida), compartiendo un dominio yuxtamembrana de 260 aa que posee 8 cisteínas altamente conservadas (Jovine *et al.*, 2002; Llorca *et al.*, 2007; Plaza *et al.*, 2010). En el caso de endoglina, este motivo característico se localiza en la región Lys362-Asp561 de su ectodominio. Se especula con que precisamente este dominio conservado está directamente relacionado con la interacción de endoglina con T β RI y T β RII (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005). Es importante resaltar que endoglina es una proteína altamente glicosilada,

como es predecible por sus potenciales residuos de N-glicosilación en Asn88, Asn102, Asn121, Asn134 y Asn307 (Gougos y Letarte, 1990).

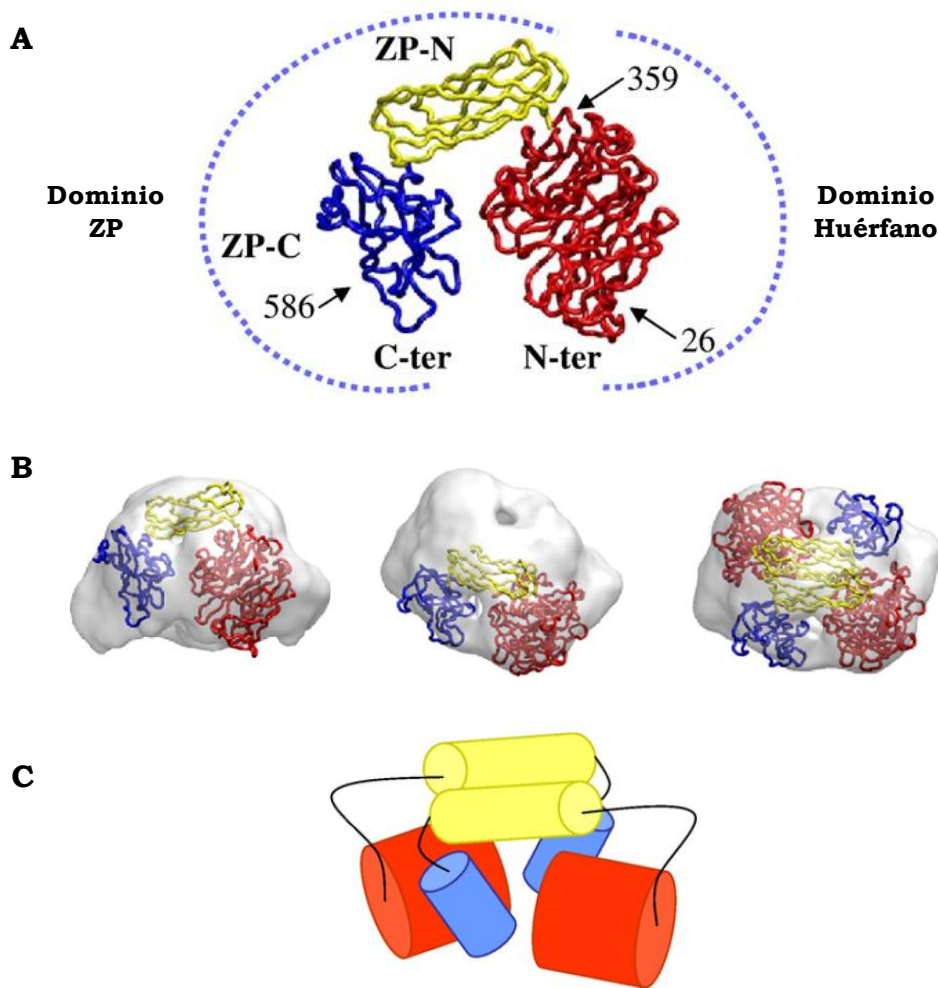


Figura 7. Modelo tridimensional del dominio extracelular de endoglina A. En la figura se indica el número de aminoácido que corresponde a los puntos de división de los fragmentos globulares. La molécula se ha coloreado de acuerdo a los tres tipos de dominios sugeridos en el modelo. El dominio huérfano está comprendido entre los residuos Glu26–Ile359 (rojo), mientras que el dominio ZP formado por los dos subdominios carboxilo y amino, Gln360–Gly586 de endoglina, están coloreados en amarillo y azul respectivamente. **B.** Modelo esquemático de la ordenación de los dominios en el espacio encajándolo en el mapa de densidad electrónica de EndoEC. **C.** Dibujo de la ordenación de los dominios de endoglina en forma dimérica (Adaptado de Llorca y cols, 2007)

La estructura tridimensional a baja resolución (25Å) del dominio extracelular de endoglina, obtenida mediante microscopía electrónica de partículas individuales, muestra una estructura en forma de cúpula con sus monómeros orientados de forma anti-paralela incluyendo una cavidad en un extremo. Cada una de las dos

subunidades que la forman está integrada por tres sub-dominios bien diferenciados. Dos de ellos corresponden al motivo ZP, (ZP-C y ZP-N); denominados así por su proximidad al extremo carboxi o amino-terminal, respectivamente. La tercera región que forma el monómero no posee homología significativa con ningún motivo o proteína descrita hasta la fecha y es por ello que se le ha denominado "motivo huérfano" u *Orphan Domain* (OD) (Llorca *et al.*, 2007) (Fig. 7). Se ha determinado la estructura en solución del dominio huérfano mediante dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS) y programas de modelado estructural *de novo* (Van Le *et al.*, 2009). En este estudio el dominio OD se muestra como una proteína monomérica, compacta y con plegamiento propio de un tamaño aproximado de 40kDa (Alt *et al.*, 2012). Además, se ha establecido recientemente que el dominio huérfano *per se* es capaz de formar complejo con BMP9, un miembro de la superfamilia de TGF- β (Castonguay *et al.*, 2011; Alt *et al.*, 2012). Hasta la fecha no se ha resuelto la estructura a alta resolución del dominio extracelular de endoglina. Del mismo modo, se desconoce la estructura del dominio citoplasmático en las dos isoformas descritas de la proteína (EngL y EngS).

4. Proteómica

La proteómica es la disciplina que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo. En un momento dado, y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, se denomina a ese conjunto de biomoléculas como proteoma (Bjellqvist *et al.*, 1982). Las proteínas son las moléculas que actúan, junto a otras, como efectores finales de los procesos que tienen lugar en las células, por lo que el estudio proteómico resulta idóneo para el análisis de los mecanismos biológicos que ocurren en un organismo, así como para comprender las bases moleculares subyacentes a dichos procesos. De forma general, se podría afirmar que la proteómica es una aproximación más fiel a la realidad que la genómica (o la transcriptómica). Los niveles de transcripción de un determinado gen nos proporcionan una estimación de su expresión última en forma de proteína (Gygi *et al.*, 1999). Sin embargo, una gran

cantidad de ARNm de partida puede ser degradado o traducido de forma ineficiente y, a pesar de que los arrays de splicing pueden abordar esos cambios a nivel genómico, el abordaje proteómico proporciona una imagen más real de los niveles de expresión finales. Además, existen un gran número de modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, metilaciones, glicosilaciones) que afectan de forma directa a la funcionalidad de la proteína, modificaciones que se han comenzado a analizar recientemente mediante técnicas proteómicas (Eberl *et al.*, 2011; Altelaar *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013). Por último, los mecanismos de degradación proteica tienen un papel importante en la composición final del proteoma, y no son tenidos tan en cuenta en el abordaje genómico o transcriptómico (Belle *et al.*, 2006). Otra de las principales ventajas de la proteómica radica en que no se realiza una pre-selección de candidatos a estudiar, sino que se trata de un abordaje global, lo cual permite estudiar el proteoma en conjunto. Por otra parte, el análisis proteómico también presenta sus desventajas frente al análisis genómico. De forma general, sus mayores limitaciones son la sensibilidad y la reproducibilidad. Estos dos parámetros, junto a determinadas modificaciones postraduccionales, unidos a la vida media de las proteínas sujetas al estudio, explican las diferencias que se observan siempre entre una aproximación a nivel de ARN mensajero y una a nivel de proteína.

El análisis del proteoma de un organismo se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante separación de las proteínas por electroforesis bidimensional en gel (2-DE) y posterior identificación de las mismas por espectrometría de masas (MS) (Rabilloud *et al.*, 1998). Este tipo de estudios proteómicos se conocen en la actualidad como Proteómica Clásica (Andersen y Mann, 2000). La aparición del método de ionización por electrospray (ESI), que permite realizar la identificación de proteínas por MS en línea y de forma inmediata tras su separación por cromatografía líquida (LC-MS), ha abierto un nuevo campo dentro de la disciplina que se conoce como Proteómica de Segunda Generación (Fenn *et al.*, 1989). Esta rama de la proteómica permite realizar identificaciones a gran escala de las proteínas presentes en una mezcla y su creciente desarrollo ha dado lugar a la descripción de multitud de proteomas que no se

conocían hasta el momento. Por este motivo, se deben considerar ambas técnicas como complementarias.

4.1 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos, llamados espectrómetros de masas, que pueden medir la relación masa/carga (m/z) de iones en fase gaseosa, trabajando en condiciones de vacío. A finales de los 90 se desarrollaron dos técnicas de ionización que permitieron realizar análisis de proteínas y péptidos, entre otras biomoléculas, por MS. La primera de ellas es la denominada ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI)(Karas y Hillenkamp, 1988). La segunda de ellas es la ionización por electroespray (*ElectroSpray Ionization*, ESI), desarrollada por Fenn y colaboradores (Fenn *et al.*, 1989).

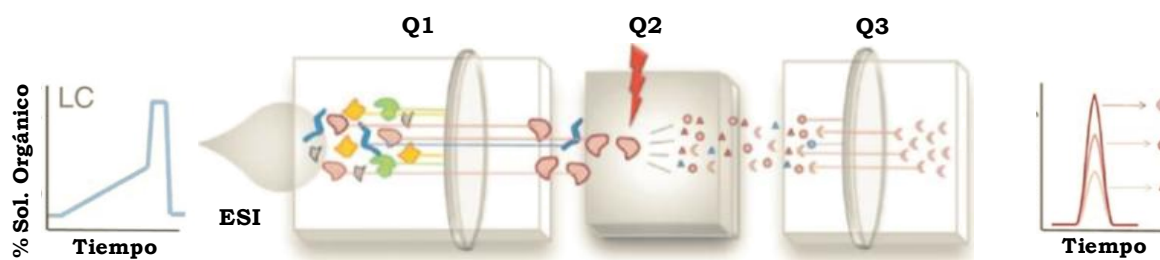


Figura 8. Modelo esquemático de los componentes y funcionamiento de un triple cuadrupolo (QQQ). El cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 3 (Q3) funcionan como dos analizadores conectados en serie. El cuadrupolo 2 (Q2), o celda de colisión, se sitúa entre Q1 y Q3. Q2 es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía de colisión (CE), que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización (ESI).

Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos, que en orden secuencial de actuación en un análisis son: i) fuente de ionización (MALDI, ESI); ii) analizador de masas (Q, TOF, trampa iónica, etc.) y iii) detector. La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, donde son separadas según su relación masa/carga (Fig. 8). Las señales llegan de manera secuencial al detector, donde son captadas e integradas por

un sistema informático que genera los correspondientes espectros de masas, donde se representan la abundancia (intensidad) de los iones en el eje de ordenadas y la relación m/z en abscisas (Fig. 8). Por comparación con los espectros recogidos en las bases de datos, y empleando los motores de búsqueda adecuados (Mascot), se procede a la identificación de las proteínas.

4.2 Marcaje estable con isótopos no radiactivos de células en cultivo (SILAC)

Una herramienta que se utiliza cada vez más en la comparación de los proteomas de dos muestras diferentes es el denominado SILAC (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*). En esta técnica, dos poblaciones celulares se cultivan en medios idénticos, con la salvedad de que uno de los medios contiene aminoácidos esenciales marcados con isótopos pesados no radioactivos (por ejemplo, Lisina con $^{13}\text{C}_6$ o $^{15}\text{N}_2$). Al encontrar en el medio únicamente esa forma "pesada" del aminoácido las proteínas de nueva síntesis lo incorporarán forzosamente a su proteoma (Ong *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2003). Al llegar a un número determinado de divisiones, las células han incorporado (reemplazado) cerca del 100% de la forma pesada del aminoácido. Las propiedades químicas de los compuestos marcados con los isótopos estables son idénticas a las de sus homólogos no marcados. Además, el sistema de marcaje en el cultivo no tiene efectos en el crecimiento, morfología o actividad biológica de las células y no necesita de pasos adicionales de purificación para eliminar el exceso de agente marcador (aminoácido pesado) (Ong *et al.*, 2002). La única diferencia que se puede observar entre ambas poblaciones (pesada/ligera) es la masa resultante de los péptidos sometidos al análisis por espectrometría. Al analizar los espectros obtenidos de ambos proteomas se puede ver la abundancia relativa de sus péptidos correspondientes y establecer así las diferencias de expresión de proteínas entre las poblaciones celulares sometidas al estudio. Recientemente, se ha comenzado a utilizar el marcaje no radioactivo también en tejidos tumorales (Geiger *et al.*, 2010) o directamente en animales (Kruger *et al.*, 2008).

5. El sistema inmune

La función esencial del sistema inmunitario es proteger al organismo de agentes infecciosos y microorganismos presentes en el ambiente. Para ser eficaz, el sistema inmunitario debe ser capaz de defenderse de una gran variedad de agresiones, y, sobre todo, distinguirlas de las células y tejidos del propio organismo. En vertebrados, en este sistema de defensa colaboran el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo (Medzhitov y Janeway, 1998). El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa que limita la infección tras la exposición a microorganismos. Proporciona una respuesta rápida e inespecífica, pues reconoce y responde a los patógenos de forma genérica y sin conferir inmunidad duradera contra ellos (Hoffmann *et al.*, 1999). Esta primera barrera defensiva incluye componentes celulares (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células NK), moléculas del sistema del complemento y citoquinas. La superficie de estas células presenta receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP). El sistema inmunitario innato es capaz de activarse únicamente frente a estas “señales de peligro” detectadas por los PRR de forma específica (Gallucci y Matzinger, 2001). El sistema inmunitario adaptativo, en cambio, genera respuestas antígeno-específicas y confiere memoria inmunológica tras el primer contacto con el antígeno. Esta respuesta está mediada por componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos). Las células presentadoras de antígeno (APC), y en especial células dendríticas y macrófagos, juegan un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto de las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) presentes en su superficie (Medzhitov y Janeway, 1998). En consecuencia, el sistema de defensa innato tiene como segunda función estimular y dirigir la respuesta inmunitaria adaptativa con objeto de optimizar la eliminación del patógeno y minimizar los daños tisulares colaterales (Medzhitov, 2007).

La inmensa mayoría de la variedad celular que compone y realiza la respuesta inmunitaria deriva de las células madre hematopoyéticas (HSC) (Abramson *et al.*, 1977). Las HSC se renuevan a sí mismas y dan lugar a células progenitoras mieloides (CMP) y linfoides (CLP), con potencial más limitado, que a su vez darán origen a granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos (Akashi *et al.*, 2000; Wilson y Trumpp, 2006), o linfocitos B y T, y células NK, respectivamente (Kondo *et al.*, 1997).

5.1 Inflamación

La inflamación es un proceso biológico que se desencadena en respuesta a una infección microbiana o una lesión tisular (Nathan, 2002). Se desarrolla en tejidos conectivos vascularizados y presenta una sintomatología clara en forma de dolor, enrojecimiento, rigidez o pérdida de movilidad, hinchazón y calor en la zona afectada.

El proceso está orquestado por varios tipos celulares, entre los que destacan los mastocitos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos. La respuesta a la agresión implica, además de un gran gasto de energía, un daño en los tejidos afectados. Es por eso que la idoneidad de dicho proceso está estrechamente ligada a la velocidad y efectividad de la respuesta, mitigando así el daño asociado a la misma. Independientemente del agente desencadenante, el propósito último de la inflamación es eliminar la fuente que causa el desequilibrio y recuperar las condiciones homeostáticas basales. Si, por el contrario, las condiciones anormales se prolongan, entonces la respuesta se mantiene dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica (Medzhitov, 2008). Esto puede ocurrir debido a que no se resuelva la inflamación aguda o que no se elimine el agente causal. En estos casos, la respuesta inflamatoria puede causar más daño que la agresión desencadenante de la propia respuesta (Nathan, 2002).

De forma general, la respuesta inflamatoria iniciada por infección o agresión a tejido coordina la liberación de distintos componentes (plasma y leucocitos) al punto de agresión (Barton, 2008). Esta respuesta se ha descrito principalmente en infecciones

microbianas que activan receptores del sistema inmune innato, tales como los TLRs (*Toll-Like Receptors*) o NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein*) Like Receptors (NLRs). Este estadio inicial de reconocimiento de la infección esta mediado por macrófagos residentes de tejido y mastocitos que liberan mediadores inflamatorios como quimioquinas, citoquinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas (Hansson *et al.*, 2002). El efecto mayoritario e inmediato de estos mediadores es provocar un "exudado inflamatorio" local que permita a proteínas plasmáticas y células habitualmente restringidas al torrente circulatorio (neutrófilos y monocitos) actuar en el foco inflamatorio. El endotelio activado de los vasos sanguíneos permite un paso selectivo de neutrófilos a la vez que impide la salida de eritrocitos. La selectividad del proceso se coordina gracias a las integrinas, selectinas y receptores específicos presentes en las células endoteliales y los leucocitos (Ley *et al.*, 2007; Pober y Sessa, 2007). Recientemente, se ha identificado endoglina como una de las proteínas de superficie que colaboran junto a las integrinas en la adhesión y extravasación de leucocitos al foco inflamatorio (Tian *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2013). Además, durante el proceso inflamatorio la expresión de endoglina está fuertemente aumentada en relación a su estado quiescente y se relaciona directamente con el infiltrado y las células inflamatorias (células T) (Torsney *et al.*, 2002). Cuando llegan al tejido comprometido, los neutrófilos se activan por contacto con el agente patógeno y por la acción de citoquinas secretadas por células residentes del tejido (principalmente macrófagos). Estos neutrófilos realizan su función liberando el contenido de sus gránulos, los cuales incluyen ROS, especies reactivas de nitrógeno (RNS), proteinasa 3, catepsina-G y elastasas (Nathan, 2006). Estos potentes efectores no discriminan entre el patógeno a eliminar y el huésped por lo que los daños colaterales en el tejido son inevitables (Nathan, 2002). La eficiencia de la respuesta inflamatoria aguda se mide por la fase de eliminación de la agresión, la fase de resolución y la fase de reparación. En estos tres estadios la participación tanto de los macrófagos de tejido como de los reclutados por el proceso tiene una función primordial (Serhan y Savill, 2005).

5.2 Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas mononucleares de origen monocítico involucradas en un gran número de funciones dentro del sistema inmunitario. Los monocitos, a su vez, se originan en la médula ósea a partir de un precursor mieloide y se liberan posteriormente al torrente sanguíneo, donde constituyen un 10% de los leucocitos circulantes en humanos (Gordon y Taylor, 2005). Los monocitos de sangre periférica tienen una vida media relativamente corta (24-72 horas), y contribuyen a la renovación de los macrófagos y células dendríticas tisulares (Tacke y Randolph, 2006). Los macrófagos juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmunitaria, debido a que actúan como primera barrera de defensa, al detectar y eliminar partículas ajenas al organismo (macromoléculas tóxicas, células propias dañadas o muertas, microorganismos, etc.) mediante fagocitosis o secreción de enzimas, citoquinas o producción ROS y RNS (Sica *et al.*, 2008).

En presencia de un estímulo mitogénico los macrófagos tienen cierta capacidad proliferativa pero, a diferencia de otras células del sistema inmunitario, las citoquinas, microbios u otros agentes pro-inflamatorios detienen dicha proliferación e inducen la activación del macrófago que desarrollará sus actividades funcionales específicas (Frantz *et al.*, 2005). Por el contrario, en ausencia de los estímulos mencionados, el macrófago entra en un estado de quiescencia en el que se mantiene durante un corto período de tiempo antes de inducir su muerte por apoptosis. De esta forma, contribuye a la homeostasis de las células efectoras en el organismo (Celada y Nathan, 1994; Xaus *et al.*, 2001).

Durante la respuesta inmunitaria adaptativa los macrófagos presentan antígenos a los linfocitos T en el contexto de MHC-II y/o MHC-I, y colaboran con la respuesta humoral en la eliminación de agentes extraños (Biswas *et al.*, 2008). Además, los macrófagos tienen un papel importante en procesos de reparación de heridas y resolución de la inflamación, promoviendo el reclutamiento de otras células inflamatorias hacia los focos de la agresión, así como la remodelación de matriz extracelular y angiogénesis. En consecuencia, el término “macrófago” agrupa una multiplicidad de células cuya

finalidad es el mantenimiento de la homeostasis y la integridad tisular (Fleetwood *et al.*, 2007). En lo referente a endoglina, ésta no se expresa en monocitos circulantes de sangre periférica pero sí es capaz de detectarse tanto nivel de ARN mensajero como de proteína en la membrana cuando se diferencian a macrófagos. Este efecto se observa también en líneas monocíticas modelo (U937, HL-60) después de inducir su diferenciación con ésteres de forbol (PMA) (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992).

5.3 Polarización de macrófagos

Se han descrito una gran variedad de subpoblaciones de macrófagos en función de sus marcadores de superficie (Gordon y Taylor, 2005). Cada vez es más evidente su heterogeneidad y plasticidad debido a factores tan variables como el microambiente tisular, la matriz extracelular, los productos de secreción, moléculas de superficie de las células próximas, además de citoquinas y quimioquinas reguladoras (Akagawa, 2002). De forma general, se puede clasificar a los macrófagos en función de su estado de activación/fenotipo en: i) macrófagos M1, implicados en inflamación y en respuesta a patógenos; y ii) macrófagos M2, con una función anti-inflamatoria y asociada a la reparación de tejido. También se suele denominar a estos estados como derivados de la "activación clásica" o la "activación alternativa", respectivamente (Hamilton y Tak, 2009). Debido a la mencionada heterogeneidad, cuando se habla de diferenciación en estas células, se utiliza el término polarización.

Algunas de las principales citoquinas que determinan la supervivencia, diferenciación (polarización) y quimiotaxis de los macrófagos son GM-CSF, M-CSF e IL-3 (Campbell *et al.*, 2000; Biswas *et al.*, 2006). El M-CSF (*Macrophage-Colony Stimulation Factor*) es una citoquina sintetizada constitutivamente por macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y células del estroma, entre otras (Hanamura *et al.*, 1988). Además de en la polarización, M-CSF tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario del linaje mieloide, puesto que ratones deficientes en M-CSF muestran un número de macrófagos reducido (Wiktor-Jedrzejczak *et al.*, 1990). El GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulation Factor*), por su parte, es secretado por diferentes tipos

celulares, incluyendo neutrófilos, mastocitos, macrófagos, linfocitos T y B, eosinófilos y células endoteliales (Campbell *et al.*, 2000). Su función efectora promueve viabilidad, proliferación y maduración de precursores de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, y sus funciones dependen de su concentración, ya que los efectos en viabilidad celular requieren menores concentraciones que las precisas para afectar a la proliferación celular (Conti y Gessani, 2008).

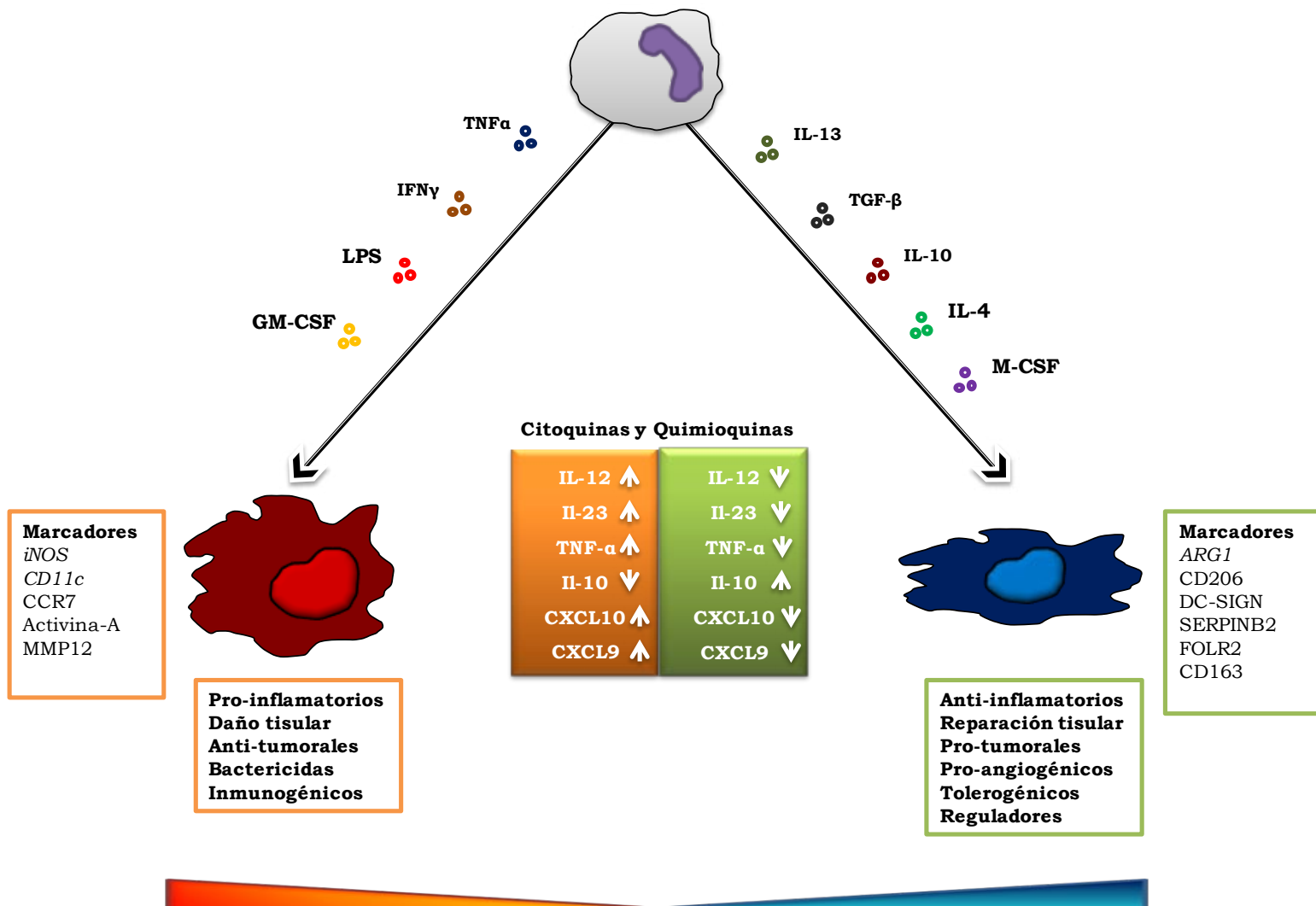


Figura 9. Modelo simplificado de polarización de macrófagos. En función del estímulo recibido un monocito circulante polariza hacia un fenotipo determinado. Citoquinas como el TNF α o el GM-CSF y estímulos como el LPS tienen un efecto pro-inflamatorio y dan lugar a un macrófago M1, caracterizado por marcadores como el aumento de iNOS, Activina-A o MMP12. Por el contrario estímulos como IL-10, TGF- β o M-CSF dirigen al macrófago a un fenotipo M2. Éste se identifica por niveles elevados de ARG1, FOLR2 o SERPINB2. Las funciones de ambas poblaciones son, en ocasiones, opuestas pudiendo tener un efecto pro- o anti-inflamatorio, angiogénico o bactericida en función del fenotipo adquirido.

Debido a su capacidad de polarización, estas citoquinas (GM- y M-CSF) son ampliamente utilizadas para la generación *in vitro* de macrófagos humanos derivados de monocitos (MDM) y realizar posteriores estudios de la transición/diferenciación monocito-macrófago. Los macrófagos obtenidos se consideran equivalentes a los macrófagos residentes en los tejidos en condiciones homeostáticas (Akagawa, 2002). En presencia de GM-CSF los macrófagos se adhieren a la superficie de cultivo y adoptan una morfología redondeada, mostrando mayor de expresión de HLA-DQ y HLA-DR (Verreck *et al.*, 2006). Además, presentan un perfil de producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-23, IL-12, IL-1 β , IL-6, TNF α) (Verreck *et al.*, 2004) y en respuesta a *Mycobacterium spp* promueven inmunidad de tipo Th1 (pro-Th1). Por su parte, los macrófagos generados en presencia de M-CSF tienen una morfología más alargada y muestran marcadores distintos (CD14, M-CSFR y el receptor *scavenger* CD163). Estos macrófagos (M-CSF), secretan IL-10 en respuesta a estímulos externos, inhiben respuestas Th1, y están implicados en la inducción de tolerancia (Li *et al.*, 2005), además de modular la autoinmunidad e inhibir la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17 (Weber *et al.*, 2007). Respecto a la expresión de PRR, ambos tipos de macrófagos (GM y M-CSF) expresan niveles similares de TLR2 y TLR4. Con todos estos datos, se puede establecer la relación GM-CSF/Macrófagos M1/Pro-inflamatorios en contraposición a M-CSF/Macrófagos M2/Anti-inflamatorios.

En cuanto a la función desarrollada por ambas subpoblaciones, los macrófagos M2 tienen mayor actividad fagocítica mediada por receptores Fc γ (Kiefer *et al.*, 1998), asociado a una mayor producción de H₂O₂ (Komuro *et al.*, 2001). Además, presentan mejor respuesta fungicida debida a la mayor producción de ROS (Akagawa *et al.*, 2006). Por su parte, los macrófagos M1 tienen mayor capacidad de presentación de antígenos (Verreck *et al.*, 2006). Por último, otra diferencia en el fenotipo de ambas variantes radica en la secreción de quimioquinas. Los macrófagos M2 sólo son capaces de producir CCL18 tras la estimulación y secretan constitutivamente CCL2 (MCP-1). A pesar de que los macrófagos M2 producen niveles bajos de citoquinas pro-inflamatorias y altos niveles de IL-10 tras su estimulación, son capaces de secretar

quimioquinas atrayentes de otros tipos celulares (neutrófilos, monocitos y linfocitos T), potenciando así su fenotipo anti-inflamatorio. Los macrófagos M1 son capaces de secretar CCL22 (MDC), CCL17 (TARC) y CCL18 tanto constitutivamente como después de ser estimulados. Dentro de las quimioquinas compartidas, además de la mencionada CCL18, ambos tipos de macrófagos son capaces de secretar CXCL10, CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) y CCL5 (RANTES) tras la estimulación con LPS (Verreck *et al.*, 2006).

En este contexto, el papel de endoglina en las distintas poblaciones de macrófagos es desconocido. A pesar de que endoglina se expresa durante el proceso general de diferenciación de monocito a macrófago (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992), por el momento no se han descrito diferencias de expresión de endoglina en las diferentes subpoblaciones de macrófagos. Del mismo modo, la implicación que podrían tener las isoformas de endoglina en el proceso de polarización hacia un fenotipo M1 o M2 está todavía por elucidar.

5.4 Inmunosenescencia

La inmunosenescencia puede definirse como una disminución progresiva de la respuesta inmune que con el tiempo afecta a los componentes del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo (Pfister y Savino, 2008). Este deterioro puede contribuir de manera importante a la morbilidad y mortalidad de los adultos mayores, puesto que favorece una mayor incidencia y/o reactivación de enfermedades infecciosas, así como el desarrollo de enfermedades autoinmunes y cáncer (DelaRosa *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que la desregulación del ajuste alternativo puede influir en el cambio de la expresión génica asociada a la inmunosenescencia (Harries *et al.*, 2011).

El sistema inmune innato está compuesto de una red de células que incluyen monocitos-macrófagos, neutrófilos, células NK y NKT y células dendríticas. Los defectos funcionales asociados a la primera respuesta ante patógenos de estas células se hace patente dentro del proceso de envejecimiento, comprometiendo entre otros a

los *Toll like receptors* (TLR). Sin embargo, el envejecimiento se caracteriza también por un ambiente pro-inflamatorio (*inflam-aging*) con una débil, aunque constante activación del sistema inmune que puede derivar en daño tisular. Por este motivo, se considera a la inmunosenescencia como un proceso en el que se suman tanto una respuesta atenuada o incompleta como una desregulación de los sistemas celulares de defensa. Un ejemplo de lo mencionado es la distinta respuesta observada en un modelo murino de infección por influenza. Los ratones C57BL/6 de edad avanzada presentaban mayor duración de la viremia, morbilidad prolongada y una recuperación más lenta que sus homólogos más jóvenes. Esta respuesta a la infección se asoció a un amplio espectro de respuestas, como el retardo en la infiltración de granulocitos y células dendríticas o la mayor persistencia de macrófagos en pulmones. La producción de componentes pro-inflamatorios tales como la IL-12 o el MCP-1 estaba disminuida en ratones envejecidos. La producción de IL-6 fue más tardía pero, en cambio, los niveles de TNF- α e IL-1 fueron más elevados (Toapanta y Ross, 2009). Por esta razón se considera que en edades avanzadas se dan de forma simultánea una respuesta incompleta y una exacerbada. Las células del sistema inmune derivan de las células madre hematopoyéticas (HSCs) que proliferan y se diferencian para dar lugar indistintamente al linaje mieloide o linfoide. Con el envejecimiento se observa una inclinación hacia los progenitores mieloides en detrimento de los linfoides (Beerman *et al.*, 2010).

En lo que se refiere a la respuesta inmune adaptativa, la mayoría de estudios sobre envejecimiento se centran en los linfocitos B y T, puesto que son los que mejor definen las características de especificidad y memoria asociadas a este tipo de respuesta (Sansoni *et al.*, 2008; Caruso *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2010). En este sentido, se observa un mayor impacto en los procesos de respuesta relacionados a la población de linfocitos T. La involución tímica que se inicia en la pubertad tiene como consecuencia la disminución progresiva en el número de células. Asimismo, se ha reportado que con el tiempo estas células presentan también numerosos defectos funcionales, incluyendo acortamiento de telómeros, repertorio de receptor de células T (TCR) restringido, poca

producción de IL-2 y deficiencias en su diferenciación y proliferación hacia células efectoras, lo que conlleva a una disminución de su capacidad para mediar de manera efectiva la respuesta inmune contra nuevos antígenos. Los defectos asociados a la respuesta humoral mediada por los linfocitos B, en cambio, se consideran como un efecto colateral de los defectos observados en la población de células T (Alonso-Fernandez y de la Fuente, 2008; Caruso *et al.*, 2009).

5.4.1 Monocitos y macrófagos

Los monocitos representan una fracción muy importante del sistema inmune innato dada su alta movilidad, su rapidez de respuesta a la inflamación y, al diferenciarse a macrófagos y células dendríticas, su acción como presentadores de antígeno. El número absoluto de monocitos aumenta con la edad independientemente de la debilidad en la salud del individuo (Della Bella *et al.*, 2007; Leng *et al.*, 2009). Este hecho contrasta con la pérdida de funcionalidad de los macrófagos, particularmente en el contexto de los TLR. Modelos de ratón envejecido (C57BL/6 y Balb/c) presentan una respuesta debilitada frente a LPS (TLR4) con una disminución de IL-6, TNF- α e IL-1 β (Boehmer *et al.*, 2004; Boehmer *et al.*, 2005; Chelvarajan *et al.*, 2005). Defectos similares se han observado en la transducción de señales y en un aumento del estrés oxidativo, tanto en macrófagos de ratones deficientes en telomerasa, como en ratones envejecidos (Sebastian *et al.*, 2009). Así mismo, estudios en humanos han revelado deficiencias asociadas a la edad en la secreción de citoquinas (IL-6 y TNF- α) en macrófagos (van Duin *et al.*, 2007b). También se han reportado deficiencias en el aumento de la proteína coestimuladora del CD80. Éste aumento mediado por TLR es crucial para el desarrollo de anticuerpos frente a la vacunación para influenza; lo que pone de manifiesto las consecuencias del envejecimiento de macrófagos sobre la inmunidad adaptativa (van Duin *et al.*, 2007a).

Por el contrario, otros estudios sugieren que el envejecimiento lleva asociado un estado crónico de pro-inflamación caracterizado por unos niveles basales elevados de TNF- α , IL-6 y reactantes de fase aguda (Franceschi *et al.*, 2007). Además, en modelos

de sepsis en ratón (Balb/c), tanto por inyección intraperitoneal de LPS como por ligación cecal, se ha observado una respuesta inflamatoria exacerbada caracterizada por el aumento observado en citoquinas, quimioquinas y producción/infiltrado de neutrófilos (Gomez *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2009; Turnbull *et al.*, 2009). Curiosamente, los ratones deficientes en el factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF), una citoquina relacionada con inflamación, señalización de insulina y regulación de ciclo celular, presentan un aumento significativo en su vida media (Grolleau-Julius *et al.*, 2008). Por tanto, es razonable afirmar que los efectos asociados a la edad observados *ex vivo*, en lo que se refiere a los defectos en producción de citoquinas por parte de los macrófagos, no son incompatibles con un entorno proinflamatorio, que resulta en unos niveles basales aumentados de citoquinas y quimioquinas

Todas las alteraciones mencionadas merman la capacidad del sistema inmunológico para hacer frente a los diversos agentes extraños y hace que los individuos de edad avanzada presenten una mayor susceptibilidad a desarrollar diferentes enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplasias.

Objetivos ---

“Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un determinado campo”.

— Niels Bhor.

II. OBJETIVOS

1. Estudiar la estructura tridimensional a alta resolución del tallo citoplasmático de las dos isoformas existentes de endoglina (EngL y EngS).
2. Analizar el papel de las isoformas de endoglina en el linaje mieloide y su posible implicación en la senescencia de los macrófagos.
3. Examinar la relación entre la liberación de endoglina soluble y la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M1 o M2.

Material & Métodos---

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”.

— Aristóteles.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Expresión, purificación y estructura

1.1 Síntesis y purificación de péptidos.

El péptido con la secuencia YIYSHTREYPRPPQ (PCit-S) corresponde al dominio intracelular de la forma corta de endoglina. Este péptido se sintetizó en colaboración con el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), utilizando un Sintetizador de péptidos (Perkin Elmer, Synergy). El aparato trabaja con química Fmoc y puede sintetizar péptidos de hasta 30 residuos en una única escala de 25 μ moles. Una vez obtenido, el péptido se analizó con un espectrómetro de masas de MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker) que permite determinar masas moleculares, la identificación de proteínas mediante su huella peptídica y la fragmentación de péptidos para conocer su secuencia. Se confirmó la masa esperada para el péptido (1806,03 Da). Con estos datos se procedió a la purificación del péptido utilizando Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna de fase reversa VALCO C18. El fundamento de la purificación reside en la polaridad de la molécula que se quiere aislar. Se diseñó un gradiente creciente de acetonitrilo con ácido trifluoroacético como par iónico previa inyección de una pequeña cantidad de la muestra (Fig. 10). Debido a que la muestra se necesitaba a una concentración mayor de la obtenida se procedió a la concentración por centrifugación en vacío utilizando un SpeedVac para solventes orgánicos.

Los péptidos correspondientes a regiones extracelulares de endoglina (destinados a los ensayos de actividad proteolítica) se diseñaron a partir de secuencias evolutivamente conservadas con acetilación en N-terminal y amidación en C-terminal (para favorecer su estabilidad y solubilidad). Se sintetizaron y purificaron hasta una pureza >90% (Biomedal SL, Sevilla). Los péptidos P583 (TSKGLVLP), P447 (SLSFQLGLYL) y P230 (GPRTVTVK), corresponden a las posiciones de endoglina humana 583-590, 447-456 y 230-237, respectivamente, y se disolvieron en agua destilada. Mientras que los

péptidos P583 y P447 presentan puntos potenciales de corte para metaloproteasas, el péptido P230 no presenta en su secuencia motivos susceptibles de ser cortados.

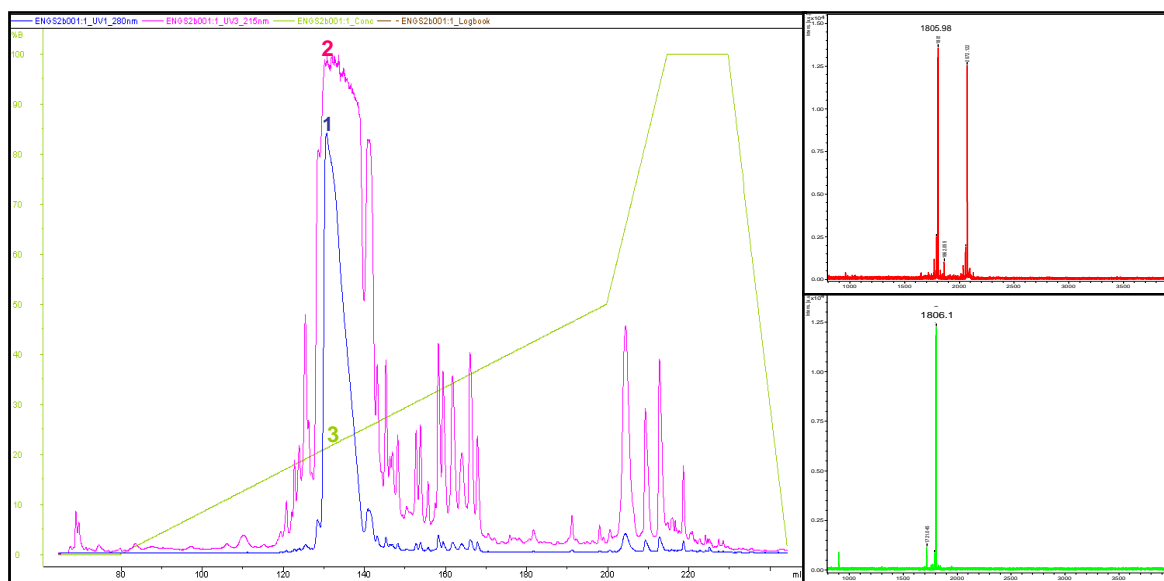


Figura 10. Purificación del péptido citoplasmático de EngS. A. Gradiente de polaridad (verde) y picos de absorbancia correspondientes a la elución de proteínas en la columna de fase reversa. La elución temprana indica alta solubilidad en solventes polares. **B.** Perfil del espectro de masas previo a la purificación (rojo) y la resultante tras el paso por la columna C18 (verde).

1.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los primeros ensayos de resonancia con el péptido purificado correspondiente al dominio citoplasmático de endoglina corta se realizaron en colaboración con el grupo de RMN del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) dirigido por el Dr. Javier Cañada.

Teniendo en cuenta el punto isoeléctrico del péptido correspondiente al dominio citoplasmático de endoglina corta (8,5), se decidió resuspender una de las alícuotas purificadas en 0,5 mL de un tampón fosfato a 50 mM (pH 6). Se añadió una décima parte de agua deuterada y la mitad del volumen se introdujo en un tubo de vidrio específico para un espectrómetro BRUKER que trabaja a una frecuencia de 600MHz. En una primera aproximación, además de comprobar la integridad del péptido y que su concentración era suficiente, se obtuvo un primer espectro monodimensional. Se

realizaron también espectros bidimensionales TOCSY y NOESY. En un espectro TOCSY se observan señales de correlación entre todos los protones de un mismo sistema de espín. Así, cada protón NH da señales de correlación con todos los demás protones del mismo aminoácido. También se analizó el efecto nuclear Overhauser (NOE) de los distintos grupos de spin. El NOE es el parámetro más importante desde el punto de vista estructural ya que esta transferencia de magnetización sólo se da entre núcleos cercanos en el espacio. El estudio de estas distancias es clave para la determinación estructural, puesto que sólo un plegamiento concreto podrá tener efecto entre dos aminoácidos separados dentro de la secuencia. El análisis NOESY nos permite observar los NOE de aminoácidos secuenciales y no secuenciales y deducir así los posibles plegamientos de una proteína en el espacio.

1.3 Vectores de expresión de proteínas

Con el fin de obtener una cantidad suficiente de proteína purificada del dominio citoplasmático de la isoforma larga de endoglina, se optó por la expresión recombinante en bacterias (*E. coli* BL21, Invitrogen). Para ello se utilizó en primer lugar el vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) en el que se clonó el producto de PCR con la secuencia de la isoforma larga siguiendo las instrucciones del fabricante. Además de un epítipo artificial para confirmar su expresión (XPress), la proteína se expresa junto a una etiqueta de purificación de hexa-histidina (His6x) en su región amino-terminal. Como estrategia alternativa, se optó por realizar un clonaje previo de la secuencia de EngL en el vector de expresión pMAL-C2X. Posteriormente se extrajo el DNA de la construcción completa (con el epítipo MBP) mediante digestión con *EcoRI* y se sub-clonó en el vector de expresión pET100/D-TOPO®. De esta forma, se aumentó el tamaño y la eficiencia en la expresión de la proteína y se añadió un motivo de unión a maltosa (MBP) a la proteína resultante (Fig. 11).

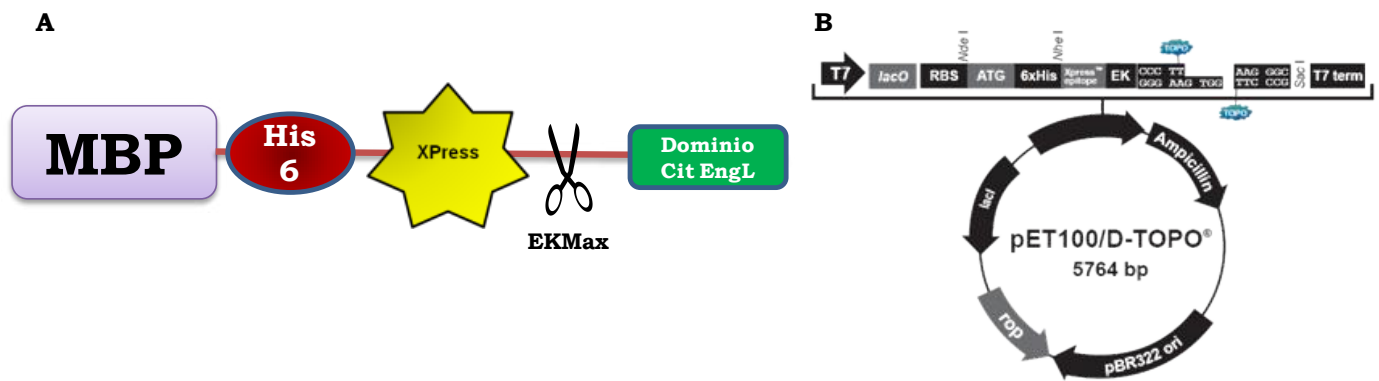


Figura 11. Proteína recombinante correspondiente al tallo citoplasmático de la isoforma larga de endoglina. **A.** Esquema de la proteína recombinante correspondiente al tallo citoplasmático largo con las distintas etiquetas de purificación/detección y el punto de corte para la enteroquinasa (tijeras). **B.** Vector de expresión utilizado para producir la proteína recombinante.

La técnica propuesta para la resolución de la estructura del tallo largo de endoglina fue la cristalografía de rayos-X y se consideró oportuno el expresar una proteína que sirviese de adyuvante (*partner*) de cristalización (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004). Por este motivo se generó un vector de expresión de un dominio LIM de la proteína del citoesqueleto ZRP-1. El vector seleccionado para la expresión fue el pET100/D-TOPO® (Invitrogen). En este caso la expresión fue eficiente y se optó por una única etiqueta de purificación (His6x). Para ello se clonó la secuencia correspondiente al dominio LIM de ZRP-1 (Tabla) y se generó un vector para la expresión de la proteína en las bacterias *E. coli* BL21. La expresión de ambas proteínas en vectores diseñados para bacterias aseguran una gran cantidad de proteína que posteriormente purificada permite obtener una concentración suficiente para su resolución estructural.

Desde un enfoque distinto, se generó un vector de expresión de la metaloproteasa MMP12. Como el objetivo no era una expresión dirigida a la estructura sino al estudio de la funcionalidad de la proteína, se seleccionó el vector pcDNA3.1/V5 TOPO TA (Invitrogen) con un promotor viral fuerte para la expresión en células de mamífero. El producto de PCR previo a la clonación se obtuvo utilizando como molde cDNA de macrófagos polarizados a M1 y el enzima Taq DNA polimerasa (5Prime). El clonaje (TA

cloning) y la amplificación del vector resultante se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (pcDNA3.1/V5 TOPO TA Expression Kit, Invitrogen).

La fidelidad de secuencia y eficacia de expresión de todos los vectores generados se confirmó por digestión específica con enzimas de restricción de la región polylinker, secuenciación (SecuGen) e inmunodetección (*Western Blot*) de las proteínas en los lisados de las células transformadas (expresión en bacterias) o transfectadas (expresión en células de mamífero).

| | Directo (Fw) | Reverso (Rv) |
|-------------------|--------------------------------------|--|
| Tallo Endoglina L | 5'-CACCTACATCTACTCGCA-3' | 3'-CTATGCCATGCTGCT-5' |
| Dominio LIM/ZRP1 | 5'-CACCAGCGGGGAGTACTTTG-3' | 3'-TCAGCAGTCAGTGGTGACG-5' |
| MMP12 | 5'ATGCGGTACCATGGGGAAGTTTCTTCTAATA-3' | 3'-ATGCCTCGAGCTAACAAACCAACCAGCTATTGCTTT-5' |

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar los distintos vectores de expresión.

1.4 Expresión de proteínas, purificación por columnas de afinidad y ensayos de cristalización

La expresión de las proteínas recombinantes del dominio citoplasmático de la isoforma larga de endoglina y del dominio LIM de la proteína de citoesqueleto ZRP1 se realizó en la cepa de *E. coli* BL21 (Invitrogen). Para ello se transformaron las bacterias con los vectores correspondientes siguiendo las instrucciones de un kit comercial (Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits, Invitrogen) y se cultivaron en LB-ampicilina a 37°C en agitación durante toda noche. Se inoculó 1 mL del resultado del cultivo en un volumen superior (2-3 litros) y se añadió IPTG para inducir la expresión de las proteínas (en un ensayo piloto de expresión se estableció el pico máximo de expresión por inducción con IPTG a las 4-5 horas). La totalidad del volumen bacteriano se lisó por fricción mecánica a alta presión mediante una *FrenchPress Cell Disrupter* (Thermo Electron Corporation). Para eliminar los restos celulares, se centrifugó el lisado obtenido con la FrenchPress en una ultracentrifuga XL-90 (Beckman Coulter) a 40.000 rpm durante 60 min a 4°C.

Para aislar (purificar) la proteína sobre-expresada del resto del proteoma bacteriano se utilizaron 3 columnas distintas acopladas a un equipo de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) ÄKTAprime plus (G&E Healthcare). En el caso del dominio citoplasmático, se aprovechó la doble etiqueta (His6X y MBP) de la proteína recombinante. Se inyectó el volumen total del lisado mezclado en una relación 1:1 con el tampón de trabajo 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8 en el equipo de FPLC acoplado a una columna de níquel His-Trap (General Electric). La elución de la proteína retenida se realizó aplicando un gradiente de imidazol (100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8 + 0,5 M Imidazol). El producto de la purificación se diluyó (1:1) en el tampón de unión adecuado (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,4) para la siguiente etapa de purificación en la columna MBPTrap de 1 mL. La elución se realizó en un solo paso utilizando el tampón de unión suplementado con maltosa (10 mM). La purificación del dominio LIM/ZRP1 se realizó también en dos etapas; mediante la columna de afinidad HisTrap (procedimiento ya descrito) seguida de un segundo paso de separación mediante una columna de exclusión por tamaño (Superdex 75 10/300 GL) con su tampón recomendado (50 mM Na-phosphate, pH 7,0 + 150mM NaCl).

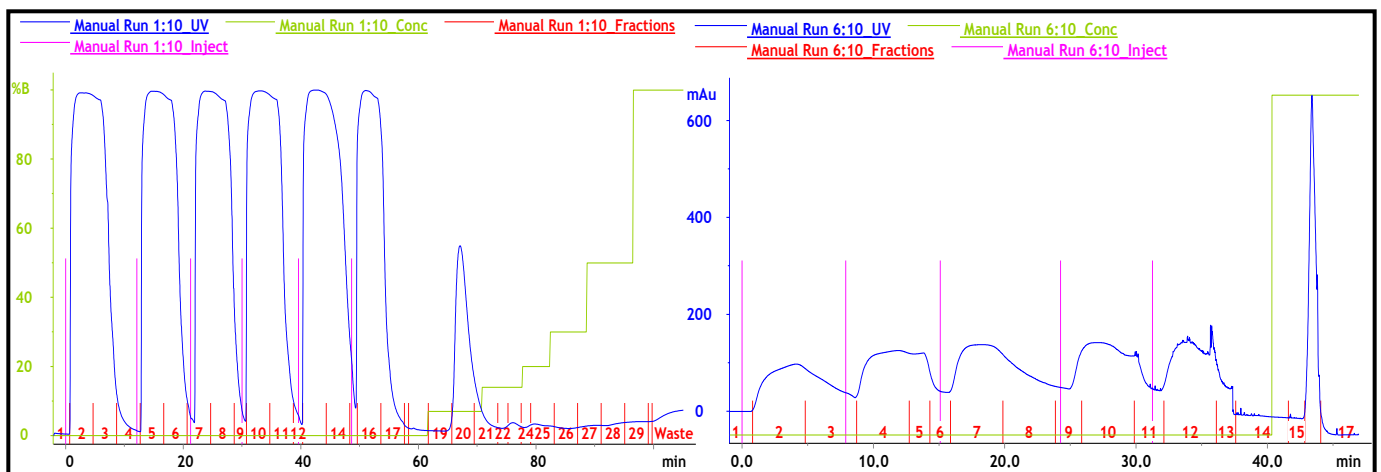


Figura 12. Perfiles de inyección y elución de proteínas mediante cromatografía de afinidad. La imagen de la izquierda corresponde a la purificación por gradiente de imidazol en la columna HisTrap. El perfil de la derecha corresponde a la purificación realizada en un solo paso por exceso de maltosa en la columna MBPTrap. Los picos en azul representan la absorbancia de las proteínas que eluyen de la columna. Los puntos en rosa marcan las sucesivas inyecciones de la muestra a purificar y la línea verde marca el aumento de concentración del tampón de elución. Los números en el eje de ordenadas marcan las fracciones en las que se recogieron las proteínas eluidas.

Los ensayos de cristalización se realizaron en colaboración con la unidad de cristalografía de macromoléculas dirigida por el Dr. Alberto Marina (Instituto de Biomedicina de Valencia IBV, CSIC). Las proteínas obtenidas con una concentración final de 2-3 mg/mL y una pureza superior al 95%, se sometieron a un *screening* masivo de distintas soluciones en condiciones variables (Detergente, sales, pH, concentración, aditivos...) con el objetivo de obtener un núcleo cristalino y desarrollar posteriormente (con las condiciones utilizadas en ese punto) el cristal completo para determinar la estructura de las proteínas purificadas.

2. Marcaje estable con isotopos no radiactivos de células en cultivo (SILAC)

2.1 Incorporación de los isótopos en el proteoma de los transfectantes estables de endoglina

Los transfectantes estables de las dos isoformas de endoglina Larga (EngL) y Corta (EngS) y los controles (Mock), previamente generados en la línea celular promonocítica U937 (Lastres *et al.*, 1996), se cultivaron en medio RPMI 1640 (Thermo Scientific) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), 2mM de L-glutamina, penicilina (100U/mL) y geneticina (1mg/mL) en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37°C de temperatura. Una vez que las células alcanzaron el ritmo de proliferación adecuado, y no había células positivas para la tinción con Azul Tripán, se realizó el marcaje isotópico no radioactivo utilizando medio RPMI SILAC-ready (Thermo Scientific) deficiente en lisina y arginina (Fig. 13). El medio se suplementó para realizar los tres distintos tipos de marcaje de la siguiente manera: i) Marcaje Ligero, L-Lys + L-Arg; ii) Marcaje Semipesado, ¹³C₆ L-Lys + ¹³C₆ L-Arg; y iii) Marcaje pesado, ¹³C₆, ¹⁵N₂ L-Lys + ¹³C₆, ¹⁵N₄ L-Arg (Thermo Scientific). La proliferación y la viabilidad se comprobaron cada 24 horas con la mencionada tinción de Azul Tripán y el conteo en una cámara de Neubauer. Cuando los transfectantes alcanzan un número de al menos 6

divisiones, se considera que más del 95% del proteoma de la célula ha asimilado los aminoácidos suplementados en el medio. En ese momento, se realizó una mezcla de células de diferentes isoformas y marcajes en igual número, en lo que se denominó ensayo Directo ($\text{Mock}_{\text{Ligero}} + \text{EngL}_{\text{Pesado}} + \text{EngS}_{\text{Semipesado}}$) y ensayo Reverso ($\text{Mock}_{\text{Semipesado}} + \text{EngL}_{\text{Ligero}} + \text{EngS}_{\text{Pesado}}$).

Con el objetivo de enriquecer la muestra y aumentar la sensibilidad de la técnica, se procedió al fraccionamiento sub-celular en los compartimentos nuclear, citoplasmático y de membrana mediante un kit comercial (Thermo Scientific). Posteriormente, las fracciones fueron analizadas de forma individual y separadas mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) en condiciones no reductoras y en un ambiente libre de queratinas. Después de aplicar una tinción con azul de Coomassie coloidal (Invitrogen) la calle completa del gel fue escindida en 10-14 porciones de igual tamaño y sometida a digestión trípica (Wilm *et al.*, 1996). A continuación se destiñeron y lavaron los fragmentos y después de una reducción con ditioneitol (DTT) y alquilación con iodacetamida, las proteínas fueron digeridas proteolíticamente durante toda la noche a 37°C con tripsina porcina (Promega, Madison, WI), lo que asegura el corte en residuos de lisina y arginina. Los péptidos resultantes se extrajeron de los fragmentos del gel con una solución al 30% de acetonitrilo y 0,3% de ácido trifluoroacético. Por último, la mezcla se centrifugó en vacío para eliminar cualquier posible resto de solvente orgánico.

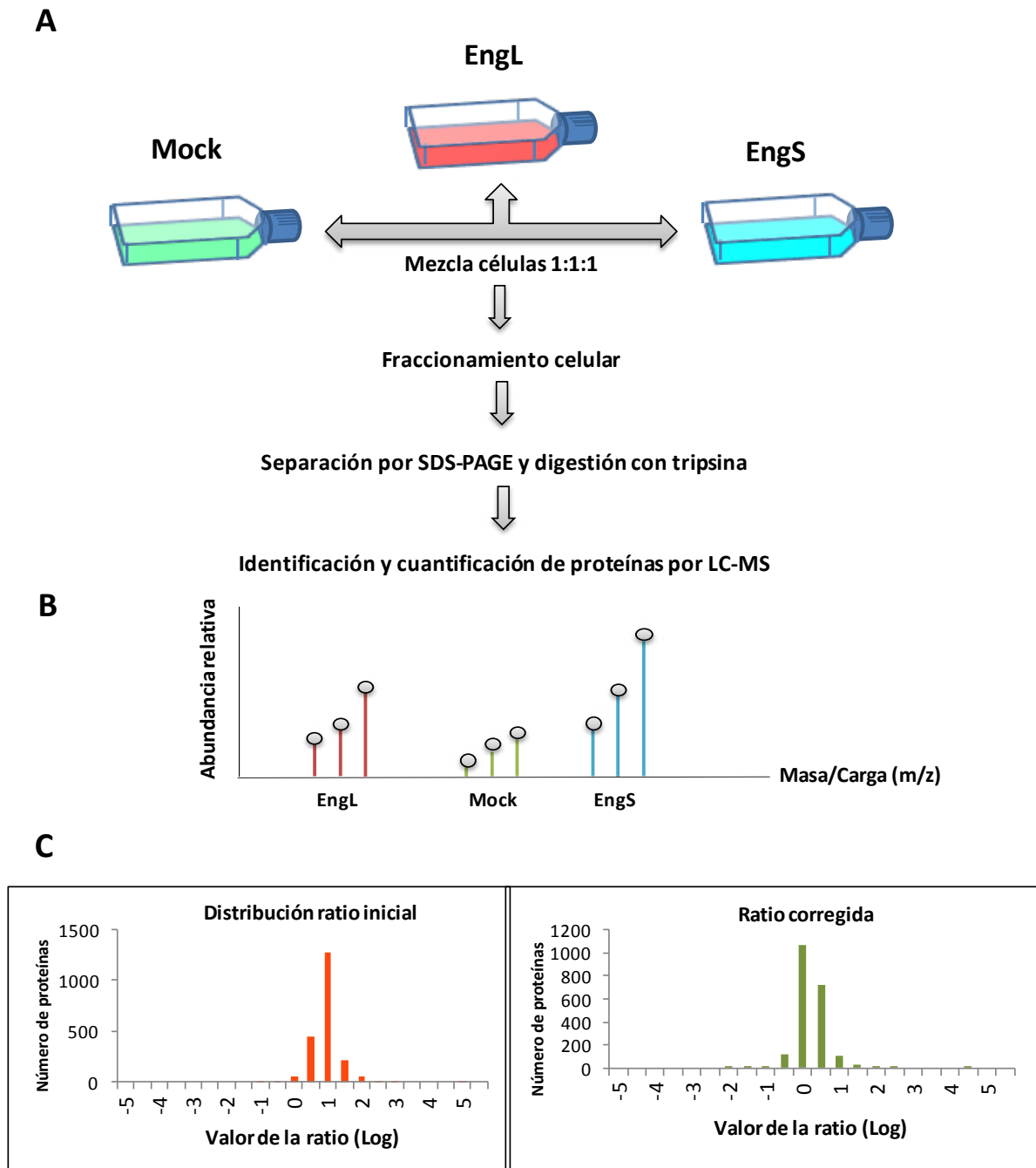


Figura 13. Cultivos y marcaje SILAC. **A.** Los transfectantes estables de endoglina se cultivaron y marcaron con los aminoácidos hasta un porcentaje mínimo del 95% utilizando los medios descritos, especiales para SILAC (ligero, semipesado y pesado). El mismo número de células se mezcló en dos combinaciones distintas (directa y reversa) y se separaron los lisados correspondientes en fracciones de membrana, citoplasma y núcleo. **B.** Las proteínas presentes en las distintas fracciones se identificaron y cuantificaron por cromatografía líquida asociada espectrometría de masas. **C.** Se verificó la eficacia del marcaje y se eliminaron manualmente los sesgos asociados al marcaje y el fraccionamiento celular.

2.2 Separación de péptidos y análisis por espectrometría de masas (MS)

Los péptidos obtenidos de las tres fracciones celulares correspondientes, tanto en el marcaje directo como el reverso, se cargaron en una pre-columna C18-A1 EASY de 2 cm (Thermo Scientific). A continuación, el eluido fue separado en una columna Biosphere C18 (diámetro interno 75 μm , 15 cm de longitud, 3 μm de tamaño de partícula) utilizando un gradiente de acetonitrilo (ACN) de 180 min (170 min en un rango 0-35% utilizando una mezcla de tampón A: 0,1% de ácido fórmico, 2% ACN y tampón B: 0,1% de ácido fórmico, 99,9% ACN) a un flujo constante de 250 nL/min. Por último se utilizó una columna nanoEasy HPLC (Proxeon) acoplada a un electrospray (ESI) como fuente de iones (Proxeon). La adquisición de los distintos espectros se realizó en un LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) en modo de iones positivos. El barrido completo del espectro MS (m/z 300-1200) se obtuvo con un valor objetivo de 1×10^6 a una resolución de 60.000 con una relación m/z de 400. Los 15 iones de más intensidad se seleccionaron para la disociación inducida por colisión (CID) en el LTQ con un valor objetivo de 10.000 y una energía de colisión normalizada del 38%. Se desactivaron los barridos del estado de la carga del ion precursor y del precursor monoisotópico. También se descartaron iones de carga única y estados con carga no asignada. La exclusión dinámica se permitió con una repetición en el conteo de 1 y una duración de exclusión de 30 s.

Los archivos obtenidos en crudo (*Raw files*) se cargaron en una búsqueda frente a la base datos humana Swiss Prot (SwissProt_57.15.fasta) mediante el motor de búsqueda MASCOT (versión 23, Matrix Science) y el software Proteome Discoverer (versión 1.3.0.339, Thermo). Los parámetros de búsqueda permitieron un máximo de dos errores de digestión, oxidación de metioninas, carbamidometilación de cisteínas como modificación fijada, acetilación N-terminal y ^{13}C -Arg, ^{13}C -Lys, ^{15}N -Arg, ^{15}N -Lys como modificaciones variables. La tolerancia de masa del precursor y del fragmento se fijó en 10 ppm y 0,8 Da, respectivamente. Los péptidos identificados fueron validados mediante un algoritmo Percolator (Kall *et al.*, 2007) con *q-value* menor a 0,01. La cuantificación relativa de los péptidos identificados se realizó con el mencionado

software *Proteome Discoverer* 1.3.0.339. Para cada análisis triple el programa determinó el área del cromatograma iónico obtenido y calcularon las ratios de las distintas combinaciones (Pesado/Ligero, Semipesado/Ligero, Ligero/Semipesado, y Pesado/Semipesado).

La ratio resultante corresponde a la media de los péptidos exclusivos identificados para una determinada proteína. Posteriormente, los valores de las ratios fueron referidos a la media observada para los péptidos de la misma proteína en la situación control. La lista preliminar que contenía todas la proteínas identificadas en el análisis para cada experimento (directo y reverso), condición (Mock, Long, Short) y fracción celular (membrana, citoplasma y núcleo) se analizó (filtró) de forma manual en los archivos de Excel resultantes. Se excluyeron proteínas cuya ratio respecto al control estaban en el rango 0,8-1,5, que tuviesen valores distintos en el experimento directo y reverso, además de aquellas con una resolución o identificación débil. Los valores se representaron y analizaron como el Log_2 de las ratios en las condiciones Long y Short referidas al control Mock. La lista definitiva se analizó con distintas herramientas bioinformáticas tales como Ingenuity Pathways (IPA, Qiagen), STRING o DAVID (Huang da *et al.*, 2009). Por último, la lista fue agrupada en un diagrama de Venn con el objetivo de tener una visión de conjunto de la totalidad de proteínas con mayor y menor expresión en los transfectantes de endoglina larga y corta (en relación al control). El diagrama mostrado se obtuvo con una herramienta online desarrollada en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC, Madrid) (Oliveros y cols., 2007).

3. Inmunodetección y *Western Blot*

El análisis de *Western Blot* (WB) se realizó para todas las muestras analizadas tal y como se ha descrito (Blanco *et al.*, 2008). Las células sometidas al análisis se lisaron en un tampón de lisis (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Nonidet P-40 y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa) a 4°C. Los extractos se cuantificaron por medio del ensayo del ácido bicinonínico (BCA Protein Assay *Kit*,

Pierce), empleando como recta patrón concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino. Entre 20 y 80 µg de proteína (en función del tipo celular y la proteína a analizar) se separaron por SDS-PAGE (9-12%) en condiciones reductoras y no reductoras. Después de la separación, las muestras fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF utilizando el sistema semi-seco iBlot® (Invitrogen). La inmunodetección se realizó incubando la membrana durante toda la noche a 4°C frente a distintos anticuerpos mostrados en la tabla 2, utilizando siempre anti-β-actina como control de carga (AC-15, Sigma). A continuación, las muestras se incubaron por 1 hora en presencia de su anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa. Las bandas fueron visualizadas utilizando Supersignal (Pierce) como substrato quimioluminiscente y cuantificadas con el sistema Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Image Lab™ (BioRad).

| | Proteína que reconoce | Especie | Especie que reconoce | Aplicación | Referencia |
|-------------|-----------------------|---------|----------------------|------------|-------------------------|
| ANTICUERPOS | β-actina | Ratón | Humana | WB | AC-15, Sigma |
| | SMAD3 | Conejo | Humana | WB | Sc-6202, Santa Cruz |
| | Calmodulina | Ratón | Humana | WB | SC-5537, Santa Cruz |
| | Endoglina | Ratón | Humana | WB/CF | P4A4, SN Hibridoma |
| | Integrina alpha M | Ratón | Humana | CF | Bear1, SN Hibridoma |
| | V5 | Ratón | Artificial | WB | P/N 46-0705, Invitrogen |
| | Cathepsin-G | Cabra | Humana | WB | SC-6512 Santa Cruz |
| | CDK8 | Cabra | Humana | WB | SC-1521 Santa Cruz |
| | PRX1 | Cabra | Humana | WB | SC-7381 Santa Cruz |
| | PSTPIP1 | Ratón | Humana | WB | SC-390727 Santa Cruz |
| | X-Press | Ratón | Artificial | WB | R910-25, Invitrogen |
| | MMP12 | Conejo | Humana | WB | MABT147, Millipore |
| | SOD2 | Conejo | Humana | WB | S5069, Sigma |

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección

En el caso de la inmunodetección por citometría de flujo (CF), las células sometidas al análisis se recogieron y centrifugaron a 1.200 rpm. Después de tres lavados con PBS a 4°C, las células se bloquearon en una solución de PBS-AB⁺ al 2% durante 30 minutos. A continuación, las muestras se incubaron con los anticuerpos monoclonales de ratón correspondientes: anti-endoglina humana (P4A4; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) o anti-CD13 (sc-53970, Santa Cruz) seguido de una incubación con el anticuerpo secundario de cabra (anti-ratón) conjugado con el fluorocromo verde Alexa-488 (Invitrogen). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS Coulter XL.

Los niveles de proteínas solubles (Endoglina y activina A) presentes en el sobrenadante de las células utilizadas se determinaron por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de endoglina y Activina A soluble humanas se utilizaron los kits Quantikine® de R&D (DNDG00 y DAC00B), mientras que para medir los niveles de endoglina soluble en ratón se optó por el sistema DuoSet® (DY1320, R&D).

4. Análisis funcionales en células

4.1 Proliferación, supervivencia y apoptosis.

Para los ensayos de proliferación en la línea promonocítica U937, los tres transfectantes estables de las dos isoformas de endoglina y el control se sincronizaron a $1,2 \times 10^5$ células/mL en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS. El seguimiento del crecimiento celular se realizó a las 24, 48 y 72 horas mediante el conteo tanto en cámara de Neubauer como en un contador automático (Bio-Rad). Las células se mezclaron previamente con una solución de Azul Tripán para confirmar la viabilidad celular y cada medida se realizó por triplicado.

Para los ensayos de supervivencia, los transfectantes se cultivaron a $4-8 \times 10^4$ células/mL en una placa de 96 pocillos. La inducción de apoptosis se realizó mediante

la adición al medio de la citoquina GM-CSF (10, 50 o 100 ng/mL) durante 4 días. Pasado ese tiempo se recogieron e incubaron con MTT (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Sigma) a 37°C durante 2 horas. Se centrifugó la placa a 1.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante resultante. Los cristales de formazán generados por una actividad diferencial del enzima succinato deshidrogenasa se resuspendieron en DMSO. Se determinó la absorbancia a 595 nm (con una corrección a 630nm) en un lector de placas (IEMS Reader, Thermo).

4.2 Medida de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

La detección de ROS se realizó incubando en oscuridad los transfectantes estables (U937) de endoglina en una solución 10 μM de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron dos veces para ser seguidamente resuspendidas y lisadas en NaOH 0,25 M. La fluorescencia de los lisados se analizó en un fluorímetro Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific). La cantidad de fluorescencia fue referida (normalizada) a la cantidad total de proteína (determinada por BCA) en cada condición.

4.3 Adhesión celular a fibronectina

Para estudiar la capacidad de adhesión a fibronectina de los transfectantes, se recubrieron los pocillos de una placa de 24 con 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina humana en un volumen de 500 μL (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Se lavaron 5×10^4 células por condición, en duplicado, con PBS a 4°C y se procedió al marcaje de las mismas mediante la incubación con una sonda fluorescente de éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CSFE, Invitrogen). Posteriormente, las células se pusieron en cultivo en los pocillos previamente tratados con fibronectina en intervalos de tiempo comprendidos entre 5 y 60 min. Así mismo, se cultivaron las células en pocillos pre-tratados únicamente con PBS como control negativo de la adhesión. Después de los tiempos indicados, se lavaron los pocillos y se lisaron las células adheridas (Tris-fosfato 25 mM pH 7,8, DTT 2 mM, CDTA 2 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 1%). La

fluorescencia se determinó en un fluorímetro Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific) y se relacionó con el número de células adheridas a la superficie de fibronectina.

4.4 Senescencia inducida por estrés oxidativo en macrófagos humanos y de ratón.

Monocitos humanos de 4 donantes, obtenidos con el consentimiento informado de los mismos, se purificaron partiendo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) mediante separación magnética por micro-esferas específicas para CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos ($\geq 95\%$ positivos para CD14) se cultivaron a $0,5 \times 10^6$ células/mL durante 3 días en medio RPMI suplementado con 10% de suero (medio completo) a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (*Large Peritoneal Macrophages*, LPM) se aislaron, como se explica más adelante (siguiendo la normativa vigente de manipulación animal), para ser posteriormente incubados en medio completo durante dos horas a 37°C al 5% de CO₂. Después, se retiró el medio de cultivo y las muestras se lavaron con PBS para eliminar las células en suspensión. Las células resultantes presentaban la morfología típica de los macrófagos humanos y de ratón adheridos al plástico del pocillo. Para inducir estrés oxidativo se añadió peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 150 μ M durante una hora. Seguidamente, se lavaron las células por triplicado con PBS y se cultivaron 12 horas en el medio de cultivo fresco inicial. La senescencia celular fue analizada por la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), tal y como se describe en la bibliografía (Haendeler *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2008)

5. Diferenciación-polarización de la línea U937 y de macrófagos humanos

Los transfectantes estables de U937 se cultivaron a una concentración de 2×10^5 células por mL durante 3 días en medio RPMI completo en presencia y ausencia de 50 nM Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA). Debido al tratamiento, las células sufrieron una parada del ciclo celular y un cambio de morfología por adherencia al sustrato. La diferenciación se confirmó midiendo por citometría de flujo el aumento del marcador de superficie CD11b (Bear-1 antibody; ab36939, Abcam). Para los estudios de polarización, los transfectantes se diferenciaron con PMA como se ha descrito anteriormente, pero en este caso se añadieron además 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS en las últimas 12 horas de tratamiento. La cantidad de citoquinas secretadas al medio se analizaron en los sobrenadantes de las células diferenciadas utilizando el kit Human Cytokine Array Panel A (R&D Systems). El perfil del secretoma de los transfectantes permitió observar la polarización preferencial de los mismos.

6. Ensayos con animales

6.1 Obtención de macrófagos peritoneales

Se utilizó la cepa libre de patógenos C57B1/6J con una edad comprendida entre las 8-48 semanas de edad para la obtención de macrófagos peritoneales murinos. Todos los animales fueron manipulados siguiendo estrictamente las normas del Consejo Europeo (No. L358/1-358/6, 1986), Gobierno de España (BOE No. 67, pp. 8509-8512, 1988, y BOE No. 256, pp. 31349-31362, 1990) y el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB/CSIC) además de la normativa española y europea sobre animales de experimentación (RD 53/2013, 2010/63/EU).

Con el objetivo de reclutar los macrófagos peritoneales pequeños (*Small Peritoneal Macrophages*, SPM) los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 1 mg de Zymosan A proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* (Z4250, Sigma-Aldrich) en 0,5

mL de PBS estéril. Para el aislamiento de las células de la cavidad peritoneal (tanto los SPM reclutados como los LPM residentes) los animales fueron anestesiados con isofluorano y sacrificados por dislocación cervical. A continuación se realizó un pequeño corte en la piel del abdomen para acceder al peritoneo y se inyectaron 10 mL de PBS estéril que tras un ligero masaje fue recuperado casi en su totalidad (8-9 mL). Siempre en condición de esterilidad, el volumen se centrifugó a 250g durante 6 minutos, para ser posteriormente resuspendido en 1 mL de medio DMEM. Se repartieron las células obtenidas en placas de 6 pocillos, completando hasta 2,5 mL de DMEM con 10% de FCS y se cultivaron durante 2 horas a 37 °C en un incubador al 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS estéril para enriquecer la muestra en células adherentes (macrófagos de la cavidad peritoneal). El medio de cultivo se cambió cada 24 horas.

6.2. Respuesta inflamatoria *in vivo* e inhibición de MMP12

Se realizó una inyección intraperitoneal de LPS (1 mg/Kg-*E. coli* O111:B:4, Sigma-Aldrich) en ratones de diez semanas de edad. Tres horas antes de la inyección se suministró de forma oral un volumen de 150-200 µL de metilcelulosa al 0.5% (vehículo-control) o el inhibidor específico de MMP12 (MMP408 - 30mg/kg Merck-Millipore). Tanto el vehículo como el inhibidor se suministraron nuevamente a las 24 horas de la inyección con el LPS. Pasadas 48 horas, los ratones se anestesiaron con isofluorano y se extrajo la sangre por punción en la vena cava. Se centrifugó la sangre obtenida durante 15 min a 1000g para separar el plasma. Los niveles de endoglina soluble se determinaron por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR)

El ARN total de las células sometidas al análisis se extrajo utilizando el kit RNeasy (Qiagen) y fue retrotranscrito con el iScript cDNA Synthesis kit (BioRad). La pureza y calidad del ARN total se analizaron por electroforesis microfluidica en chip en un

Experion (BioRad). En los experimentos con los transfectantes U937, los oligonucleótidos para los genes seleccionados se diseñaron de acuerdo al *Universal Probe Library System* (Roche Diagnostics) para PCR cuantitativa. Los genes típicos de fenotipo M1 y M2 se normalizaron frente a TBP (poteína de unión a la caja TATA), HPRT1 (hipoxantina fosforibosiltransferasa 1) y RPLO (proteína ribosómica). Así mismo, se utilizó este sistema para analizar los niveles de expresión en macrófagos de la metaloproteasa MMP12. Para los análisis con los macrófagos humanos y murinos el ADNc obtenido se utilizó como molde para el análisis con oligonucleotidos específicos (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron analizadas utilizando el sistema iQ SYBR-Green Supermix (BioRad) y normalizadas frente al gen control 18S.

| Mensajero | Especie | Directo (FW) | Reverso (RV) |
|----------------|--------------|------------------------------------|--------------------------------|
| EngL | Humano | 5'-ACCTGTCTGGTTGCACAAGCAAAGG-3' | 3'-GGGAACCGCGTGTGCGAGTAG-5' |
| EngS | Humano | 5'-ACCTGTCTGGTTGCACAAGCAAAGG-3' | 3'-GGGAACCTGGGAGCGGGG-5' |
| EngL | Ratón | 5'-GACCTGTCTGGTAAAGGCCTTGTCTCTG-3' | 3'-CTGGGGCCACGTGTGTGAGAATAG-5' |
| EngS | Ratón | 5'-GACCTGTCTGGTAAAGGCCTTGTCTCTG-3' | 3'-CTGAGGGGCGTGGGTGAAGG-5' |
| PAI1 | Humano | 5'-CAGACCAAGAGCCTCTCCAC | 3'-ATCACTTGGCCCATGAAAAG-5' |
| Pai1 | Ratón | 5'-GTCTTTCCGACCAAGAGCAG-3' | 3'-GACAAAGGCTGTGGAGGAAG-5' |
| MMP12 | Humano | 5'-GGAATCCTAGCCCATGCTTT-3' | 3'-GGAACAAGTTTGTGCTCCT-5' |
| mmp12 | Ratón | 5'-TGAATTTGCATTTCTGTACATAGT-3' | 3'-TGCTGTAAGTCCATGGGTGA-5' |
| 18S | Humano/Ratón | 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' | 3'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-5' |
| IL6 | Humano | 5'-CAGGAGCCCAGCTATGAACT-3' | 3'-GAAGGCAGCAGGCAACAC-5' |
| INHBA | Humano | 5'-TGGCTATATGTAGGCAATGTAC-3' | 3'-AGGGCTGCCTCTAGAACACA-5' |
| IL23A | Humano | 5'-CTGGGGAGCAGAGCTGTAAT-3' | 3'-AGCTCTGCCCTGAGCTGTC-5' |
| IL12A | Humano | 5'-CACTCCAAAACCTGCTGAG-3' | 3'-CAATCTCTCAGAAGTGCAAGG-5' |
| IL1A | Humano | 5'-CCAGGAGCTGCCAAGTATTC-3' | 3'-TGTTCTGGCTGAATTTGTTGA-5' |
| MAFB | Humano | 5'-AGCGGCTTCCGAGAAAAC-3' | 3'-GCGAGTGGGCTCAGTTATG-5' |
| STAB1 | Humano | 5'-ACATGTACCTGCGACACAGC-3' | 3'-GAGGCATGCTTATCCCTCAG-5' |
| SERPIN2 | Humano | 5'-CATGGAGCATCTCGTCCAC-3' | 3'-ACTGCATTGGCTCCCACTT-5' |
| FOLR2 | Humano | 5'-GAGAGGCCAACTCAGACACAG-3' | 3'-CCAGACCATGTCTTTCTGTCC-5' |
| CD163 | Humano | 5'-GAAGATGCTGGCGTGACAT-3' | 3'-GCTGCCTCCACCTTAAGTC-5' |

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para detectar los niveles de mRNA por PCR cuantitativa

8. Actividad de MMP12 y liberación de endoglina soluble *in vitro*

8.1 Ensayo de inhibición de actividad para MMP12 recombinante

La proteína recombinante humana de MMP12 (R&D Systems) se activó incubándola con el tampón de trabajo (50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,05% Brij; pH 7,5) durante 30 horas a 37 °C. La actividad proteasa de la misma se determinó por su capacidad de cortar un péptido con un fluoróforo apantallado (*quenched*) que solo emite fluorescencia al ser cortado (Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂, R&D Systems). En el ensayo se midió la intensidad de fluorescencia incubando 0,4 ng/mL de la proteína pre-activada junto al péptido fluorogénico (6 μM), en competición con los péptidos sintetizados y purificados correspondientes al dominio extracelular de endoglina (P583 y P447) y el péptido control P230. Así mismo, se evaluó también la capacidad del inhibidor químico MMP408 (Millipore) de mitigar la actividad de MMP12. La intensidad de fluorescencia se midió utilizando un fluorímetro Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader (Thermo Scientific).

8.2 Zimografía

Para determinar la actividad de la metaloelastasa de macrófagos MMP12 se utilizó como base un gel de poliacrilamida al 12% co-polimerizado con caseína bovina (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/mL. Después de realizar una carrera previa para homogenizar la caseína inmovilizada, se cargaron los sobrenadantes (sin hervir las muestras previamente) de macrófagos M1/M2 y de las células COS7 transfectadas con el vector de expresión de MMP12. Después de correr el gel a 100V, para lavar el SDS y equilibrar el gel, se enjuagó dos veces, 30 minutos con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 2,5% Triton X-100 y dos veces más con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). El gel se incubó durante toda la noche a 37°C en un tampón que favorece la actividad de las metaloproteasas (Tris-HCl-pH 7,5, 150mM NaCl, mM CaCl₂, 0,1 % Triton X-100, 0,03 % NaN₃). Por último, se tiñó el gel utilizando Azul de Coomassie R-250 en 10% de ácido y se destiñó con ácido acético al 10% hasta visualizar las bandas. Las imágenes se tomaron en un Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ y Image Lab™ (BioRad).

8.3 Transfección transitoria de los vectores de expresión de endoglina y MMP12

Para la transfección transitoria de las proteínas de MMP12 y endoglina en células COS7 (fibroblastos de mono) se utilizaron los vectores generados, pcDNA3.1-MMP12 y pDisplay-ENG, además del vector vacío de PDisplay y un vector de expresión de proteína verde fluorescente (GFP, Lonza). La transfección se realizó con lipofectamina LTX (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 48 horas se recogieron los sobrenadantes y lisaron las células (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1%, y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas) para un posterior análisis por ELISA, *Western-Blot* y zimografía.

8.4 Cultivo de células endoteliales (HUVEC) en medio condicionado de macrófagos polarizados

Cultivos primarios de células endoteliales humanas se cultivaron en medio específico suplementado EGM2 (Lonza) con un 10% de FCS hasta obtener una mono-capa homogénea. Después de retirar el medio endotelial y lavar dos veces con PBS estéril, los sobrenadantes de los macrófagos previamente polarizados a M1 o M2 se centrifugaron y añadieron a las células endoteliales del cultivo. Después de 24 horas se centrifugaron los sobrenadantes resultantes para el posterior análisis por ELISA.

9. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5 para Windows (La Jolla, CA). Todos los datos mostrados se presentan como la media \pm la desviación estándar (SD). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de Student de dos colas para muestras desapareadas y, cuando fue necesario, un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un ajuste de Bonferroni. Se considera como significativo un valor de $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Resultados_

“Te pasas años y años investigando y, de repente, en un suspiro das con un gran descubrimiento y eres consciente, por primera vez en tu vida, de que conoces algo que a esa misma hora y ese mismo día nadie más sabe”.

— Judah Folkman.

Una vez terminada la asignación, se realizó el análisis 2D 1H-NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). En este análisis se transfiere la magnetización de forma distinta al TOCSY, obteniéndose así las señales de todos aquellos núcleos que estén más cerca de 5 Angstroms (Å). En el espectro NOESY se observan todos los espines del propio residuo, los del residuo anterior y lo más importante, los de aquellos residuos que se encuentran cerca (no sólo secuencialmente, también espacialmente). Al no observarse diferencias entre el análisis TOCSY y el NOESY, se concluyó que, al sólo ser visibles las señales cercanas y no las señales de residuos distantes, el péptido no adquiriría una estructura estable en disolución. En conclusión, el tallo citoplasmático de EngS no se ordena en una estructura secundaria definida.

2.1 Expresión, purificación y cristalización del dominio citoplasmático de EngL

Los datos obtenidos en cuanto a la carencia de estructura secundaria definida por parte del tallo citoplasmático de EngS, pusieron de manifiesto la necesidad de determinar la estructura del tallo de EngL para poder en última instancia hacer una comparativa de función asociada a plegamiento tridimensional.

La utilización del vector de expresión para bacterias pET100/D-TOPO® (Invitrogen) permitió obtener unos niveles de expresión de proteína suficientes para llevar a cabo los ensayos de cristalización. En el caso del dominio citoplasmático largo de endoglina, el paso previo por el vector pMAL-C2X, además de añadir una etiqueta de purificación (MBP) incrementó notablemente la eficiencia de expresión de la proteína. Tanto para el dominio LIM de la proteína de citoesqueleto ZRP-1 como para el tallo citoplasmático de EngL, se determinó como punto de expresión óptimo 3 horas después de añadir el IPTG a las bacterias *E.Coli* BL21 transformadas con los vectores de expresión correspondientes.

El paso de los lisados bacterianos por las columnas de afinidad para la secuencia 6XHis, eliminó la mayor parte de las proteínas contaminantes propias de la bacteria. Siendo la

alta pureza de la proteína un requisito indispensable en la determinación estructural, la realización de un segundo paso de purificación con la columna de afinidad de maltosa o la de exclusión por tamaño, permitió alcanzar el porcentaje adecuado.

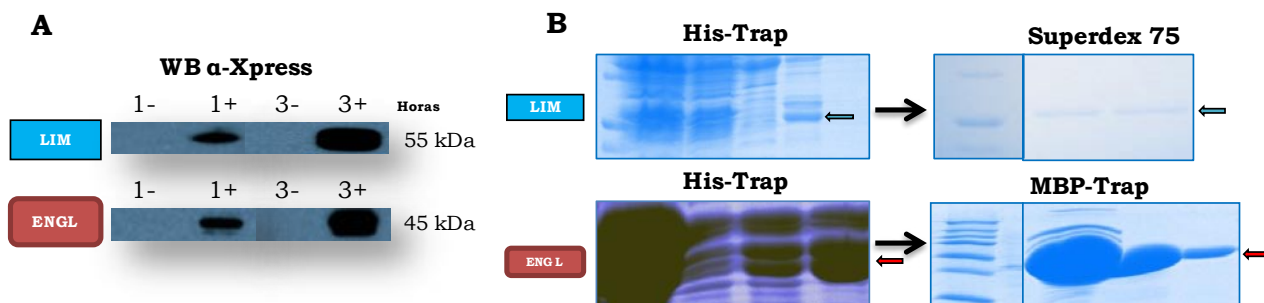


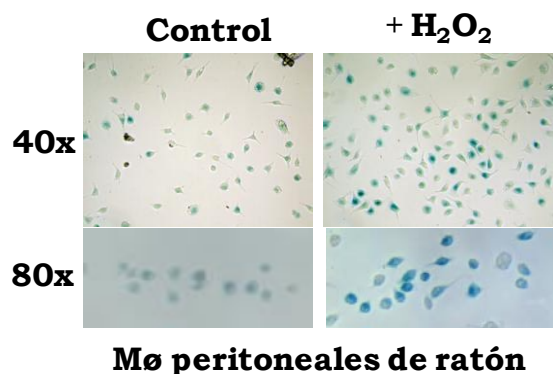
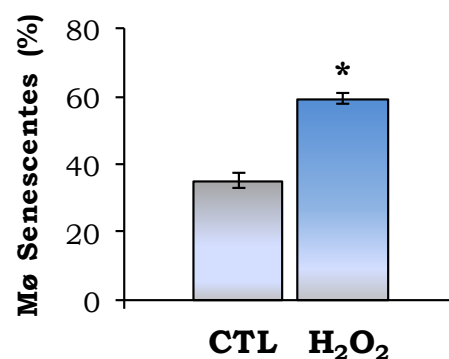
Figura 15. Expresión y purificación de proteínas para su posterior determinación estructural por cristalografía de rayos X. **A.** Análisis por *western-blot* de los lisados bacterianos de *E.Coli* BL21. Se analizaron en presencia y ausencia de IPTG midiendo la expresión a distintos tiempos después de la adición del piranosido. **B.** La doble purificación de las dos proteínas recombinantes permitió obtener una pureza superior al 95% y una concentración siempre superior a 2 mg/mL.

A pesar de contar con un material de partida (proteína recombinante purificada) con una calidad suficiente, los ensayos de cristalización realizados en colaboración con la Unidad de Cristalografía de Macromoléculas (IBV, CSIC) no dieron los resultados esperados. El *screening* masivo con distintas soluciones en condiciones variables (Detergente, sales, pH, concentración, aditivos...) no tuvo como resultado la formación de ningún cristal. Ni las pruebas realizadas con el dominio citoplasmático de EngL de forma individual, ni las realizadas utilizando el dominio LIM como adyuvante (*partner*) de cristalización tuvieron como resultado la formación del núcleo cristalino. Al no obtener un cristal que sirviera para la determinación la estructural del tallo citoplasmático se decidió pasar al siguiente objetivo de la presente tesis, que era el de realizar una comparativa funcional (a nivel proteómico) de las dos isoformas dentro del linaje mieloide.

2. Función diferencial de las isoformas de endogлина en el linaje mieloide

2.1. Endogлина corta como marcador de senescencia en macrófagos

Al considerarse endogлина corta (EngS) como un marcador de senescencia endotelial, se analizó la expresión de ambas isoformas en monocitos-macrófagos en los que se había inducido un estado senescente sometiendo las células a estrés oxidativo con H_2O_2 . En primer lugar, se obtuvieron células peritoneales de ratones de 2 meses de edad y se cultivaron en ausencia y presencia del agente oxidante. La mayoría de las células obtenidas correspondieron al linaje mieloide, más concretamente a los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón (LPM) (Cassado Ados *et al.*, 2011). Un porcentaje elevado de estos LPM fueron positivos para la tinción asociada a senescencia de β -galactosidasa (Fig. 16A). Este porcentaje aumentó significativamente después de inducir la senescencia con peróxido de hidrógeno (Fig. 16B). Además, este incremento en la positividad para la tinción de senescencia, estaba asociado con un aumento de expresión de EngS, como se observa en el análisis de los transcritos de endogлина por PCR (Fig. 16C).

A**B**

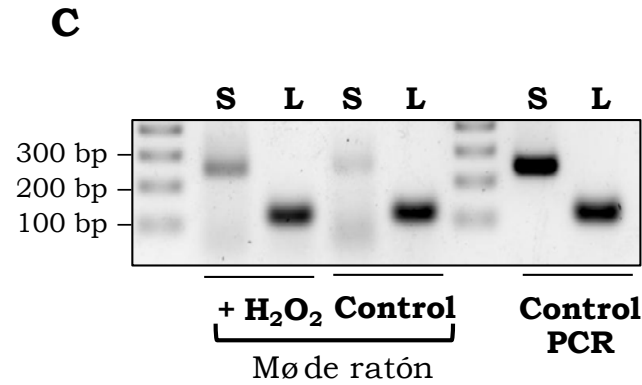


Figura 16. El estrés oxidativo induce senescencia en macrófagos peritoneales de ratón. A.

Tanto las células tratadas como las no tratadas presentan un porcentaje de células positivas para la tinción asociada a senescencia debido a la actividad β -galactosidasa. **B.** Este porcentaje muestra un aumento significativo tras someter las células a estrés oxidativo. **C.** A nivel de transcripción de las dos isoformas de endoglina, se observa una relación directa entre el fenotipo senescente y el aumento en la expresión de la isoforma corta.

A continuación se realizó un experimento similar utilizando en este caso monocitos humanos activados obtenidos de sangre periférica, e induciendo en los mismos senescencia por estrés oxidativo. Las células de los 4 donantes mostraron un aumento claro en los transcritos de marcadores de senescencia tales como *PAI-1* o *EngS* tras realizar el tratamiento. El aumento relativo en la isoforma larga fue mucho menor (Fig. 17). Por lo tanto, el experimento *in vitro* con el agente oxidante tuvo resultados similares en las células en cultivo, tanto en muestras humanas obtenidas de donantes humanos como en las de ratón.

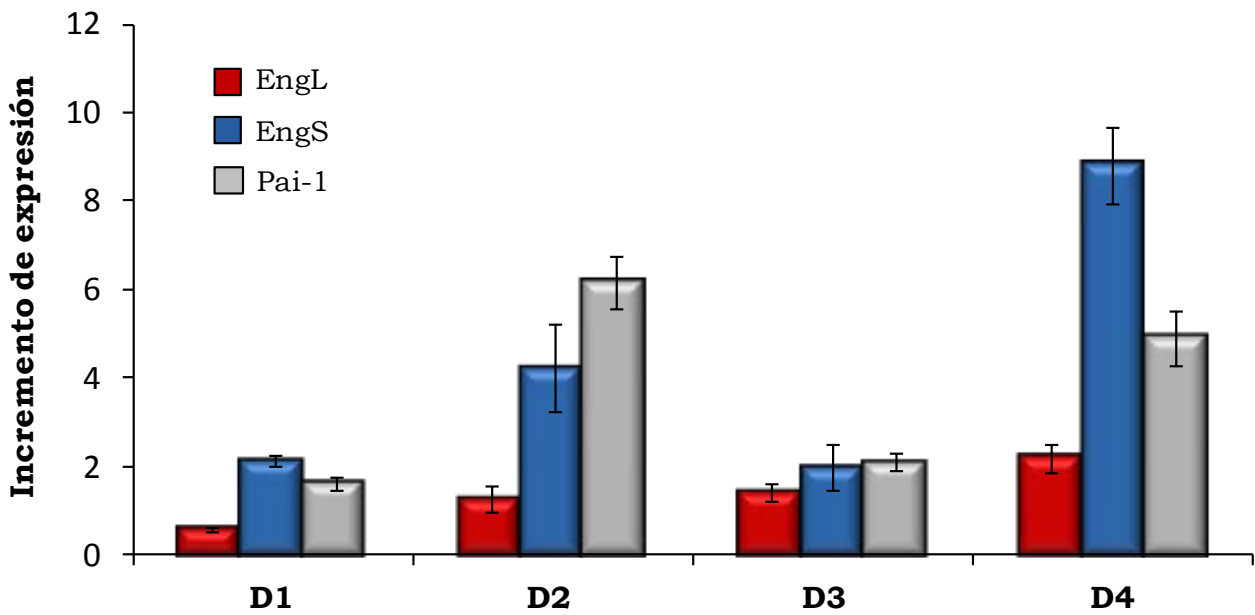
Estrés oxidativo (H₂O₂) en Macrófagos humanos

Figura 17. Inducción de senescencia por estrés oxidativo en macrófagos humanos. Después del tratamiento con H₂O₂ se observa un aumento en los niveles de transcripción tanto en la isoforma corta de endogлина como en el marcador de senescencia PAI-1. El efecto observado en ratón se hace extensible a células humanas de distintos donantes (D1-D4) cultivadas *in vitro*.

Para estudiar y extrapolar los resultados observados en las células en cultivo, se analizó el papel *in vivo* de estos marcadores, utilizando macrófagos residentes de peritoneo (LPM) y macrófagos de menor tamaño (SPM), reclutados al peritoneo por inyección previa de Zymosan (Fig. 18). Conforme el ratón envejece, se observa un aumento de la isoforma corta de endogлина en estas células. De esta forma, los niveles de expresión de EngS a los 6 y 12 meses de vida es claramente superior (hasta 16 veces más) a los niveles basales observados a los 2 meses, tanto en la población residente (LPM) como en la reclutada (SPM). Además, el marcador de senescencia *Pai-1* mostró un aumento significativo en los LPM de los ratones de 12 meses de edad. Por otra parte, los transcritos de la isoforma larga mostraron un aumento significativo tanto en los LPM de 6 y 12 meses como en los SPM de 12 meses, si bien este aumento no fue tan marcado como en el caso de la isoforma corta.

Cabe destacar que el aumento de EngS es mayor y se manifiesta en edades más tempranas al de Pai-1. Este resultado está de acuerdo con lo descrito en la literatura sobre la ruta de señalización de TGF- β preferencial de la isoforma corta y la presencia de PAI-1 como uno de los genes diana de dicha ruta. Todos estos resultados sugieren que endoglina corta es un marcador de senescencia en macrófagos, aumentando su expresión tanto *in vitro* en senescencia inducida por estrés oxidativo, como *in vivo* debido a la senescencia asociada a la edad.

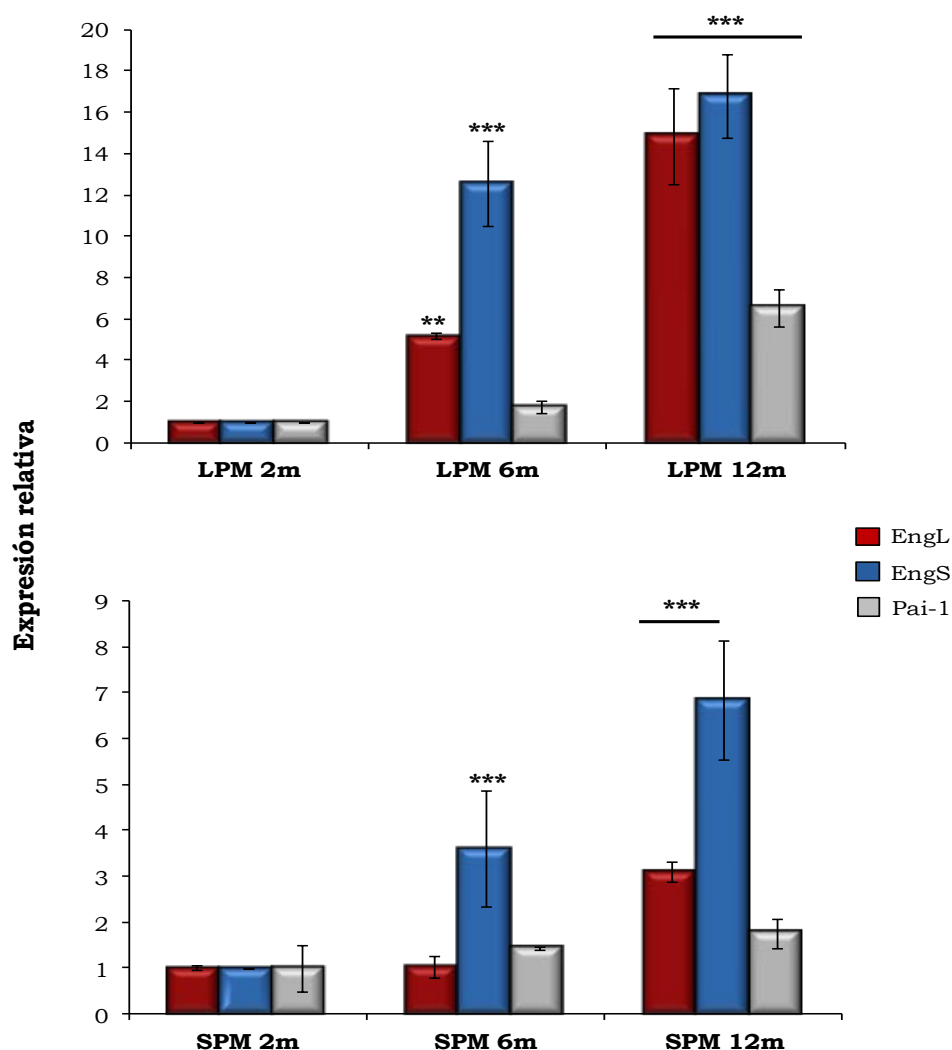


Figura 18. Efecto del envejecimiento en macrófagos peritoneales de ratón. El análisis por RT-PCR de macrófagos residentes de peritoneo (LPM) y de los reclutados por tratamiento con Zymosan (SPM) muestra un aumento significativo de la isoforma corta de endoglina en relación proporcional a la edad del individuo (2m, 6m y 12m respectivamente).

2.2 Identificación proteómica de proteínas diferencialmente expresadas en transfectantes estables (EngL/EngS)

Para evaluar el impacto de las isoformas de endoglina en el proteoma de células monocíticas, se utilizaron transfectantes estables de la línea celular U937 sobreexpresando las dos isoformas de endoglina y un vector vacío como control (Mock) (Lastres *et al.*, 1996). La expresión de ambas isoformas de endoglina está claramente aumentada respecto a los niveles basales presentes en la situación control (Fig. 19). La comprobación de los niveles en los transfectantes estables se realizó antes de cada ensayo proteómico o funcional, tanto a nivel de proteína por citometría de flujo, como a nivel de ARNm por PCR (Fig. 19).

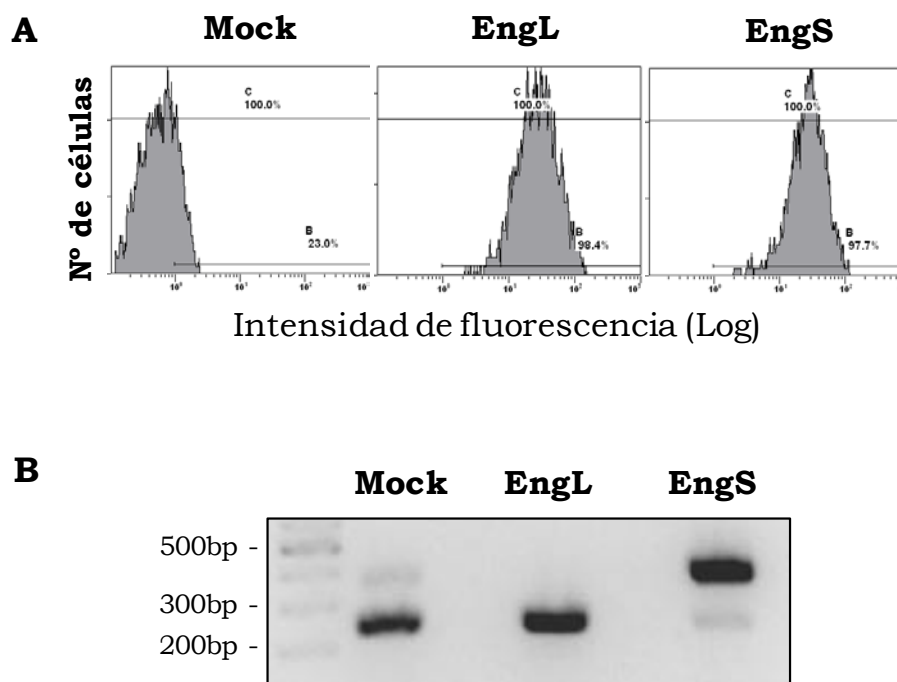


Figura 19. Comprobación previa de la expresión estable de las isoformas de endoglina en U937. **A.** El análisis por citometría de flujo con anticuerpos contra endoglina muestra un porcentaje y nivel de expresión muy superior en las poblaciones transfectadas con endoglina con respecto a las células control. **B.** Además, se confirmó por PCR que la forma sobreexpresada correspondía en cada caso a la isoforma larga o corta de la proteína.

El análisis del proteoma se realizó mediante el previamente mencionado marcaje isotópico no radioactivo de los transfectantes en cultivo (SILAC). La lista final obtenida

permitió identificar 890 proteínas con una expresión diferencial en los tres compartimentos celulares analizados (Tabla Suplementaria). Como es habitual en este tipo de análisis, la mayoría de proteínas identificadas en los transfectantes (>4.000) mostraron una ratio en torno a 0 (sin cambios respecto a Mock) (Fig. 20).

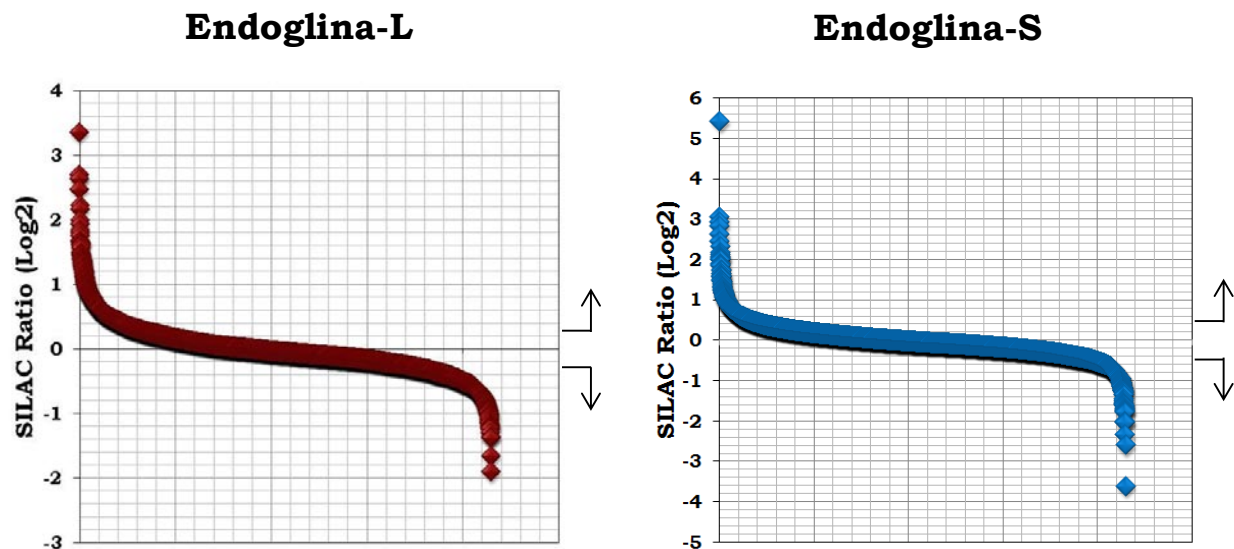


Figura 20. Distribución de los ratios de los datos en crudo del SILAC. Relativizando la lista completa de proteínas obtenidas por espectrometría de masas en los transfectantes L y S a la condición control Mock se obtiene la siguiente distribución. La mayoría de las proteínas identificadas (>4.000) presentan un valor de ratio (Log2) cercano a cero. Las proteínas diferencialmente expresadas en los transfectantes se sitúan en valores superiores a 0,585 e inferiores a -0,322.

La representación de las proteínas en un diagrama de Venn (Fig. 21) muestra un efecto común en algunas de las proteínas que varían su expresión, sugiriendo un efecto en los transfectantes debido al dominio extracelular compartido por ambas isoformas. De hecho, 166 proteínas (26 sobre-expresadas y 140 con menor expresión) se comportan de la misma forma para las isoformas larga y corta. Por otra parte, se identificaron 6 proteínas con una respuesta contraria dependiendo de la isoforma sobreexpresada. Por último, se determinaron un grupo numeroso de proteínas (546) con un comportamiento distinto en EngL (106 inducidas / 143 reprimidas) y EngS (36 inducidas / 261 reprimidas) sugiriendo un efecto exclusivo derivado de la composición diferencial del tallo citoplasmático de endoglina en sus dos isoformas.

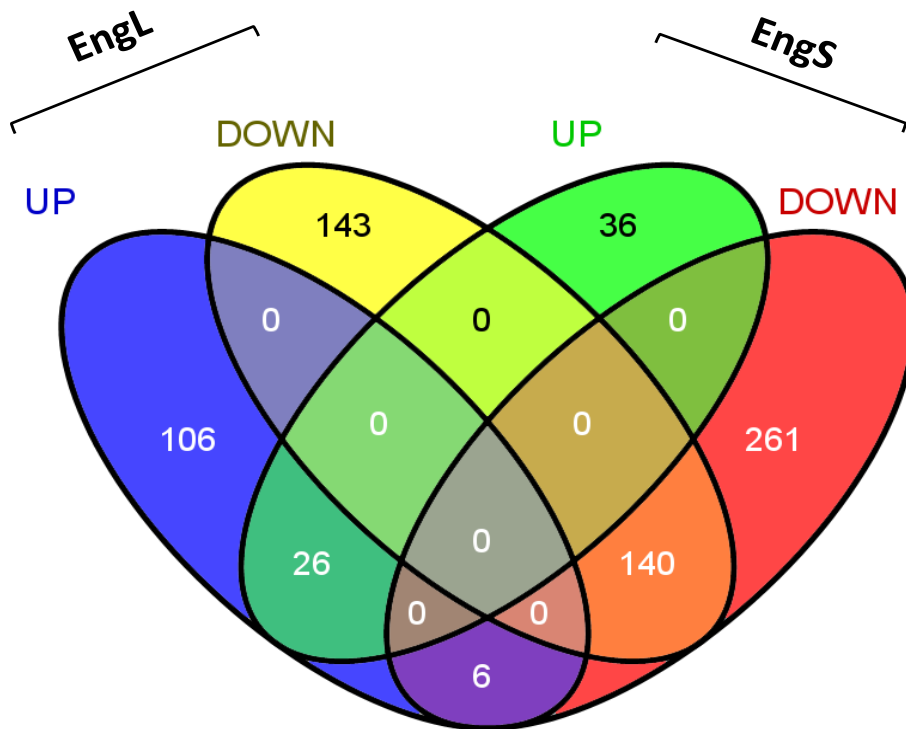
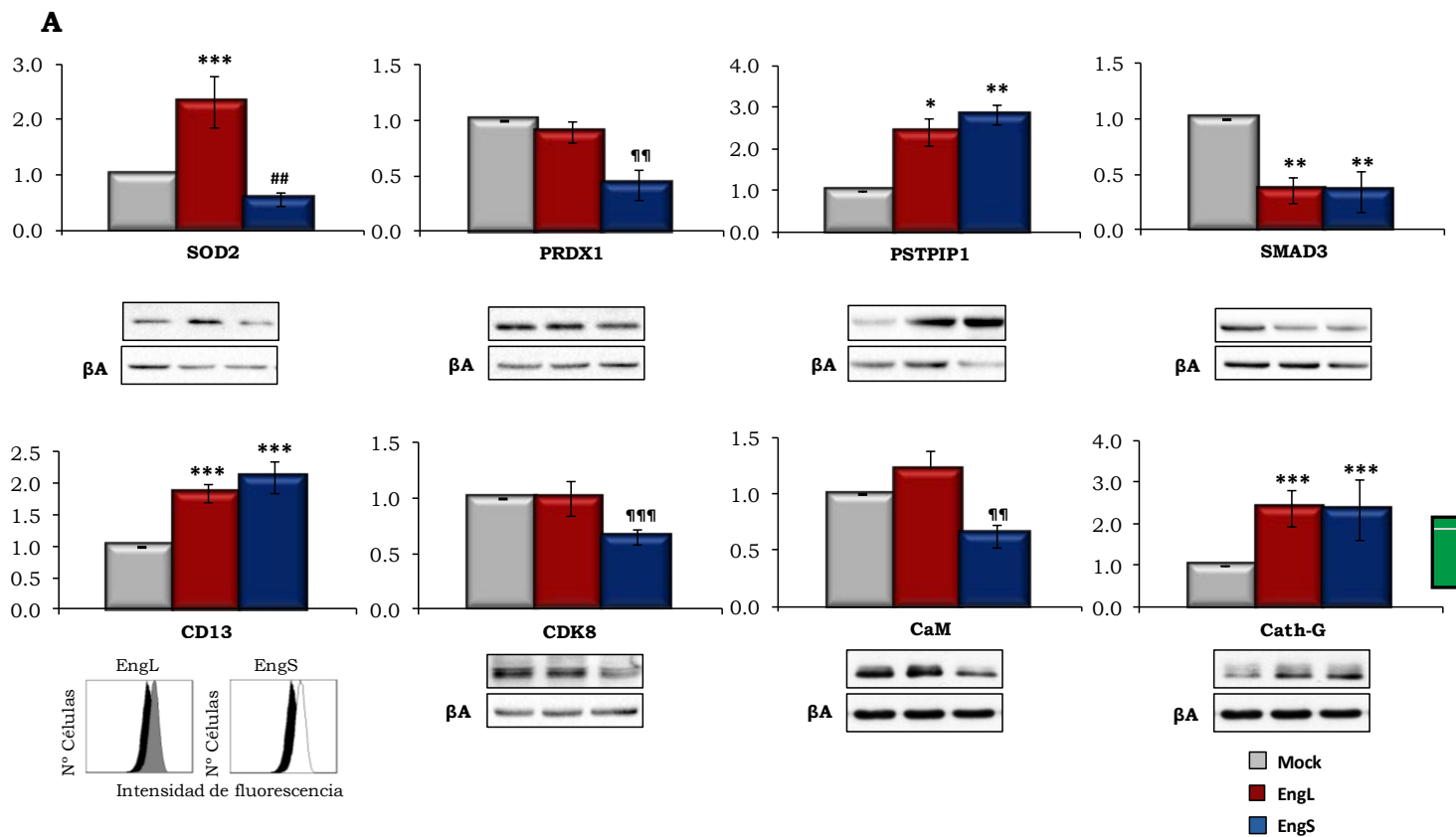


Figura 21. Diagrama de Venn agrupando las proteínas que presentan expresión diferencial en los transfectantes estables de endoglina. Se observa el mismo efecto regulador independientemente de la isoforma transfecteda en 166 proteínas (26 ↑ y 140 ↓ expresadas). Seis proteínas tienen un comportamiento contrario debido a la isoforma EngL o EngS. Un alto número de proteínas (546) muestra una regulación independiente tanto en EngL (106 ↑ y 143 ↓) como en EngS (36 ↑ y 261 ↓).

2.3 Validación del análisis proteómico y estudio bioinformático de las proteínas alteradas

Para confirmar los resultados del análisis por SILAC, se decidió validar los niveles de algunas proteínas diferencialmente expresadas. SMAD3, un factor de transcripción con un papel mediador en la señalización de TGF- β y cuya actividad está modulada por endoglina (Bernabeu *et al.*, 2007). Calmodulina, proteína que une calcio y que regula procesos importantes como la inflamación, el ciclo celular, la apoptosis o la respuesta inmune innata (Racioppi y Means, 2012). CD13, una alanina aminopeptidasa de membrana que es un marcador clásico de células mieloides (Ansorge *et al.*, 2009) o la superóxido dismutasa, enzima encargada de eliminar especies reactivas de oxígeno

(Weyemi *et al.*, 2012). También se validaron algunas proteínas que se encontraban entre las más inducidas o reprimidas dentro del análisis, como Catepsina-G, CDK8 o PSTPIP1.



B

| Proteína | Long/Mock | Short/Mock | Proteína | Long/Mock | Short/Mock |
|----------|-----------|------------|----------|-----------|------------|
| SOD2 | 2,799 | ... | CD13 | 1.651 | 1.659 |
| PRDX1 | ... | 0,725 | CDK8 | ... | 0.634 |
| PSTPIP1 | 3,204 | 2,397 | CaM | ... | 0.794 |
| SMAD3 | 0.606 | 0.740 | Cath-G | 4.547 | 4.809 |

Figura 22. Validación del análisis proteómico. **A.** Niveles de expresión detectados por *western-blot* y citometría de flujo de las proteínas previamente mencionadas. **B.** El valor obtenido con respecto a Mock en el análisis directo, reverso y en la validación mantiene la tendencia observada en el SILAC en lo que se refiere al aumento o la disminución de proteínas debido a la expresión de las isoformas de endogлина. Hay correlación entre el análisis proteómico y los realizados por otras técnicas cuantitativas como el *western-blot* y la citometría de flujo. (*indica significación estadística con respecto a Mock, ¶ respecto a Mock/EngL y # con respecto a EngL).

La espectrometría de masas es una técnica cuantitativa y, como se esperaba, la validación a nivel de proteína (*western-blot* y citometría de flujo) mostró un comportamiento análogo al observado en el análisis proteómico para todas las proteínas

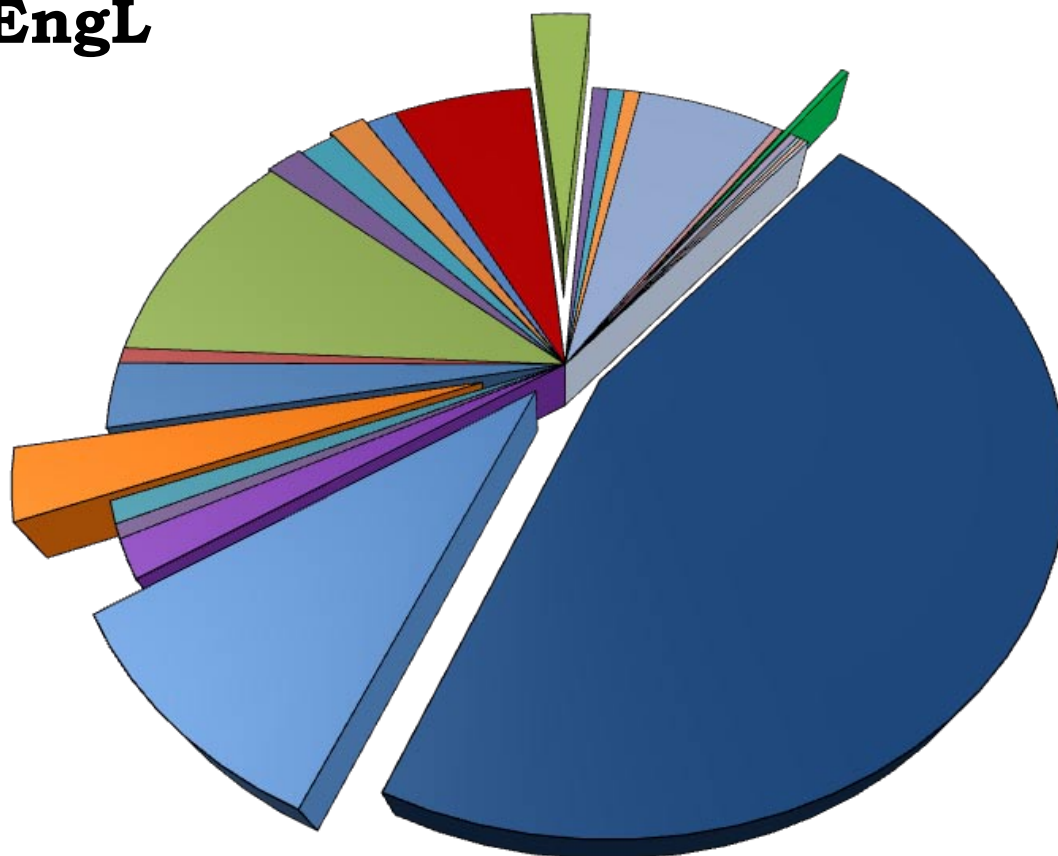
analizadas (Fig. 22). Por ejemplo, se detectaron niveles más bajos de SMAD3 y más altos de CD13 en los transfectantes EngL y EngS, mientras que la expresión de calmodulina no varió significativamente en los transfectantes EngL y sí disminuyó en los transfectantes EngS (Fig. 22).

A continuación, se decidió estudiar algunas de las funciones biológicas alteradas debido a la sobreexpresión de endoglina. El análisis bioinformático mediante el software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) tomando como referencia la *Ingenuity Knowledge Base*, permitió determinar, además de las 10 proteínas más afectadas en ambos transfectantes (Tabla 4), los 25 procesos biológicos más alterados debido a la presencia de las isoformas de endoglina en la línea celular U937 (Fig. 23). Algunos de los procesos alterados en las poblaciones celulares sometidas a estudio (U937-EngL y U937-EngS) fueron el crecimiento y la proliferación, el tráfico de células del sistema inmune, la muerte y supervivencia celular y la homeostasis de radicales libres. Todos ellos son procesos que sufren un deterioro crítico durante el proceso de envejecimiento.

| EngL | | | | EngS | | | |
|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| Up | Ratio | Down | Ratio | Up | Ratio | Down | Ratio |
| Proteína | Ratio | Proteína | Ratio | Proteína | Ratio | Proteína | Ratio |
| MARS2 | 2.875 | LRPAP1* | -1.260 | CTSG* | 2.817 | ANXA2* | -1.810 |
| ARRB1 | 2.853 | TES | -1.248 | PRTN3* | 2.687 | UBASH3B | -1.678 |
| CTSG* | 2.808 | UBASH3B | -1.239 | PSTPIP2* | 2.435 | GGCT | -1.556 |
| PSTPIP2* | 2.133 | APPL1 | -1.229 | SRP19 | 2.293 | RAB27B | -1.393 |
| DAK | 1.974 | VIM* | -1.220 | TRIM27 | 2.026 | CC2D1A | -1.335 |
| IL4I1 | 1.887 | LIG1* | -1.220 | CDA | 1.98 | CTR9 | -1.292 |
| SRP54 | 1.827 | DHPS | -1.209 | NR2F2 | 1.633 | S100A11 | -1.266 |
| NR2F2 | 1.762 | FBXO4 | -1.208 | COPS5 | 1.419 | IQGAP3 | -1.262 |
| CST7* | 1.711 | RPL15 | -1.202 | C11orf31 | 1.41 | LIG1* | -1.239 |
| PSTPIP1 | 1.680 | DCTPP1* | -1.143 | CST7* | 1.381 | BRD3 | -1.218 |

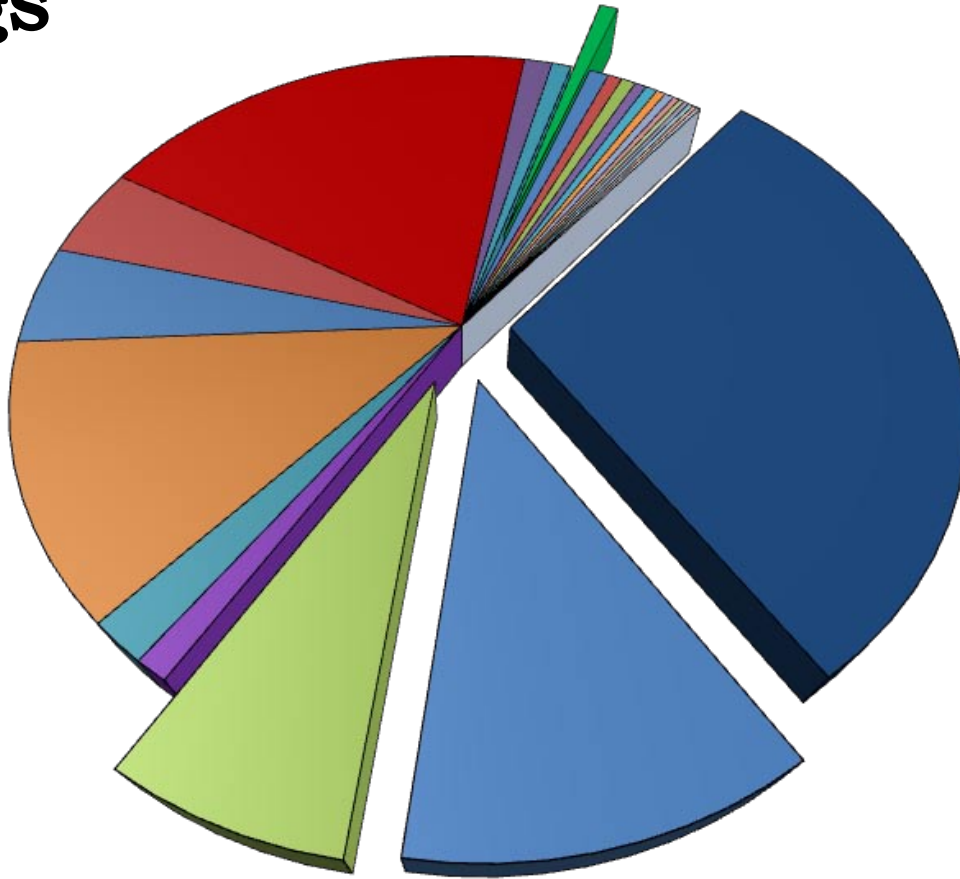
Tabla 4. Listado de las 10 moléculas más inducidas y reprimidas en los transfectantes de endoglina larga y corta. Las proteínas con un comportamiento análogo en las dos isoformas de endoglina están marcadas con un asterisco.

EngL



- | | |
|--|---|
| ■ Supervivencia y muerte celular * | ■ Crecimiento celular y proliferación * |
| ■ Ensamblaje celular y organización | ■ Mantenimiento celular |
| ■ Compromiso celular | ■ Eliminación de radicales libres # |
| ■ Replicación, recombinación y reparación de ADN | ■ Metabolismo de aminoácidos |
| ■ Enfermedad infecciosa | ■ Trastorno de desarrollo |
| ■ Disfunción hereditaria | ■ Enfermedad respiratoria |
| ■ Enfermedad inmunológica | ■ Cáncer |
| ■ Ciclo celular * | ■ Enfermedad gastrointestinal |
| ■ Transporte de moléculas | ■ Bioquímica de moléculas pequeñas |
| ■ Enfermedad hematológica | ■ Interacción y señalización célula-célula |
| ■ Táctico de células del sistema inmune * | ■ Modificaciones post-traduccionales de ARN |
| ■ Metabolismo de carbohidratos | ■ Desarrollo y función del tejido conectivo |
| ■ Desarrollo del sistema muscular y esquelético | |

EngS



- Supervivencia y muerte celular *
- Ciclo celular *
- Replicación, recombinación y reparación de ADN
- Enfermedad infecciosa
- Cáncer
- Interacción y señalización célula-célula
- Desarrollo de tejido
- Trastornos esqueléticos y musculares
- Enfermedad gastrointestinal
- Plegado de proteínas
- Patologías dermatológicas
- Enfermedades hereditarias
- Expresión génica
- Crecimiento celular y proliferación *
- Ensamblaje celular y organización
- Enfermedad hematológica
- Desarrollo celular
- Movimiento celular
- Tráfico de células del sistema inmune *
- Trastornos de tejido conectivo
- Enfermedad dental
- Modificaciones Post-traduccionales
- Respuestas de hipersensibilidad
- Trastornos de desarrollo
- Morfología celular

Figura 23. Análisis bioinformático (IPA) de la lista proteómica obtenida mediante SILAC. Utilizando como referencia la base de datos "Ingenuity Knowledge Base (Genes Only)" se establecieron las relaciones directas e indirectas con alta evidencia experimental y predictiva. Se muestran las 25 funciones más afectadas en ambos transfectantes en un rango de significación estadística de $p < 1,19 \times 10^{-9}$ y $p < 2,98 \times 10^{-2}$. * Biofunciones afectadas en ambas isoformas. # Ejemplo de función alterada exclusivamente en EngL. El área de cada porción (número de proteínas) se relaciona con el número de proteínas alteradas en cada proceso pero no necesariamente con la significación del mismo.

Para confirmar que estos procesos biológicos estaban realmente alterados en los transfectantes estables, se realizaron una serie de análisis funcionales. La alta significación estadística de la función denominada "tráfico de células inmunes" se debió mayoritariamente a una marcada reducción de integrinas (subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ y $\alpha 5$) en los dos transfectantes de endoglina (Tabla suplementaria y Fig. 24A). De entre ellas, la integrina $\alpha 5$ fue la que presentaba una mayor disminución en su expresión (Ratio log: endoglina-L:-0,827; endoglina-S:-0,881). De este modo, se postuló la posibilidad de una menor adhesión de los transfectantes al sustrato específico de esta integrina, la fibronectina. Los ensayos de adhesión mostraron, de hecho, una menor capacidad de unión al sustrato en comparación a las células control a lo largo del tiempo (Fig. 24B). Estos datos sugieren que la sobre-expresión de ambas isoformas en células monocíticas reduce la adhesión a matriz extracelular de fibronectina.

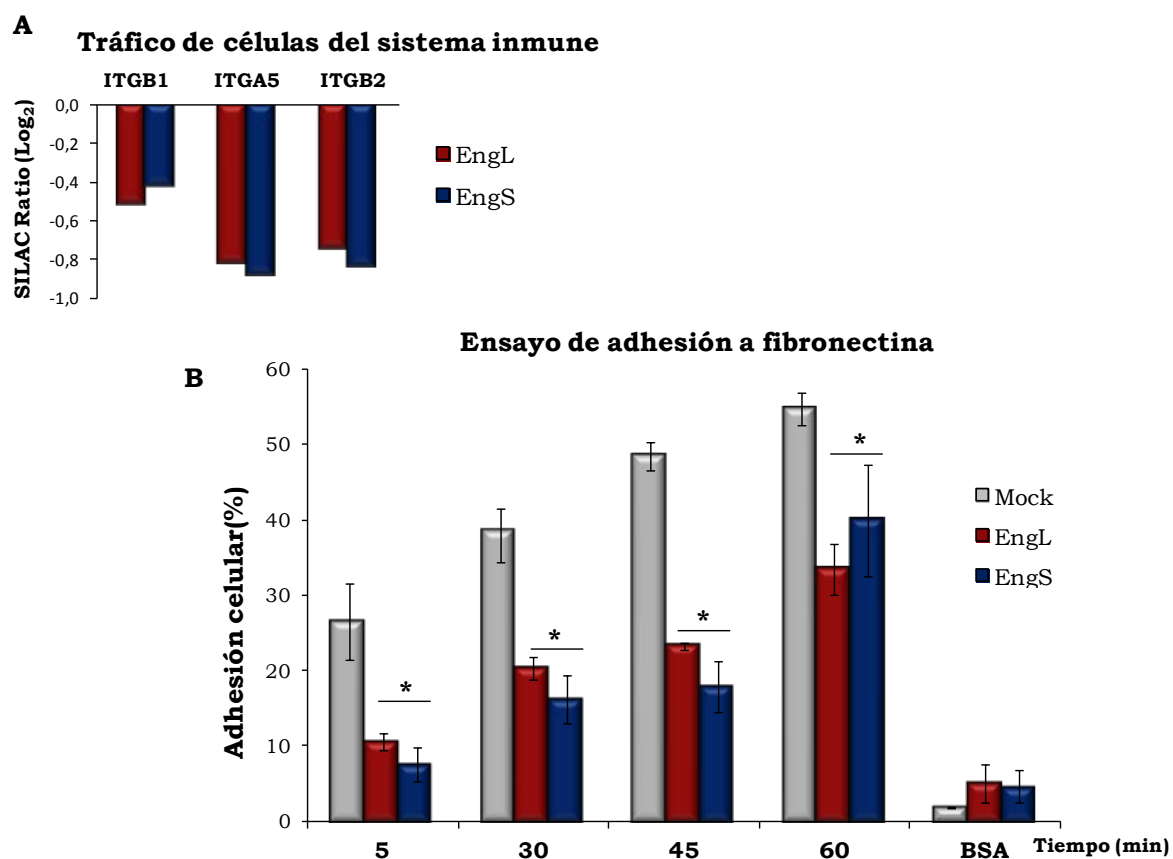


Figura 24. Niveles de integrinas y adhesión celular. **A.** Ratio obtenida en el análisis SILAC en escala logarítmica (Log₂). Se observa un descenso en los niveles de las tres integrinas detectadas, siendo la ITGA5 (ITGA5; EngL:-0,827 y EngS:-0,881) la que presentaba una mayor disminución. **B.** El ensayo funcional mide la capacidad de los transfectantes de adherirse a fibronectina, sustrato preferente de la ITGA5, a distintos tiempos. El resultado se mide por la intensidad de la señal de las células adheridas previamente marcadas con la sonda fluorescente CFSE.

El análisis IPA mostró también como un proceso significativamente alterado el ciclo celular. La significación estadística asociada fue mucho más evidente en EngS (valor p más bajo: $4,76 \times 10^{-6}$) que la observada en EngL (valor p más bajo: $3,99 \times 10^{-4}$). Estos valores concuerdan con un descenso exclusivo en los transfectantes de la isoforma corta de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK1, CDK7 o CDK8) así como de proteínas reguladoras de ciclo como pueden ser CDC20 o calmodulina (Fig.25A). De hecho, en el ensayo de proliferación realizado con los transfectantes se observa un ritmo reducido de crecimiento en EngS (Fig. 25A). Este ritmo retardado se aprecia a las 24 horas de la sincronización haciéndose más evidente a las 48 horas.

La muerte celular y la supervivencia fueron otra de las funciones biológicas afectadas en los transfectantes de endoglina. En lo que se refiere a la muerte celular por apoptosis, se observó un comportamiento opuesto en función de la isoforma transfectada. Así, proteínas pro-apoptóticas como BID, DFFA, o MST4 presentan menos niveles de expresión únicamente en los transfectantes de EngL; y lo mismo sucede en proteínas protectoras para la apoptosis como GSN o MAVS que tienen una mayor expresión en la isoforma larga que en el control (Fig. 25B). Por el contrario, en los transfectantes de la isoforma corta, proteínas protectoras y anti-apoptóticas como PRDX1, TXN, UBE2V1 y URI1 están reducidas con respecto al control Mock. Estos datos sugieren que los transfectantes EngS podrían tener peor supervivencia frente a un estímulo apoptótico. Para confirmarlo, se estudió el efecto de GM-CSF, citoquina que tiene un efecto apoptótico en la línea celular U937 (Okuma *et al.*, 2000). Como se muestra en la figura 25B, los transfectantes EngS presentaron una menor tasa de supervivencia que los de la condición control y los transfectantes EngL, para las tres dosis de citoquina seleccionadas. Los transfectantes de la isoforma larga presentaron una mejor (aunque no significativa) supervivencia que las células control.

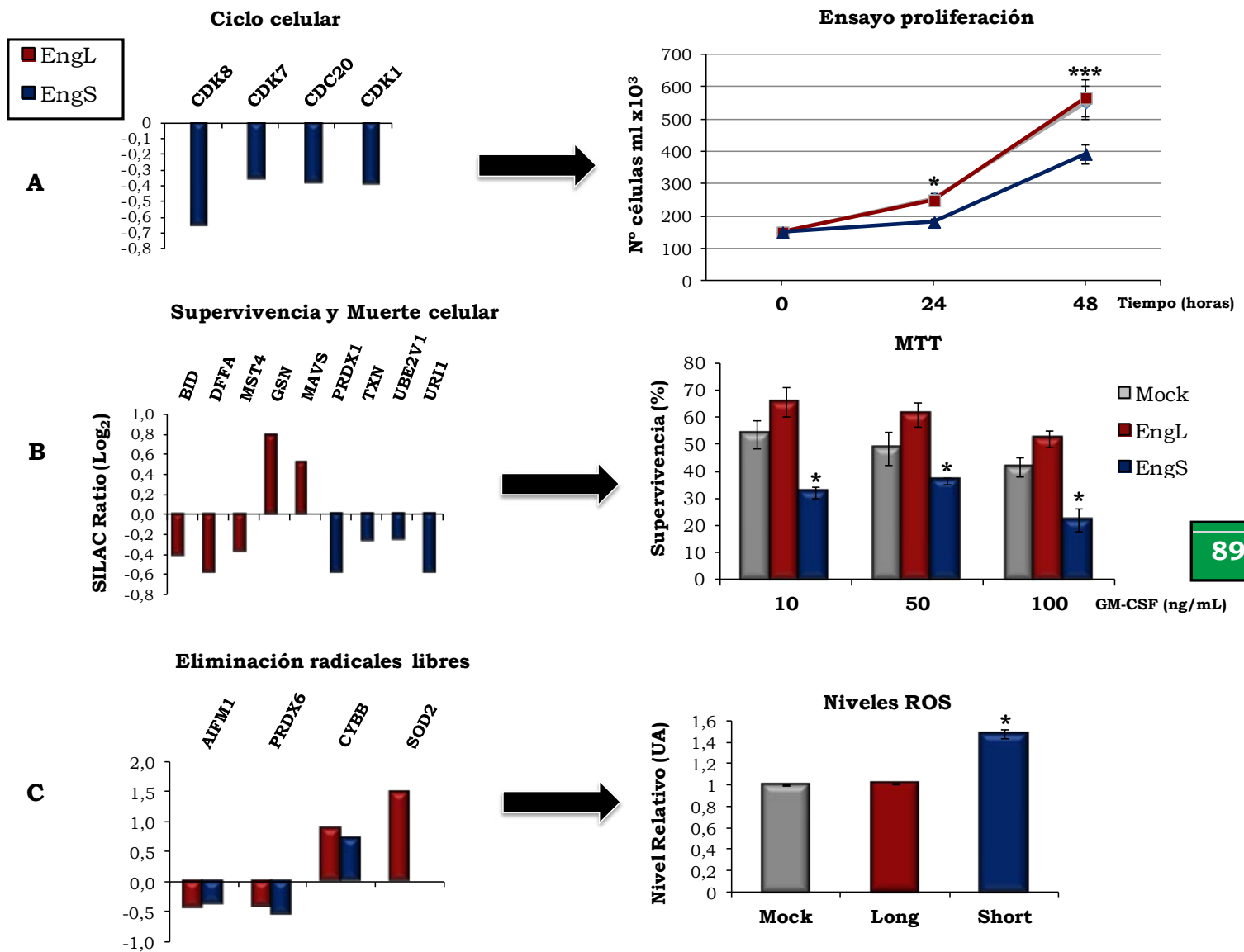


Figura 25. Ensayos funcionales de procesos afectados exclusivamente en una de las isoformas de endoglina. A. Proteínas relacionadas con ciclo celular y proliferación. Las ratios obtenidas por SILAC muestran una menor expresión de CDK8, CDK7, CDC20 y CDK1 debidos a la isoforma corta de endoglina (Tabla Suplementaria). Como consecuencia se observa una tasa de proliferación significativamente disminuida en los transfectantes sEng en comparación con las otras dos condiciones. **B. Proteínas relacionadas con supervivencia celular y apoptosis.** En el análisis proteómico se identificaron ratios variables en BID, DFFA, MST4, GSN, MAVS, PRDX1, TXN, UBE2V1 y URI1, proteínas involucradas todas ellas en regular la supervivencia celular. El tratamiento de las distintas poblaciones de U937 con GM-CSF y su posterior análisis por MTT muestran una supervivencia disminuida en los transfectantes de endoglina corta debido al desequilibrio de las proteínas mencionadas. **C.** Otro de los procesos alterados debido a las variaciones de expresión de proteínas como AIFM1, PRDX6, CYBB y SOD2 fue la homeostasis de radicales libres. La medida de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tres transfectantes mostró un desequilibrio en los niveles acumulados debido a la sobreexpresión de endoglina corta (referido al control Mock).

El estudio proteómico realizado mediante SILAC, sugería también que el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno estaba afectado en ambos transfectantes (Fig. 25C). Proteínas encargadas de mantener la homeostasis redox como AIFM1 o la proteína antioxidante PRDX6 estaban menos expresadas debido a la sobreexpresión de endogлина. La proteína NADPH oxidasa CYBB estaba inducida tanto en EngL como en EngS. Con estos datos se podría postular que la transfección de endogлина (independientemente de su isoforma) podría tener como consecuencia una mayor acumulación de ROS. Sin embargo, esta acumulación podría estar parcialmente compensada debido a un aumento significativo de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) en los transfectantes EngL, lo que contribuiría al proceso que el IPA denomina *free radical scavenging* (Fig. 25C). Esta hipótesis va en consonancia con las medidas de ROS realizados en los transfectantes y en la condición control en las que se observa que los transfectantes EngS presentan niveles de ROS más elevados que las otras dos poblaciones celulares. La información obtenida en el análisis bioinformático y su posterior validación funcional sugieren que la expresión de ambas isoformas está afectando a procesos celulares relacionados con el envejecimiento.

2.4 Isoformas de endogлина y polarización de macrófagos

Hay evidencias de que la edad puede contribuir a una polarización deficiente de los macrófagos en los dos fenotipos generales M1 y M2 (Mahbub *et al.*, 2012). Habiendo comprobado la sobreexpresión de EngS en la senescencia asociada al envejecimiento en modelos *in vivo* e *in vitro* (Fig. 16, 17, 18), se decidió estudiar el papel que podrían tener las isoformas de endogлина en los transfectantes al forzar su diferenciación con PMA (Cabanas *et al.*, 1990). Las células U937 control, EngS y EngL se trataron con PMA y se analizaron por PCR cuantitativa para determinar los niveles de transcripción de genes marcadores del fenotipo M1 o M2 (Fig. 26). La expresión de genes típicos de la respuesta pro-inflamatoria (M1) como *IL-6*, *IL23A* o *IL12A* presentaban mayores niveles en la condición control y en los transfectantes de la isoforma larga. Por el contrario, *MAFB*,

STAB1 o *SERPINB2* estaban más representados en los transfectantes de la isoforma corta, siendo estos genes característicos de la respuesta anti-inflamatoria M2. Por tanto, a nivel de transcriptómica, la presencia de endoglina corta parece favorecer la polarización hacia un fenotipo M2 mientras que la isoforma larga no parece tener un efecto tan significativo en la expresión de los mencionados marcadores de polarización. Las diferencias observadas ponen de manifiesto la importancia de las capacidades señalizadoras exclusivas de cada isoforma.

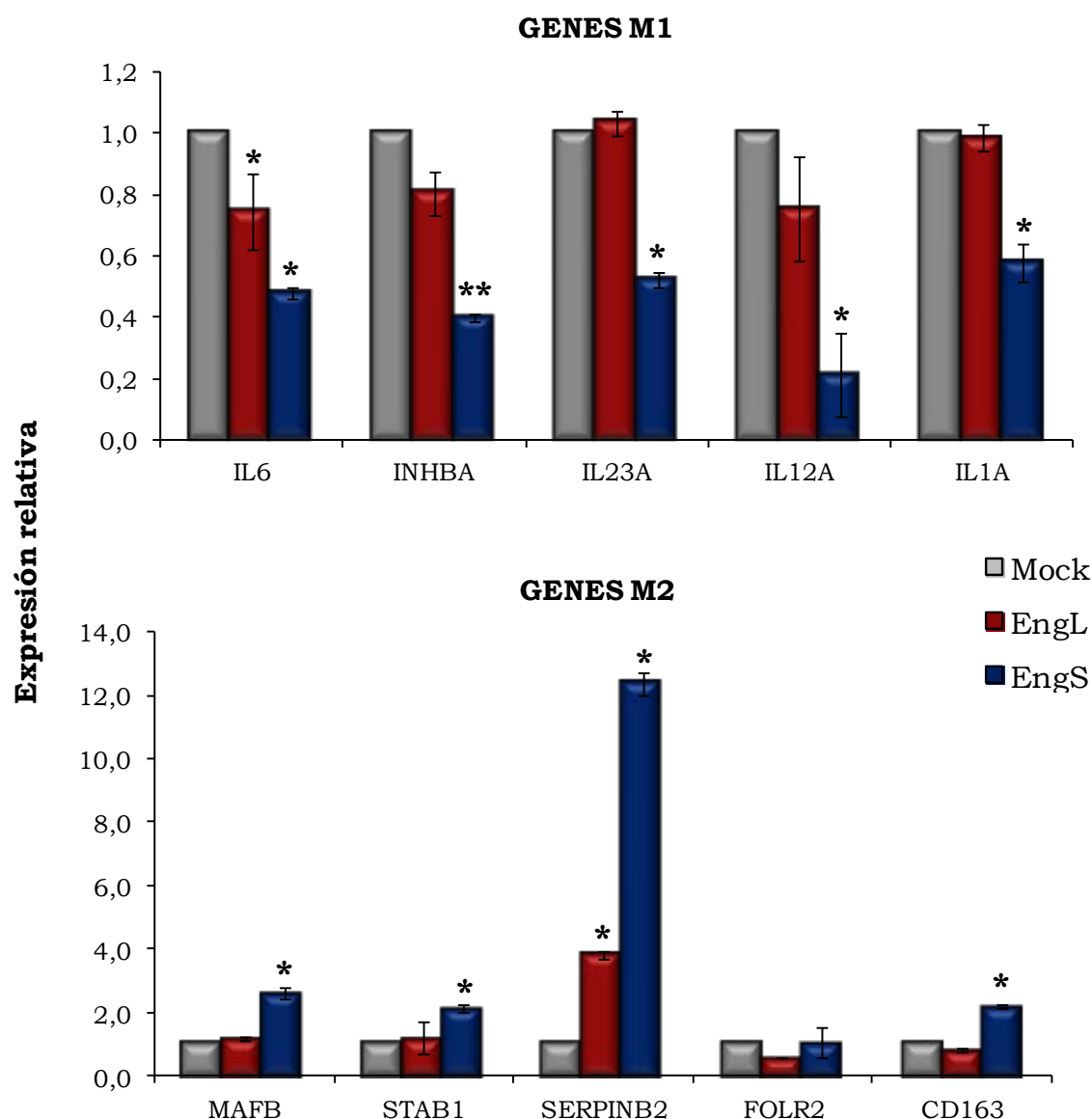


Figura 26. Polarización de los transfectantes estables de endoglina. El análisis de los patrones de expresión de genes típicos de macrófagos de M1 o M2 en los transfectantes tratados con PMA, mostró un comportamiento diferencial en función de la isoforma sobreexpresada. Después de 3 días en cultivo se observaron (con respecto a Mock) cambios significativos en genes pro-inflamatorios (*IL6*, *INHBA*, *IL23A*, *IL2A* y *IL1A*) y anti-inflamatorios (*MAFB*, *STAB1*, *SERPINB2*, *FOLR2* y *CD163*).

Al observarse que la diferenciación dependiente de PMA de la línea U937 constituye un buen modelo de diferenciación en los transfectantes, se decidió utilizar este sistema para evaluar el potencial de las isoformas de endoglina en la polarización de células mieloides. En este sentido se evaluó la respuesta de los transfectantes a LPS (lipopolisacárido de membrana de bacterias Gram negativas), que favorece la liberación de citoquinas al sobrenadante de las células en cultivo (Fig. 27). El análisis de las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por los transfectantes mostró una capacidad distinta dependiendo de la isoforma sobreexpresada. En consonancia con el perfil transcriptómico observado, los transfectantes de la isoforma corta presentaron una capacidad de respuesta inflamatoria deficiente en comparación a las células control mock y los transfectantes de EngL.

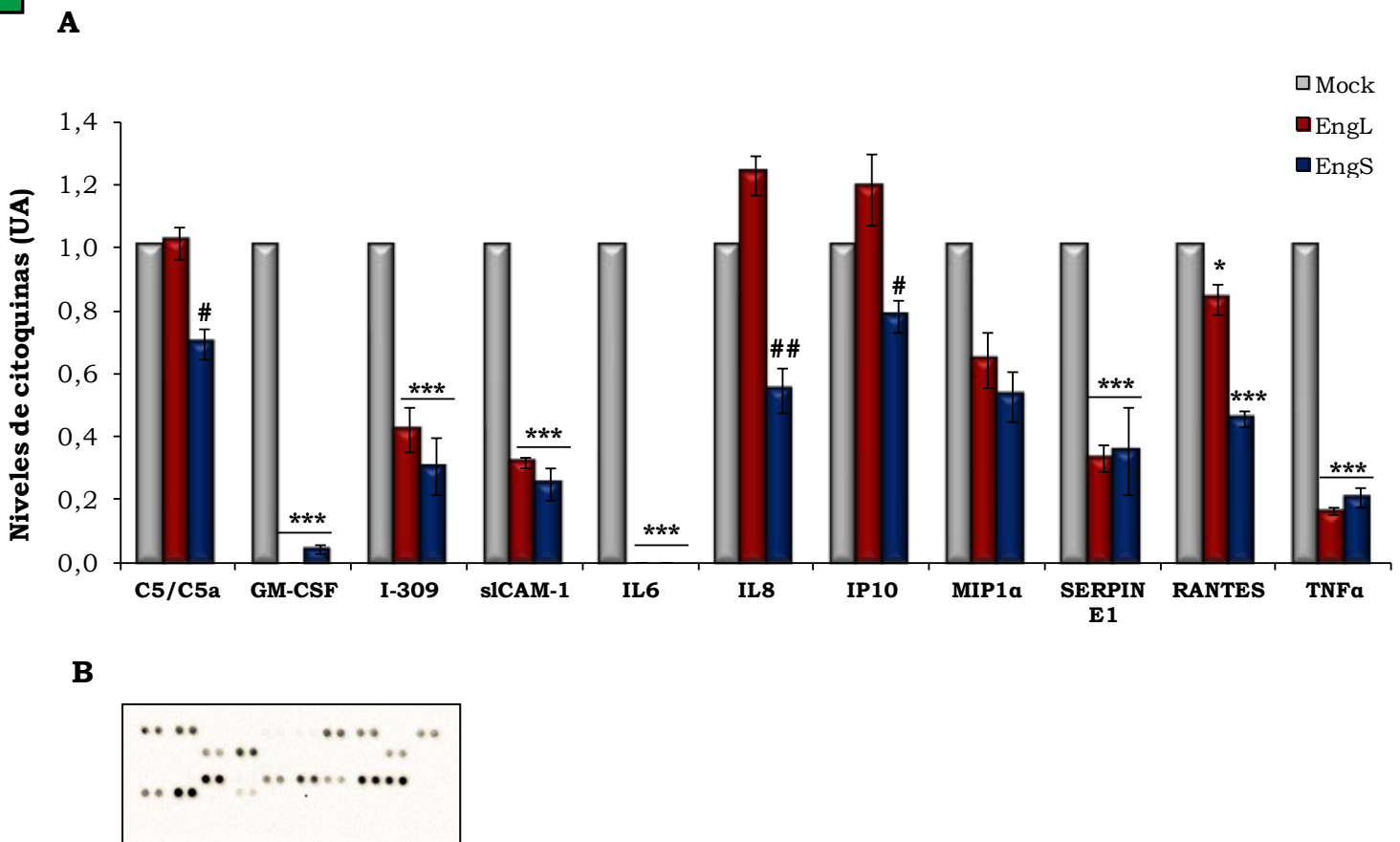


Figura 27. Niveles de citoquinas secretadas por los transfectantes estables de endoglina. Las citoquinas inflamatorias secretadas al medio se analizaron con un kit de captura a anticuerpos inmovilizados en una membrana de celulosa o *dot blot*. **A.** La sobreexpresión de ambas isoformas de endoglina dificulta la típica respuesta inflamatoria que sí observamos en las células control. A pesar de ser un efecto común a ambas isoformas de endoglina, el efecto inhibitorio en la respuesta parece ser más acusado en los transfectantes de la isoforma corta. **B.** Membrana representativa del experimento *dot blot*.

Por último se analizó la base molecular subyacente del papel de endoglina en la polarización de macrófagos. Es conocido que la activina-A es una citoquina clave en este proceso puesto que promueve un fenotipo pro-inflamatorio e inhibe a la vez la adquisición de marcadores anti-inflamatorios (Sierra-Filardi *et al.*, 2011). Debido a que el análisis génico de los transfectantes mostraba una expresión diferencial de *INHBA*, decidimos estudiar estas diferencias a nivel de proteína. Por razones técnicas no se incluyó el análisis del secretoma en el análisis de SILAC. Por este motivo se analizaron los sobrenadantes de los tres tipos celulares por ELISA. Como se muestra en la figura 28, los niveles de activina-A son más elevados en los transfectantes EngL, mientras que las células que sobre-expresan EngS presentaron unos niveles claramente más bajos que la condición control. Todos estos datos en su conjunto sugieren que, en lo referente a la polarización, las células monocíticas con sobre-expresión de endoglina larga tienden a un fenotipo pro-inflamatorio M1, mientras que la expresión de la isoforma corta favorece el proceso de polarización a un fenotipo M2.

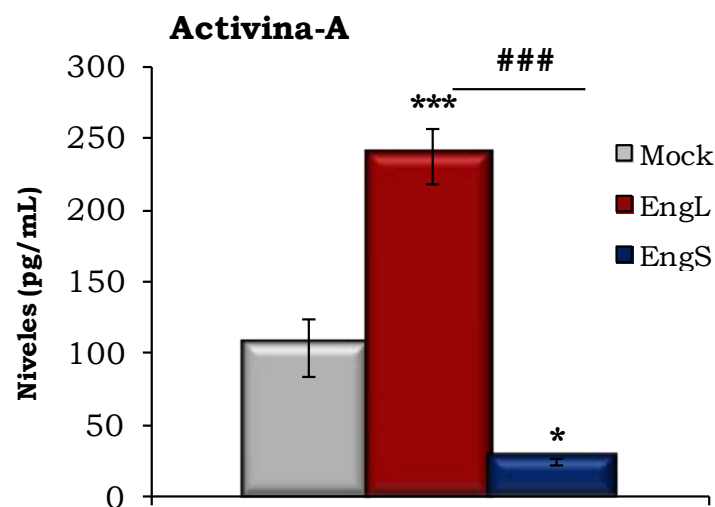


Figura 28. Niveles de activina en el sobrenadante de los transfectantes estables. La activina secretada por los transfectantes de endoglina en estado basal se determinó analizando los sobrenadantes por ELISA. La isoforma larga de endoglina aumenta los niveles de activina-A, mientras que la isoforma corta de la proteína inhibe su expresión, si se comparan ambas con la situación control Mock.

3. Polarización de macrófagos y endoglina soluble

3.1 Endoglina soluble en macrófagos M1 y M2

Además de anclada a membrana en sus dos isoformas (larga y corta), existe una tercera forma de endoglina generada por corte proteolítico, la endoglina soluble. Dentro del estudio diferencial del papel de endoglina en el linaje mieloide se consideró relevante analizar si existía un patrón diferencial en la forma soluble dentro de las poblaciones de macrófagos previamente descritas.

Los monocitos humanos obtenidos de donantes sanos y polarizados *in vitro* con M-CSF (M2) y GM-CSF (M1), presentaron niveles distintos de endoglina soluble (sEng) en el estado final de diferenciación (Fig. 29A). Los macrófagos polarizados a M1 mostraron niveles superiores a 200 pg/mL mientras que los polarizados hacia un fenotipo M2 apenas tuvieron niveles detectables de la proteína.

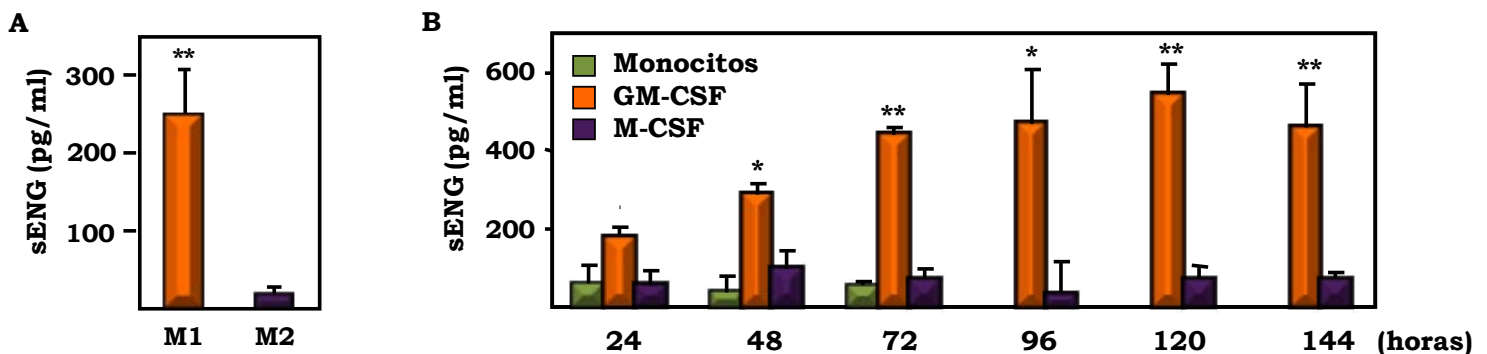


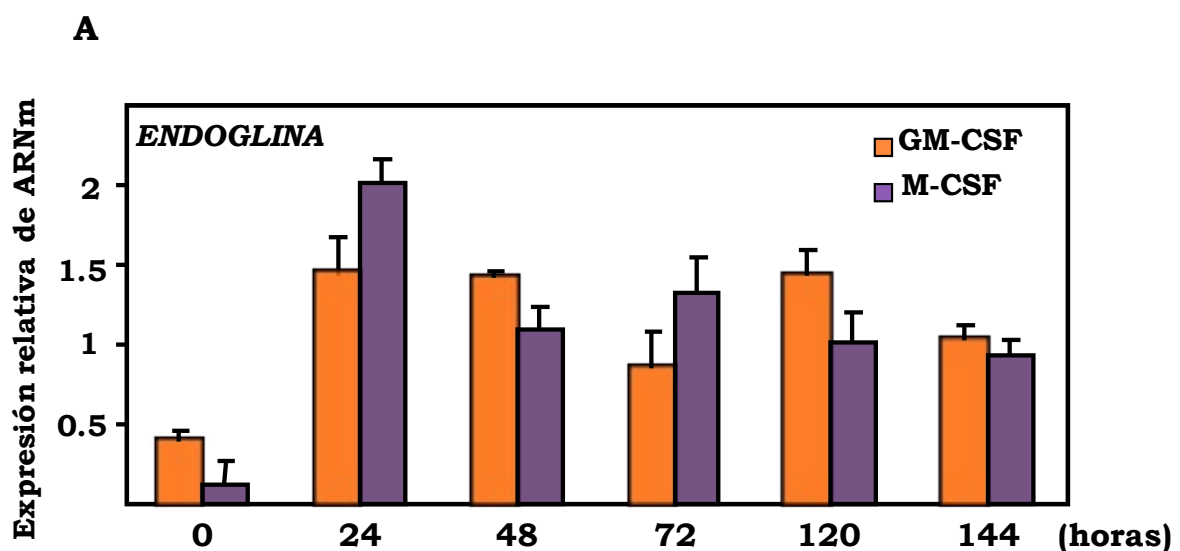
Figura 29. Endoglina soluble en poblaciones de macrófagos M1 y M2 polarizados *in vitro*. **A.** Los niveles de sEng en los macrófagos M2 totalmente polarizados están en el límite de detección del kit. **B.** Los niveles de endoglina soluble detectados por ELISA son más elevados en los monocitos estimulados por GM-CSF que en los monocitos del mismo donante estimulados con M-CSF.

Analizando los niveles durante el proceso de diferenciación se observó que el efecto parece ser acumulativo y cuantificable en la transición monocito-macrófago. Los niveles de endoglina en monocitos no estimulados por citoquinas permanecieron por debajo del límite de detección del kit de ELISA (Fig. 29B).

3.2 Niveles de expresión de endoglina en la polarización de macrófagos

M1/M2

A pesar de las diferencias notables en la cantidad de endoglina soluble, las poblaciones de macrófagos M1 y M2 no presentaron una expresión diferencial a nivel transcripcional. Analizando la expresión de ARNm durante el proceso de polarización, no se aprecian diferencias asociadas al tratamiento por GM o M-CSF (Fig. 30A). Al tener un nivel de transcripción parecido, la cantidad de endoglina detectada en membrana fue relativamente similar en ambos fenotipos de macrófago (Fig. 30B). De hecho, los niveles en la población de macrófagos M1 fueron significativamente inferiores a los detectados en la población de M2. Este hecho no tiene relación con el grado de diferenciación puesto que el marcador de diferenciación del linaje mieloide, CD11b, no presentó una expresión distinta. Al no haber diferencias significativas en el nivel expresión de ARNm pero sí apreciarse una disminución en la cantidad total de endoglina de membrana, se postuló que podría existir un mecanismo postraduccional subyacente a la diferencia observada en los niveles de endoglina soluble, que son claramente detectables en los macrófagos M1-GM-CSF pero que apenas son medibles en las poblaciones M2-M-CSF.



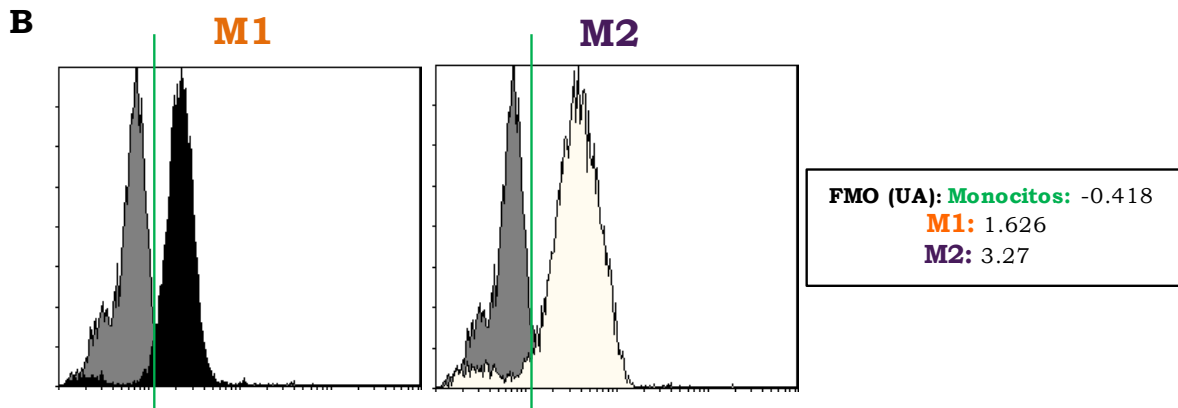
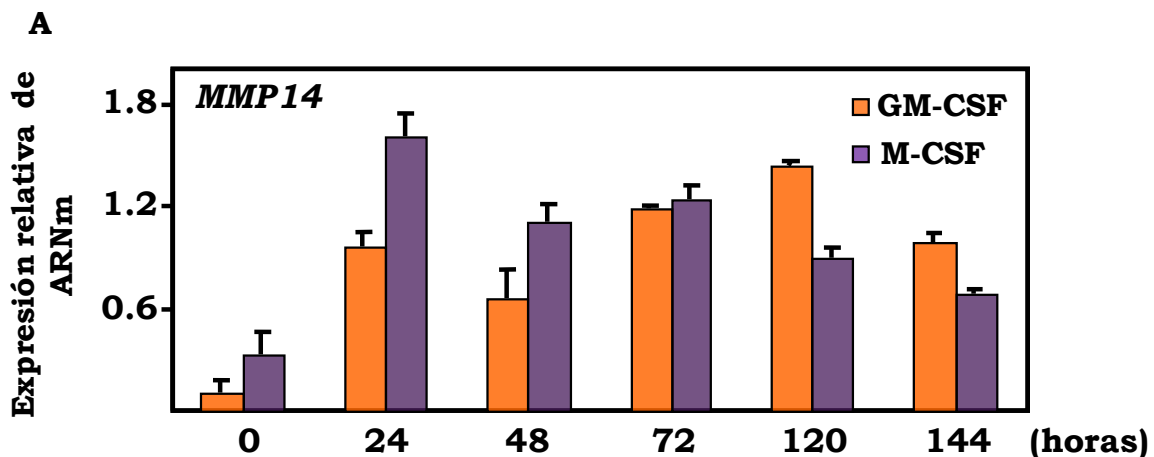


Figura 30. Niveles de endoglina a nivel de ARNm y de proteína de membrana. A. El análisis por qPCR de los transcritos de endoglina no mostró diferencias entre las poblaciones GM-CSF y M-CSF. **B.** La expresión de endoglina de membrana detectada por citometría de flujo presentó un nivel superior en los macrófagos M2.

3.3 Metaloproteasas en la polarización de macrófagos

Hasta el momento se ha descrito que la liberación de la forma soluble de endoglina está mediada por la actividad proteolítica de una metaloproteasa de membrana, MMP14. Curiosamente, no se observó un patrón de expresión diferencial de la misma en la transición monocito-macrófago de las poblaciones diferenciadas con GM o M-CSF (Fig. 31A). De hecho, la metaloproteasa que presentó una diferencia de expresión más clara entre macrófagos M1 y M2 fué la metaloelastasa MMP12 (Fig. 31B). Esta proteasa soluble estaba claramente sobre-expresada en macrófagos pro-inflamatorios (M1).



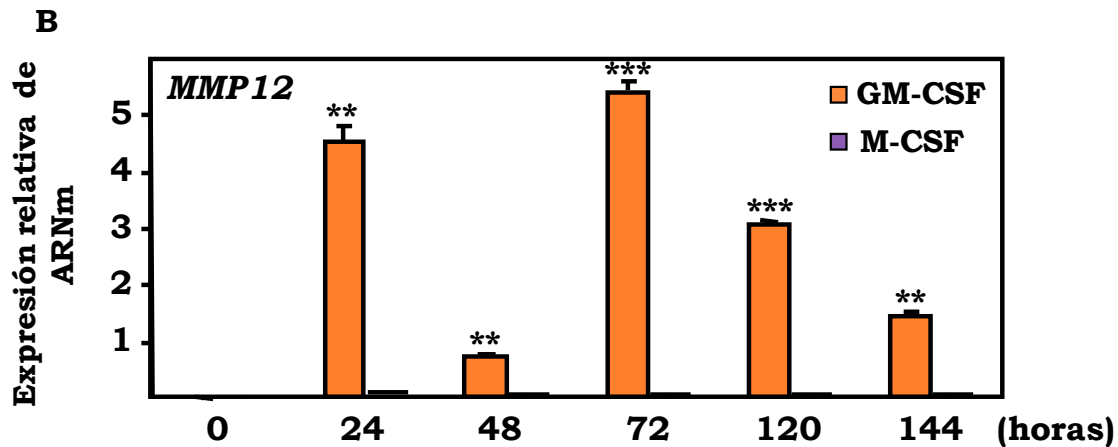


Figura 31. Niveles de transcripción de MMP12 y MMP14 en macrófagos M1 y M2. A. No se apreciaron diferencias de expresión de ARNm para MMP14 entre las dos poblaciones de macrófagos durante el proceso de diferenciación. **B.** La diferencia en lo referente a MMP12 fue muy significativa, siendo su expresión mucho mayor en macrófagos M1. Su inducción está directamente relacionada con el tratamiento de GM-CSF (0 y 48 horas).

Siendo tan patentes los altos niveles de expresión de MMP12 como marcador de polarización M1 y la ausencia total de esta metaloproteasa en la polarización inducida a M2, se propuso esta metaloelastasa dependiente de GM-CSF como una posible candidata para explicar las variaciones de endoglina soluble presentes en macrófagos pro- y anti-inflamatorios.

3.4 Ensayos de actividad con MMP12 recombinante

En primer lugar, se realizaron ensayos libres de células (*in vitro*) con MMP12 recombinante comercial, que mostró una alta actividad de corte frente al péptido fluorogénico específico. (Fig. 32). La fluorescencia asociada a la forma inactiva de la proteína se consideró como la condición de actividad cero. El inhibidor específico de MMP12, MMP408, resultó muy eficaz disminuyendo significativamente (casi un 80%) la capacidad de la metaloproteasa de digerir el péptido fluorogénico. También es notable la inhibición significativa obtenida utilizando los péptidos específicos de la región extracelular de endoglina, P583 y P452, los cuales tienen un efecto similar al reportado previamente para MMP14 (Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Estos datos sugieren por un lado,

que los puntos de corte para MMP12 pueden ser los mismos que los descritos para MMP14, y que MMP408 es un buen inhibidor de la actividad proteolítica de MMP12.

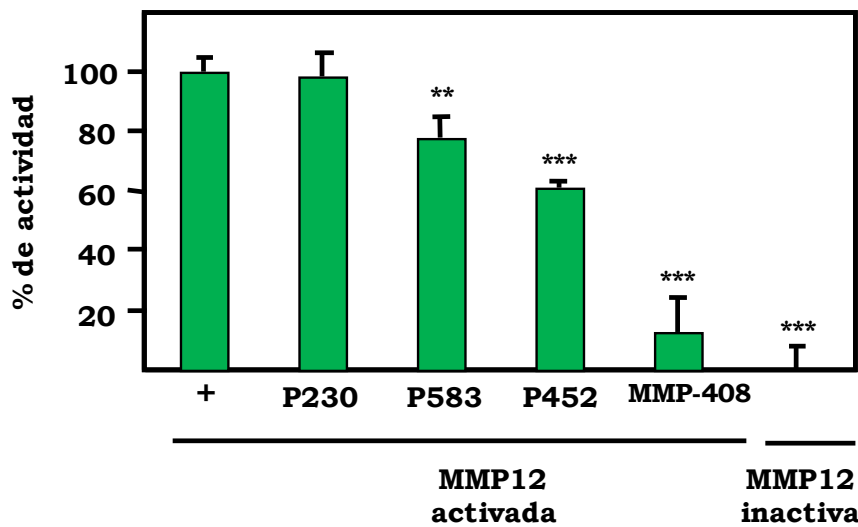


Figura 32. Ensayo *in vitro* de la actividad de MMP12 recombinante. La MMP12 recombinante pre-activada presentó alta actividad frente al péptido fluorogénico (+). Tanto el inhibidor químico (MMP-408) como los péptidos de endogлина (P583,P452), fueron capaces de inhibir o disminuir la actividad (por competición) respectivamente. El péptido P230, que actúa como control negativo, no tuvo ningún efecto en el proceso de digestión (no compitió como sustrato de MMP12 activada).

Posteriormente, se estudió la actividad de MMP12 secretada al medio extracelular. Para ello, se emplearon células COS7 transfectadas con el vector de expresión de MMP12 (pcDNA3,1-MMP12), y se analizó la actividad mediante zimografía, utilizando como sustrato la caseína. La actividad caseinolítica de la metaloproteasa secretada se hizo patente en las bandas de digestión observadas en el gel. El patrón de digestión fue similar al observado aplicando la misma técnica a los sobrenadantes de macrófagos M1 (Fig. 33). De este modo, se observan dos bandas compartidas alrededor de los 100 y los 30 kDa. También se observa una banda típica de digestión para MMP12 de 21kDa en las células COS7-MMP12. Los sobrenadantes de macrófagos M2 no mostraron la misma actividad caseinolítica exclusiva. La coincidencia en las bandas de digestión en las células transfectadas y en macrófagos M1 confirman la secreción común de MMP12 al medio de cultivo.

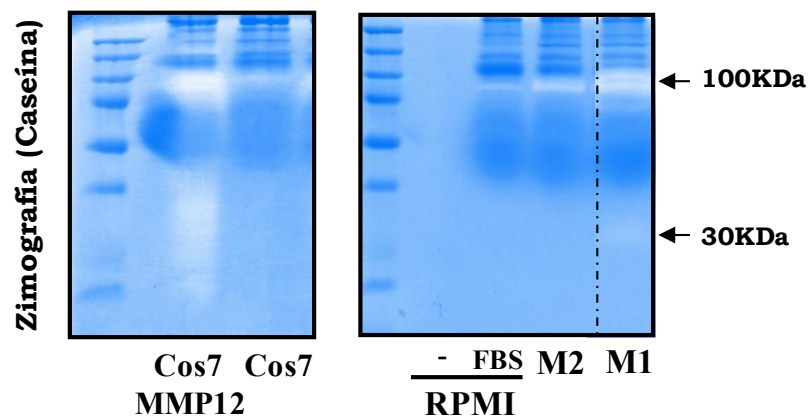


Figura 33. Zimografía de caseína. La actividad caseinolítica observada en las células COS7-MMP12 (Panel izquierdo) fue similar al observado en los sobrenadantes de macrófagos M1 (panel derecho). No se aprecia actividad diferencial en macrófagos M2 ni en los medios de cultivo no condicionados.

Además de comprobar que MMP12 expresada por el vector era una forma activa de la proteína, se quiso comprobar que MMP12 era capaz de cortar endoglina de membrana en las células en cultivo. Para ello se cotransfectó la línea celular COS7 con el vector de expresión de MMP12 y un vector de expresión de endoglina (Fig. 34).

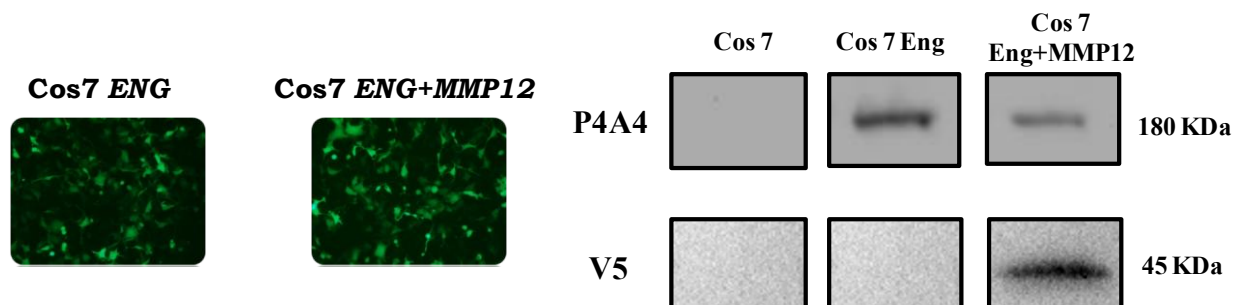


Figura 34 Comprobación de la eficacia de transfección y expresión de los vectores generados. **A.** La señal de GFP debido a la cotransfección de los vectores junto al de la proteína fluorescente fue positiva. **B.** El análisis de los lisados de las células transfectadas con los vectores de MMP12 y endoglina, mostraron alta eficacia en la expresión de ambas proteínas al ser incubados los lisados con los anticuerpos anti-V5 (epítipo artificial) y anti-endoglina (P4A4).

El análisis de los sobrenadantes de estas células por ELISA, mostró un aumento no significativo en los niveles de sEng cuando éstas estaban transfectadas con el vector de expresión de endoglina. El incremento fue muy significativo (alrededor de 5 veces máyor)

cuando además se incluía el vector de expresión de MMP12 (Fig. 35). Al ser la línea celular COS7 un tipo celular que no expresa de forma endógena endoglina, MMP12 o MMP14, se pudo afirmar que MMP12 es capaz de cortar específicamente endoglina de membrana en las células en cultivo.

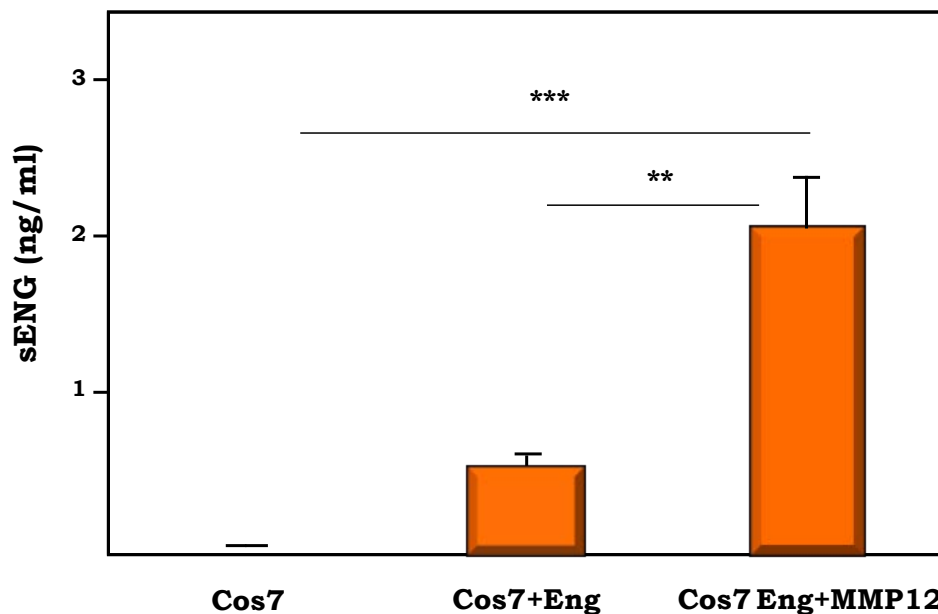


Figura 35. Niveles de endoglina soluble en células COS7 lipofectadas. La transfección del vector de endoglina supone un aumento no significativo en los niveles de endoglina. Se observa un efecto sinérgico al co-transfectar tanto el vector de Eng como el vector de MMP12.

3.5 Actividad de MMP12 en macrófagos y células endoteliales en cultivo

Conociendo los perfiles de expresión de metaloproteasas de las poblaciones de macrófagos de M1 y M2, la capacidad de MMP12 de liberar por corte proteolítico endoglina de membrana y la efectividad del inhibidor químico MMP-408, se analizaron los sobrenadantes de macrófagos diferenciados con GM y M-CSF en presencia o ausencia del inhibidor (Fig. 36A). Por otro lado, se utilizaron los sobrenadantes condicionados de M1 y M2 para cultivar células endoteliales, también en presencia y ausencia del inhibidor MMP-408 (Fig. 36B).

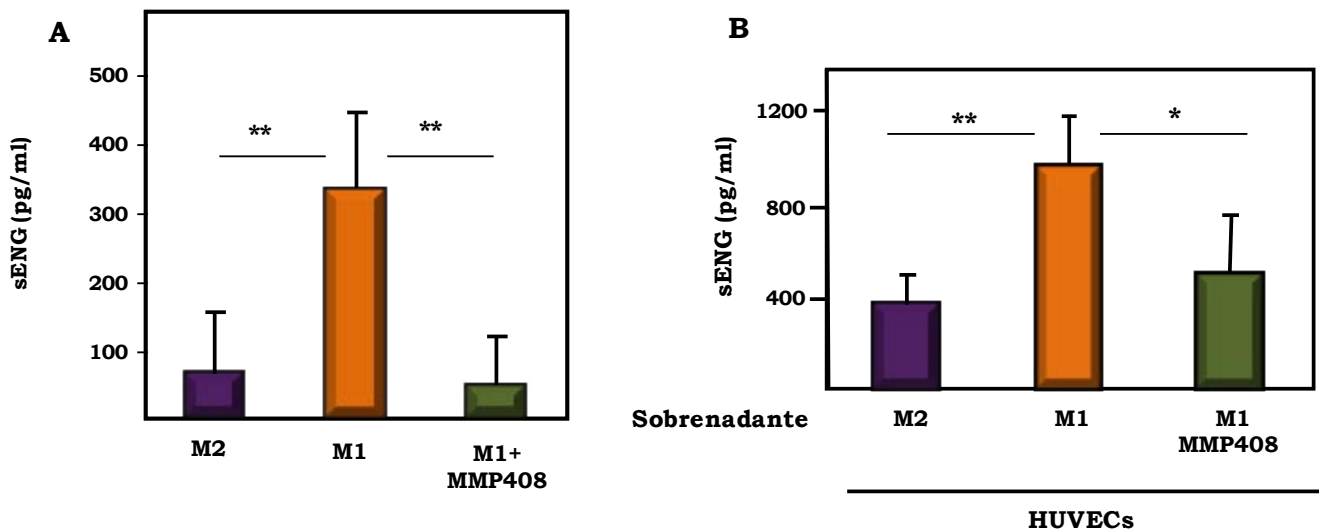


Figura 36. Actividad proteolítica de MMP12 en macrófagos pro-/anti-inflamatorios (A) y en células endoteliales (B). La liberación de endoglina soluble en los dos tipos celulares parece dependiente de la MMP12 presente en el sobrenadante de los macrófagos M1. La liberación de la forma soluble de la proteína se contrarresta al añadir el inhibidor químico específico (MMP-408) a los cultivos celulares.

El inhibidor MMP-408 fue capaz de neutralizar la liberación de endoglina en los macrófagos M1 y disminuir los niveles medidos en su sobrenadante a los observados en macrófagos M2 (Fig. 36A). El inhibidor no tuvo ningún efecto en la liberación de endoglina soluble en la población de M2 (no mostrado).

El co-cultivo de las células endoteliales humanas (HUVECs) con el medio condicionado de macrófagos M1-M2 mostró un incremento significativo de sEng en el sobrenadante resultante (Fig. 36B). El ensayo demuestra la capacidad de la MMP12 liberada por los macrófagos M1 de cortar endoglina de la superficie de la célula endotelial. Los niveles mostrados se corrigieron con los niveles basales de las células endoteliales y el nivel medido en los medios condicionados de los macrófagos M1 y M2. El inhibidor MMP-408 añadido al co-cultivo fue capaz de reducir la liberación (el corte) de endoglina en la célula endotelial de la misma forma que en el cultivo sólo con macrófagos. El corte de endoglina por MMP12 en células endoteliales es trascendente en la medida que aumenta exponencialmente la endoglina susceptible de ser liberada dentro de un contexto inflamatorio, tanto por número de células como por el nivel de expresión de endoglina en las mismas.

3.6 Actividad de MMP12 y liberación de endoglina soluble *in vivo*

Tras los datos obtenidos *in vitro*, se quiso estudiar el posible efecto de MMP12 en la liberación de endoglina de membrana en un modelo *in vivo*. Como control previo al ensayo con ratones, se analizó el comportamiento de los macrófagos de ratón al ser diferenciados con el sistema GM-CSF/M1 y M-CSF/M2. La citoquina pro-inflamatoria GM-CSF tuvo el mismo efecto diferencial entre ambas poblaciones de macrófagos murinos en lo que se refiere a los niveles de expresión de MMP12 (Fig. 37).

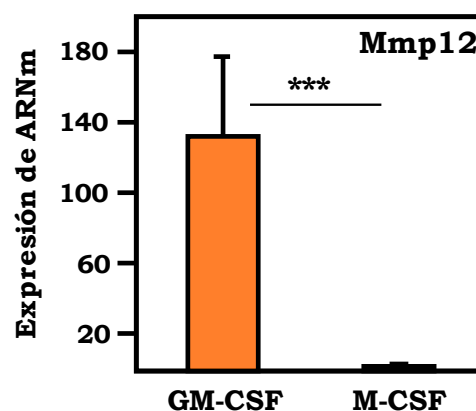


Figura 37. Transcripción de MMP12 en respuesta al tratamiento con GM-CSF. El comportamiento de los macrófagos murinos es igual al observado en aquellos obtenidos de donantes humanos. Se observa nuevamente la relación directa entre la citoquina (GM-CSF) y el incremento en la expresión de MMP12.

La inducción de una respuesta inflamatoria leve en los ratones mediante la inyección de LPS, resultó en un aumento significativo de los niveles de endoglina soluble en el plasma de los ratones 48 horas después de la inyección (Fig. 38A). Suministrar de forma oral el inhibidor de MMP12 (MMP-408) a los ratones en los que se indujo la respuesta inflamatoria con LPS, consiguió disminuir de forma significativa el aumento de endoglina soluble asociado a dicha respuesta (Fig. 38B). Tanto el inhibidor como el vehículo en el que se suministraba no tuvieron ningún efecto en los niveles basales de endoglina soluble (datos no mostrados).

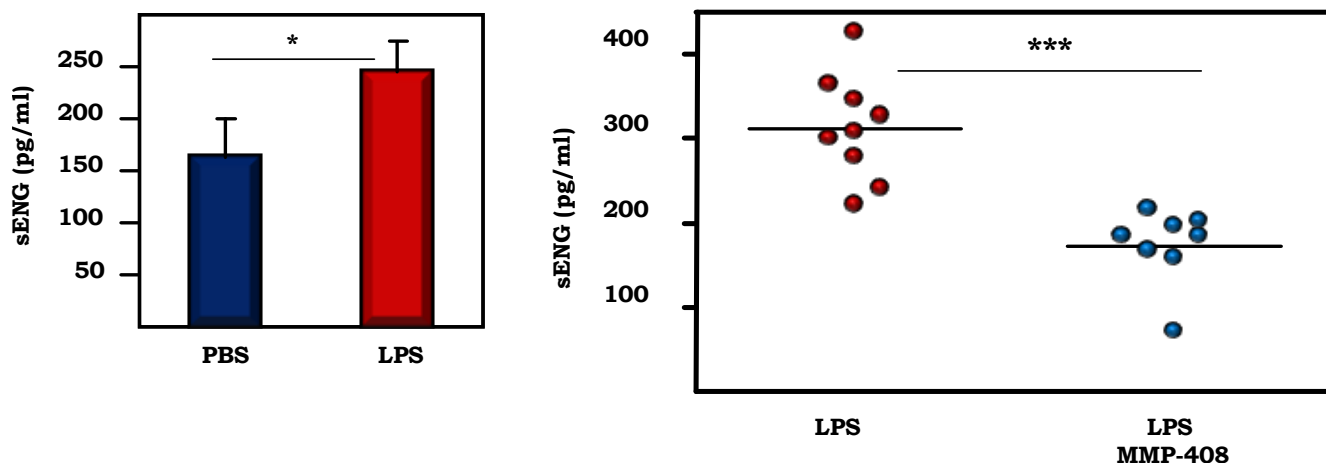


Figura 38. Actividad *in vivo* de MMP12 en un contexto de respuesta inflamatoria y niveles asociados de endoglina soluble. A. El LPS en concentraciones no-letales, fue capaz de inducir la liberación de endoglina soluble y aumentar sus niveles en el plasma del ratón. **B.** MMP-408, el inhibidor químico de MMP12, consiguió neutralizar significativamente el aumento de endoglina soluble debido al tratamiento con LPS.

El comportamiento observado en MMP12 en los ensayos *in vitro*, tanto en macrófagos como en células endoteliales, y la efectividad del inhibidor MMP-408 parecen ser extensibles a un modelo de inflamación inducida por LPS en ratón.

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de MMP12 de cortar endoglina de membrana para generar la forma soluble en los modelos *in vitro* e *in vivo*, tanto en la superficie de macrófagos como en las células endoteliales. La relación directa entre las dos proteínas permite considerar endoglina soluble como un marcador de diferenciación M1 de la misma forma que MMP12. Se establece por primera vez una relación directa entre ambos factores solubles en la polarización de macrófagos dentro del contexto de las distintas enfermedades que tienen un proceso inflamatorio asociado.

Discusión---

“Uno nunca se da cuenta de lo que se ha hecho, sólo puede ver lo que queda por hacer”.

— Marie Curie.

V. DISCUSIÓN

1. Estructura tridimensional de la región citoplasmática de las isoformas larga y corta de endoglin

La función de una proteína está íntimamente ligada a la estructura que evolutivamente ha ido adquiriendo siguiendo criterios de eficacia funcional y estabilidad dentro del sistema biológico. La biología estructural se ha mostrado como una técnica efectiva para abordar el estudio de interacción entre proteínas, el diseño de fármacos o la generación de proteínas o análogos recombinantes mutados para tratar enfermedades de una forma más efectiva (Caliandro *et al.*, 2013, Cengiz, 2013, Pitt *et al.*, 2013).

Mientras que la estructura tridimensional del dominio extracelular de endoglin (común a EngL/EngS) se ha resuelto recientemente (Llorca, 2005, Alt *et al.*, 2012), nada se sabe de la estructura del dominio citoplasmático. En la presente tesis doctoral se ha intentado resolver la estructura la región citoplasmática exclusiva para cada isoforma con el fin de poder profundizar en la distinta acción señalizadora de cada una de ellas, además de intentar predecir posibles ligandos de las mismas. Los datos obtenidos por RMN del péptido correspondiente al dominio citoplasmático de EngS muestran que, presumiblemente por su pequeño tamaño, no existe una ordenación espacial asociada al tallo citoplasmático de EngS puesto que éste carece de estructura secundaria definida.

En contraposición, cabría esperar que el dominio citoplasmático de EngL tuviera un tamaño suficiente para plegarse de una forma determinada. Sin embargo, los intentos de cristalizar esta proteína recombinante, tanto de forma individual como asociada al dominio LIM, no han dado resultado. Dado que los datos obtenidos de EngS por RMN podrían tener más relevancia biológica en comparación con la estructura obtenida de EngL, se debería abordar en un futuro próximo la resolución de su estructura de una forma distinta. Como alternativa a la cristalografía de rayos X, la opción más plausible es la RMN. Siendo el dominio citoplasmático de EngL bastante mayor que el péptido

de EngS (47 aa frente a 14 aa), podría ser conveniente realizar un marcaje isotópico de los aminoácidos para facilitar así su determinación estructural (Tugarinov *et al.*, 2006). Debido a la secuencia aminoacídica, con una región muy hidrófoba (VVAVAA) y dado que el tallo no es lo suficientemente largo como para generar un plegamiento que aisle este motivo del citoplasma acuoso, cabría esperar que esta secuencia estuviera en un bolsillo hidrofóbico entre otras proteínas o bien estuviese embebida en la membrana.

En cualquier caso, serán necesarios muchos más ensayos para poder determinar la estructura a alta resolución tanto del dominio citoplasmático como del dominio extracelular de endoglina. Con estos datos se podría profundizar en las diferencias funcionales existentes entre las isoformas, como sería la distinta afinidad por ligandos de la ruta de señalización de TGF- β (EngS/ALK5 o EngL/ALK1) (Blanco *et al.*, 2008, Velasco *et al.*, 2008). También se conocen las implicaciones de EngL en la organización del citoesqueleto gracias a su interacción directa con proteínas de la familia de las zixinas (Conley *et al.*, 2004, Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). La isoforma corta de endoglina, en cambio, no es capaz de asociarse a dichas proteínas.

2. Isoformas de endoglina en el linaje mieloide

El efecto del envejecimiento del sistema inmune innato tiene un impacto directo en la salud de los individuos de edad avanzada. Conforme el sujeto envejece, se observa un declive significativo en lo que se refiere a su habilidad para hacer frente a enfermedades infecciosas y a la capacidad de generar una respuesta protectora adecuada y proporcional al patógeno (Bender, 2003, Dace y Apte, 2008). Los macrófagos son células clave en la respuesta del sistema inmune innato y su disfunción puede resultar crítica en la ejecución y modulación de esa respuesta. Sin embargo, no se conocen en detalle muchos de los marcadores que identifican el estado senescente en estas células, que a su vez permitan monitorizar el declive en la función del macrófago que se da en edades avanzadas.

En la presente tesis doctoral se ha analizado por primera vez el patrón de expresión de las dos isoformas de endoglina en la senescencia de los macrófagos. Se ha identificado la isoforma corta de endoglina como un posible marcador de senescencia al observarse un aumento significativo tanto en modelos de senescencia asociada a estrés oxidativo *in vitro*, como en el proceso de envejecimiento natural *in vivo*. El aumento en los niveles de ARNm de EngS en el modelo *in vivo*, es más significativo que el de otro marcador previamente reportado en senescencia como es PAI-1. El hecho de detectarse a edades más tempranas el incremento en los niveles de EngS frente a los de PAI-1, pone de manifiesto el valor de la isoforma corta de endoglina como marcador temprano de senescencia en macrófagos. Resultados previos de ensayos realizados en células endoteliales, ya habían puesto de manifiesto no sólo la relación directa entre senescencia y endoglina corta, sino también su contribución al desarrollo de enfermedades vasculares relacionadas con la edad (Blanco *et al.*, 2008). El aumento en la expresión de EngS, supone un desequilibrio en la ratio L/S, afectando directamente a la ruta de señalización de TGF- β en las células endoteliales. Ambas isoformas de endoglina interactúan con los receptores señalizadores de TGF- β tipo I (ALK1 y ALK5) y tipo II (T β RII), modulando así la respuesta a TGF- β (Lastres *et al.*, 1996, Blanco *et al.*, 2008, Velasco *et al.*, 2008). En este sentido, parece existir una contribución preferencial por parte de EngS hacia la ruta mediada por ALK5, mientras que EngL señala preferentemente vía ALK1. Uno de los genes diana de la ruta de señalización EngS/ALK5 es precisamente *PAI-1*. El hecho que EngS esté por encima de PAI-1 en la ruta de señalización de TGF- β , está de acuerdo con la detección más temprana de la isoforma corta de endoglina en macrófagos senescentes.

La mayoría de estudios realizados sobre endoglina, han centrado su atención en la forma predominante (EngL) a pesar de existir una co-expresión de ARNm de las dos isoformas de la proteína (Bellon *et al.*, 1993, Perez-Gomez *et al.*, 2005). Por otra parte, se conoce muy poco del papel de endoglina en general y de sus isoformas en particular, en el linaje mielóide. Con el objetivo de estudiar el impacto de EngL y EngS en células monocíticas, se realizó un análisis proteómico por SILAC de los transfectantes L y S de endoglina en la línea celular U937. La lista final de las

proteínas (>800) que presentaban una expresión diferencial en los transfectantes, se sometió a un estudio bioinformático mediante el programa *Ingenuity Pathways* (IPA). Dentro de las funciones biológicas más significativamente alteradas, se identificaron procesos comunes en las dos isoformas, tales como el crecimiento y la proliferación celular, el tráfico de células inmunes, la supervivencia y muerte celular o la homeostasis de radicales libres. Todas estas funciones suelen estar comprometidas en el proceso de envejecimiento. En los transfectantes EngL/EngS se observa un descenso general en los niveles de integrinas (subunidades $\beta 1$, $\alpha 5$ y $\beta 2$). A pesar de que las proteínas de membrana son más difíciles de identificar por SILAC, su disminución en los transfectantes de endoglina fue clara y se relaciona con datos obtenidos por microarrays en nuestro laboratorio. Este resultado concuerda con la adhesión deficiente (dependiente de integrinas) de estas células al sustrato fibronectina. El hecho puede implicar no sólo que la habilidad de los transfectantes EngL/EngS para adherirse a matriz extracelular está disminuida, sino que también compromete el tráfico celular. Al hilo de esta deducción, estudios en otras líneas celulares han demostrado que la sobreexpresión de las isoformas de endoglina tiene como consecuencia una migración celular reducida (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999, Liu *et al.*, 2002, Conley *et al.*, 2004, Bernabeu *et al.*, 2007). Además, la expresión aumentada de las isoformas de endoglina (sobre todo de EngS) observada en la senescencia de los macrófagos, podría relacionarse con la reducida migración celular y la peor respuesta inflamatoria asociada al envejecimiento (Shaw *et al.*, 2010, Li, 2013).

La expresión de endoglina está fuertemente regulada durante el desarrollo hematopoyético y la diferenciación. Las células madre hematopoyéticas expresan endoglina. Sin embargo, durante el proceso de desarrollo y movilización celular, esta expresión se reduce drásticamente (Chen *et al.*, 2003). No obstante, al activarse y diferenciarse los monocitos a macrófagos, la expresión de endoglina vuelve a aumentar (Lastres *et al.*, 1992), observándose en conjunto una expresión cíclica entre el estadio pluripotencial y la célula totalmente diferenciada (Fig. 39). Por tanto, se puede postular que el aumento de la expresión de endoglina está asociada en parte a nichos de células madre hematopoyéticas o macrófagos tisulares. Precisamente, los

macrófagos peritoneales grandes (LPM) son más senescentes (Cassado Ados *et al.*, 2011) y, como se muestra en esta memoria, presentan un aumento significativo de endoglina, conforme el sujeto va envejeciendo.

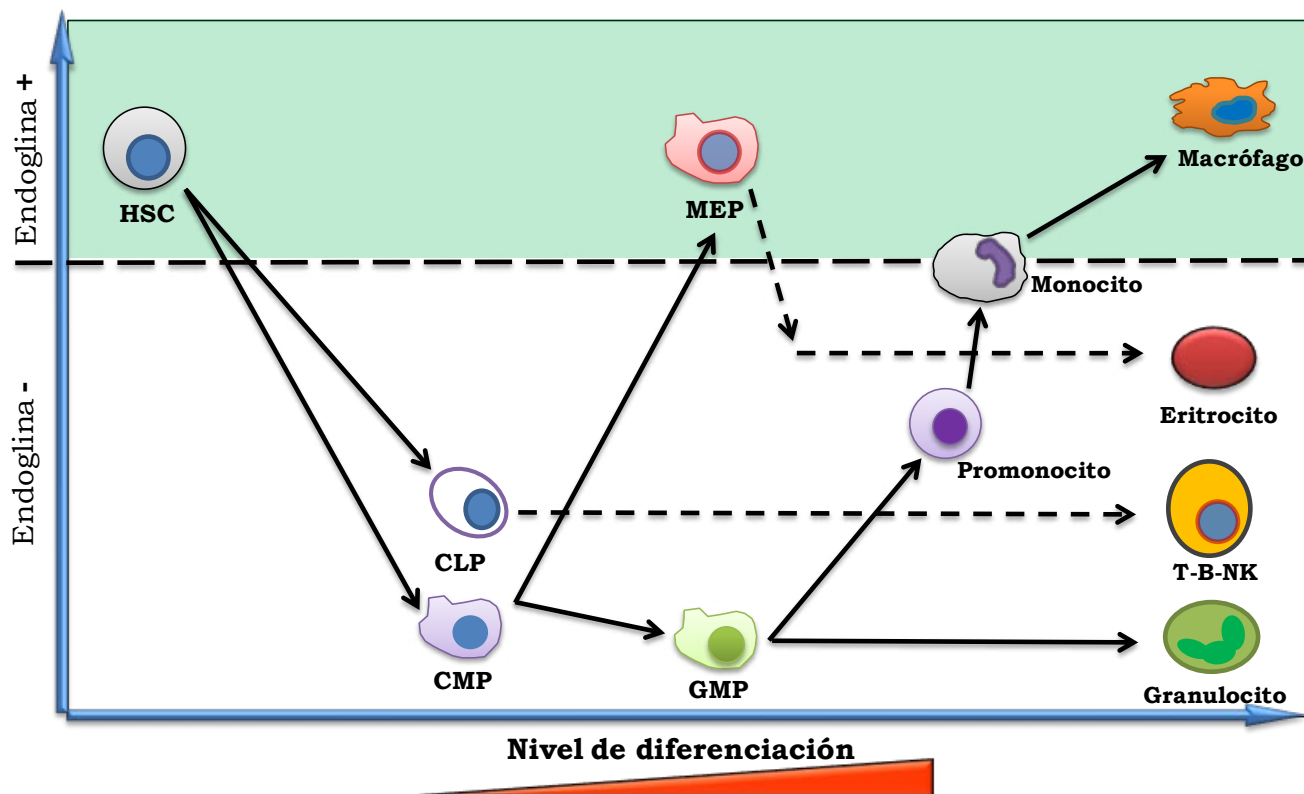


Figura 39. Expresión de endoglina durante el proceso de diferenciación de los precusores hematopoyéticos. Endoglina se considera un marcador de células madre hematopoyéticas (**HSC**), aunque su expresión no se detecta después del proceso de diferenciación hacia células sanguíneas (monocitos, eritrocitos, linfocitos, etc.). No obstante, la diferenciación de monocitos circulantes a macrófagos tisulares conlleva un aumento de la expresión de endoglina. Curiosamente, endoglina se expresa en la célula progenitora de megacariocitos y eritrocitos (**MEP**) pero no en la célula precursora que dará lugar al macrófago (**GMP**). **CLP**: Progenitor de célula linfoide; **CMP**: Progenitor de célula mieloide; **T-B-NK**: Linfocitos T, B y *Natural Killer*.

El comportamiento homólogo de ambos transfectantes en lo que se refiere a sus niveles de integrinas y su adhesión disminuida, puede explicarse por el efecto del dominio extracelular compartido. Por otro lado, se han observado funciones biológicas alteradas de forma independiente bien en los transfectantes EngL o bien en los de EngS, sugiriendo una modulación exclusiva por la sobreexpresión del tallo citoplasmático de cada isoforma. Por ejemplo, la presencia de la isoforma corta de endoglina condiciona tanto la proliferación de las células U937 (ciclo celular), como su

capacidad de supervivencia al estímulo apoptótico GM-CSF. Del mismo modo, los transfectantes de EngS, muestran una mayor acumulación de especies reactivas de oxígeno que las células EngL. Este fenotipo asociado a EngS, pone de manifiesto que esta isoforma no sólo parece ser un marcador de senescencia en macrófagos, sino que además su expresión puede potenciar el estado funcional comprometido que presentan los macrófagos durante el proceso de envejecimiento (Allen, 1998, Colantoni *et al.*, 2001, Lloberas y Celada, 2002, Plowden *et al.*, 2004).

Como resultado de las diferencias asociadas a las isoformas de endoglina en el linaje mieloide, se ha descrito también que la expresión de endoglina puede afectar a la diferenciación y polarización de macrófagos. La polarización de macrófagos en un sentido pro- o anti-inflamatorio puede resultar crítica frente a la respuesta a patógenos, progresión tumoral, autoinmunidad o fibrosis (Werner y Alzheimer, 2006, Benoit *et al.*, 2008). Además, la polarización es un proceso alterado en edades avanzadas, resultando en una deficiente función y activación de los macrófagos (Gomez *et al.*, 2005, Pello *et al.*, 2011). Si bien el fenotipo macrofágico presenta una gran variabilidad, los macrófagos se pueden sub-dividir esencialmente en las poblaciones pro-inflamatorias-M1 o anti-inflamatorias-M2 (Mantovani *et al.*, 2004). Estas poblaciones tienen la plasticidad suficiente como para modificar su fenotipo en función del estímulo recibido (Arnold *et al.*, 2007). Los ensayos de polarización realizados en nuestro laboratorio sugieren que en la línea monocítica U937, EngL se relaciona preferentemente con un fenotipo M1, mientras que EngS favorece la adquisición y expresión de marcadores M2. La activación clásica de macrófagos (M1), implica la secreción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 12 (IL12) y la citoquina de la superfamilia de TGF- β , Activina-A, que podrían tener en última instancia un efecto anti-tumoral. En el lado opuesto, la activación alternativa (M2), tiene como resultado la liberación de citoquinas con efecto anti-inflamatorio como pueden ser IL-4, IL-10 y TGF- β 1, que promueven procesos asociados a la edad como son la fibrosis, aterosclerosis o el crecimiento tumoral (Mantovani *et al.*, 2002, Mantovani *et al.*, 2004, Pello *et al.*, 2011). En conjunto todos los datos obtenidos sugieren que EngS podría contribuir a la deficiente respuesta M1

que se observa con la edad, promoviendo a su vez una tendencia a la polarización M2 de los macrófagos.

El comportamiento opuesto de los transfectantes EngL *versus* EngS en lo que se refiere a la polarización queda claramente ilustrado al analizar los niveles basales de activina-A. La expresión de esta citoquina aumenta durante la activación de macrófagos M1 y en respuesta a mediadores de inflamación (Jones *et al.*, 2007, Robson *et al.*, 2008, Phillips *et al.*, 2009, Altelaar *et al.*, 2013), pero disminuye al suministrar glucocorticoides anti-inflamatorios (Yu *et al.*, 1996, Scutera *et al.*, 2008). Se ha observado que en los transfectantes de EngL, los niveles de activina-A en el sobrenadante aumentan significativamente con respecto al control y sin embargo, se reducen sensiblemente en la situación de sobre-expresión de la isoforma corta. Activina-A es una citoquina moduladora de polarización que potencia la respuesta M1, a la vez que inhibe la polarización hacia un fenotipo M2 (Sierra-Filardi *et al.*, 2011, Sozzani y Musso, 2011). Curiosamente, se ha descrito un incremento en los niveles de activina-A en las últimas décadas de vida en individuos sanos y mujeres postmenopáusicas (Baccarelli *et al.*, 2001), hecho que se relaciona con el aumento de FSH en estas mujeres. Siendo activina-A un ligando directo de endoglina (Barbara *et al.*, 1999), será interesante estudiar la interacción funcional entre esta citoquina y endoglina corta en el contexto de la senescencia de los macrófagos. Los datos obtenidos en el análisis proteómico de los transfectantes estables de endoglina, unidos a los resultados de los ensayos con macrófagos humanos y murinos, permiten establecer una relación directa entre la senescencia asociada al envejecimiento y EngS como marcador de este proceso. La tendencia de los transfectantes EngS a diferenciarse hacia un fenotipo M2, junto al ya descrito declive de la respuesta inflamatoria asociada al envejecimiento, nos permite también establecer una relación entre EngS e inmunosenescencia.

3. Endoglina soluble y polarización de macrófagos

Además de las dos isoformas de endoglina ancladas a membrana, existe una tercera forma de la proteína, la endoglina soluble. El mecanismo de liberación de endoglina en células endoteliales se ha descrito recientemente y se relaciona principalmente con enfermedades como el cáncer o la preeclampsia (Li *et al.*, 2000, Hawinkels *et al.*, 2010, Maynard y Karumanchi, 2011, Valbuena-Diez *et al.*, 2012). Precisamente, en la publicación de Valbuena-Diez y colaboradores se demuestra que la hipoxia asociada a la enfermedad es un desencadenante de los altos niveles de endoglina soluble detectados en preeclampsia. Hasta la fecha, la única proteasa descrita como responsable del corte proteolítico de endoglina de membrana es la metaloproteasa de matriz MMP14. Además de en cáncer y en preeclampsia, se han detectado niveles aumentados de endoglina soluble en el plasma de pacientes con aterosclerosis, artritis reumatoide o psoriasis, enfermedades todas ellas relacionadas con un estado crónico de inflamación (Blann *et al.*, 1996, Maruotti *et al.*, 2006, Honsawek *et al.*, 2009, Pohl *et al.*, 2011). Muchos de estos contextos patológicos van asociados con la diferenciación y activación de los macrófagos, pero hasta la fecha no se ha descrito la liberación de endoglina por parte del macrófago.

En la presente tesis doctoral, dentro del estudio del papel de endoglina en el linaje mielóide, se ha establecido por primera vez una relación directa entre el aumento de endoglina soluble y el proceso inflamatorio. En el modelo de diferenciación y polarización de monocitos hacia un fenotipo M1 (GM-CSF) o M2 (M-CSF) se observa una diferencia clara en los niveles de endoglina soluble y su consiguiente acumulación durante el proceso de diferenciación entre ambos fenotipos. A pesar de que los niveles de expresión de endoglina, tanto a nivel de ARNm como de proteína membrana, son muy similares, la presencia de endoglina soluble se observa solo en los macrófagos M1, mientras que en monocitos y macrófagos M2 es prácticamente indetectable. Estos datos sugieren que, al igual que en las células endoteliales, existe un mecanismo post-traducciona l implicado en el aumento de endoglina soluble. En células endoteliales, además, se descartó la posibilidad de un ajuste alternativo como origen de la forma

soluble al transfectar las células con ADNc de endoglina y observar un aumento de dicha forma (Valbuena-Diez *et al.*, 2012). De la misma forma que en células endoteliales, se postula que podría ser una metaloproteasa la responsable de la liberación de endoglina de membrana en los macrófagos.

Curiosamente, no se observan diferencias de expresión de MMP14 entre las poblaciones M1 y M2. En cambio, sí existe una expresión diferencial muy marcada de la metaloelastasa de macrófagos MMP12. La expresión de esta metaloproteasa está fuertemente inducida por la citoquina pro-inflamatoria GM-CSF y ha sido recientemente identificada como un marcador de diferenciación M1 (de las Casas-Engel *et al.*, 2013). De la misma forma que sucede con endoglina soluble, se ha descrito también un aumento de MMP12 en las enfermedades inflamatorias crónicas previamente mencionadas (Suomela *et al.*, 2001, Liu *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2011, Chaudhuri *et al.*, 2012). Todos estos datos apoyan la hipótesis de que MMP12 puede estar implicada y ser la principal responsable de la liberación de endoglina soluble actuando sobre endoglina de membrana en macrófagos.

Los ensayos libres de células realizados con proteína MMP12 recombinante y un péptido fluorogénico específico, permitieron establecer el inhibidor químico MMP-408 como una opción viable para disminuir la actividad proteolítica de la forma activa de MMP12. Además, los péptidos P583 y P452 derivados de la secuencia de endoglina que llevan la diana de corte para MMP12 son capaces de competir con el péptido fluorogénico, como pone de manifiesto la reducción en la intensidad de fluorescencia obtenida en los ensayos *in vitro*. Estos datos sugieren que los puntos de corte para endoglina de membrana serían los mismos que los identificados para MMP14. Con el objetivo de demostrar la relación directa entre la liberación de endoglina y MMP12, se cotransfectó un vector de expresión de MMP12 humana junto a un vector de endoglina. Al forzar la expresión de ambas proteínas en una línea celular (COS7) sin expresión endógena ni de endoglina, ni de MMP12 ni MMP14, se observó un claro aumento de endoglina soluble en el sobrenadante de estas células, confirmando por tanto la capacidad de MMP12 de liberar endoglina por corte proteolítico.

El tratamiento con el inhibidor específico de MMP12 (MMP-408) de los monocitos polarizados a macrófagos, tuvo como consecuencia una disminución notable de la liberación de endoglina soluble en la población M1. Por el contrario en monocitos y macrófagos M2 el inhibidor no tuvo ningún efecto. Todos estos resultados sugieren que MMP12 es capaz de cortar endoglina en la superficie del macrófago y nos permite describir por primera vez a su forma soluble como un marcador de polarización M1. No obstante hay que tener en cuenta que la cantidad de endoglina susceptible de ser cortada en la superficie del macrófago no es muy abundante, y no explicaría *per se* los niveles aumentados en suero de endoglina soluble en las enfermedades previamente mencionadas. Dado que las células endoteliales constituyen un abundante reservorio de endoglina de membrana (tanto por nivel de expresión de endoglina como por número de células) y que MMP12 es una proteasa soluble, el origen de la endoglina soluble detectada en el suero podría tener su origen en el endotelio vascular. Esta hipótesis se testó poniendo en contacto un cultivo de células endoteliales (HUVECs) con los sobrenadantes condicionados de macrófagos M1 y M2. Como resultado se observó que la MMP12 secretada por los macrófagos M1 es capaz de cortar endoglina en la superficie endotelial. Además, el inhibidor MMP-408 fue capaz de disminuir significativamente la liberación de endoglina soluble de la célula endotelial producida por la actividad de MMP12. La liberación de MMP12 al medio por parte de los macrófagos polarizados a M1, dentro del proceso de respuesta inflamatoria, y la capacidad de MMP12 para cortar endoglina de la superficie en la célula endotelial, podrían explicar la liberación y aumento de endoglina soluble durante el proceso inflamatorio.

Habiendo demostrado previamente que la citoquina GM-CSF tiene el mismo efecto polarizador y potenciador en la expresión de MMP12 que el observado para macrófagos humanos, el ensayo de inducción moderada de respuesta inflamatoria en ratones mostró un aumento significativo de endoglina soluble en el plasma de los ratones inyectados con LPS. La respuesta inflamatoria en estos ratones, sin ser letal, es capaz de inducir la liberación de endoglina soluble. El efecto se contrarresta casi

totalmente al suministrar simultáneamente y de forma oral a los ratones el inhibidor MMP-408. Por lo tanto, los resultados obtenidos con los ensayos *in vitro* se confirman en el modelo de ratón, poniendo de manifiesto la relevancia de MMP12 y endoglina soluble en el proceso inflamatorio y confirmando que ambos son marcadores interrelacionados de polarización hacia un fenotipo M1.

La función fisiológica o la connotación patológica de endoglina soluble se ha relacionado generalmente con enfermedades como la preeclampsia (donde los niveles de endoglina soluble, sFlt1 y PlGF en plasma son muy elevados) o distintos tipos de cáncer como pueden ser el cáncer de mama metastásico, el cáncer de colon o el cáncer de pulmón (Li *et al.*, 2000, Bernabeu *et al.*, 2009) y otras como el infarto de miocardio (Cruz-Gonzalez *et al.*, 2008). En preeclampsia, además de ser un marcador diagnóstico de la enfermedad es una de las causas de la hipertensión asociada a este trastorno (Maynard y Karumanchi, 2011, Valbuena-Diez *et al.*, 2012, Oujo *et al.*, 2013). Dentro del contexto inflamatorio que nos ocupa, no se ha estudiado en profundidad el papel que podría tener endoglina soluble en aterosclerosis, artritis, psoriasis o dentro de la respuesta de macrófagos M1/M2 asociada al cáncer.

Una de las características atribuidas a endoglina soluble es su capacidad antiangiogénica. Es importante resaltar que se conoce la capacidad *in vivo* de promover la angiogénesis por parte de los macrófagos M2 (Jetten *et al.*, 2013). Precisamente, las poblaciones de macrófagos asociadas a tumores tienen un fenotipo más polarizado a M2, para favorecer así la irrigación y crecimiento del tumor (Jia *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descrito el mecanismo de acción de un anticuerpo anti-endoglina utilizado para inhibir la angiogénesis en tumores. La acción de dicho anticuerpo, TRC105, se fundamenta en favorecer la interacción de MMP14 con endoglina y liberar endoglina soluble, potenciando así la respuesta Smad2/3 sobre Smad1/5/8 y dificultando, en última instancia, la formación de vasos sanguíneos (Kumar *et al.*, 2013). Dentro de los papeles opuestos que tienen los macrófagos pro- y anti-inflamatorios en la fase de inicio (M1) y resolución (M2) de la respuesta a una determinada agresión, la capacidad antiangiogénica de endoglina soluble sería

consecuente con el fenotipo de macrófago M1. El micro-ambiente generado en el foco inflamatorio es hipóxico y tiene como consecuencia un aumento de factores pro-angiogénicos como endoglina o VEGF. Sin embargo, esta hipoxia estaría promoviendo igualmente el fenotipo de macrófagos M1 y un aumento de metaloproteasas como MMP12 y MMP14 que tendría como consecuencia el aumento de endoglina soluble en el foco inflamatorio. Por lo tanto, el balance neto en hipoxia sería pro-angiogénico, pero la liberación de endoglina soluble y el aumento de MMP12 inclinarían ese equilibrio hacia el bloqueo de la angiogénesis en la fase inicial de la respuesta inflamatoria.

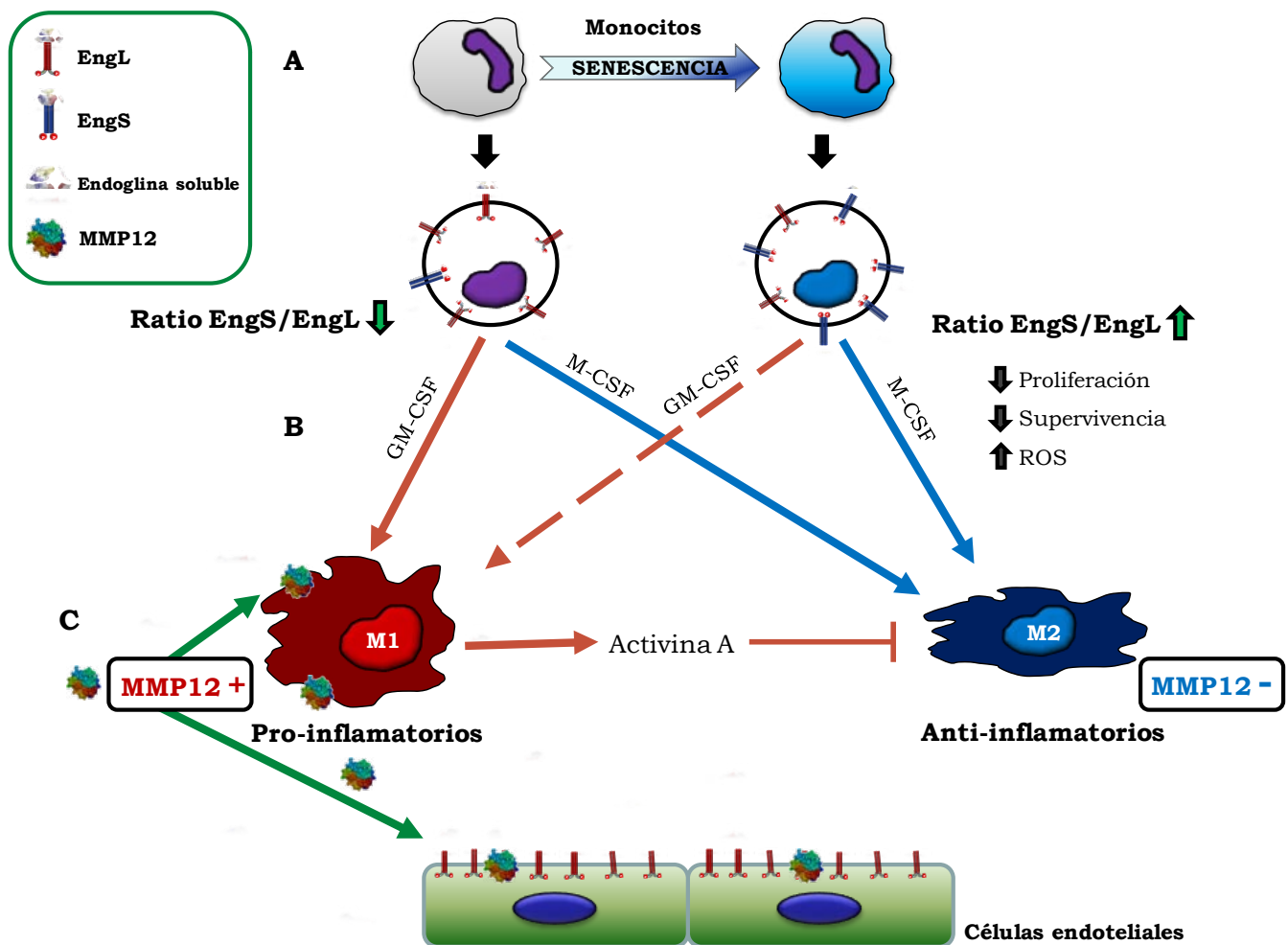


Figura 40. Modelo hipotético del papel de endoglina en el balance entre macrófagos M1 y M2. A. Al activarse, los monocitos comienzan a expresar la isoforma mayoritaria de endoglina (EngL). Con el proceso de senescencia asociado al envejecimiento se genera un desequilibrio al aumentar el nivel de expresión de la isoforma corta (EngS) con el consiguiente efecto fisiológico observado en el análisis por SILAC (proliferación disminuida, peor supervivencia y aumento de ROS).

B. Mientras que los monocitos polarizan indistintamente hacia un fenotipo M1 o M2 en función del estímulo recibido, el desequilibrio hacia la forma de EngS dificulta la polarización hacia M1 y la respuesta pro-inflamatoria. Uno de los marcadores más claros dentro de esta polarización preferencial es la expresión opuesta de activina A en los transfectantes EngL y EngS. **C.** Los macrófagos pro-inflamatorios M1, al contrario que los M2, expresan MMP12. Esta metaloproteasa soluble se libera al medio y es capaz de cortar endogлина de membrana tanto del propio macrófago como de la célula endotelial.

Por último, en el ámbito de la telangiectasia hemorrágica hereditaria, todas las células endoteliales presentan haploinsuficiencia de endogлина o ALK1. Sin embargo, las lesiones vasculares como las telangiectasias o las AVMs no se presentan de manera sistémica. Por este motivo se especula que es necesario un segundo evento (*second hit*) que desencadene la malformación arterio-venosa y dé lugar al cuadro clínico típico de los pacientes HHT (Lopez-Novoa y Bernabeu, 2010). Se postula que el segundo evento estaría relacionado con daño vascular, infección, isquemia o inflamación. Todos estos supuestos conllevan una inducción de endogлина de membrana endotelial para promover el proceso de angiogénesis (Ma *et al.*, 2000, Botella *et al.*, 2002, Torsney *et al.*, 2002, Docherty *et al.*, 2006). Por tanto, la haploinsuficiencia de los enfermos HHT puede explicar la exigua respuesta durante el segundo evento. En este supuesto, la endogлина soluble liberada por el proceso inflamatorio, estaría actuando como factor antiangiogénico, dificultando así un correcto remodelado vascular. Dado que los pacientes HHT son además más propensos a infecciones por patógenos oportunistas, la correspondiente inflamación asociada estaría potenciando la liberación de endogлина soluble, que en última instancia contribuiría a la formación de anomalías vasculares y los síntomas propios de la enfermedad. Por tanto, la haploinsuficiencia, unida a la disminución de endogлина de membrana por acción de MMP12 y/o MMP14, y el consiguiente aumento de endogлина soluble en el foco de inflamación, no dejarían alcanzar el umbral necesario para la correcta angiogénesis y explicarían la sintomatología local y no sistémica de la HHT.

Conclusiones_

“Descubrí el secreto del mar meditando sobre una gota de rocío”.

— Antonio Machado.

VI. CONCLUSIONES

- 1.** Se ha demostrado en el análisis por RMN que el tallo citoplasmático de la isoforma corta de endoglina no tiene estructura secundaria definida. Debido a las dificultades metodológicas encontradas para la resolución por cristalografía de rayos X de la estructura del tallo citoplasmático largo de endoglina, se propone la utilización de RMN con un marcaje isotópico previo para aumentar la sensibilidad y poder completar el estudio comparativo a nivel estructural de ambas isoformas.
- 2.** Endoglina corta puede considerarse un marcador potencial para evaluar la senescencia del linaje mieloide. Su aumento en la expresión y, más concretamente, su desequilibrio con respecto a EngL conforme el individuo envejece, puede potenciar el declive de la respuesta inmune innata a edades avanzadas.
- 3.** Respecto al análisis proteómico realizado, se puede afirmar que las isoformas de endoglina modulan funciones biológicas clave para la biología de las células mieloides, como son la adhesión, proliferación, supervivencia o acumulación de especies reactivas de oxígeno. EngS parece promover un fenotipo asociado al envejecimiento, en lo que se refiere a los procesos mencionados.
- 4.** La sobreexpresión de la isoforma corta de endoglina favorece la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio (M2). El cambio de expresión de EngL a EngS observado en el envejecimiento, se puede englobar dentro del denominado proceso de inmunosenescencia.
- 5.** La endoglina de membrana es un sustrato específico de la elastasa de macrófagos MMP12, proteína asociada a una respuesta pro-inflamatoria M1. La interacción entre endoglina de membrana y MMP12 tiene como consecuencia la liberación de la forma soluble de endoglina.

6. Endogлина soluble es un marcador de polarización M1. Su función en el proceso inflamatorio podría estar relacionada con su actividad anti-angiogénica dentro de la primera fase de la respuesta inmune innata.

7. La estrecha relación funcional entre MMP12 y endogлина soluble indica un efecto sumatorio de ambos factores solubles en las patologías que tienen asociado un estado inflamatorio.

Bibliografía_

“La fortuna juega a favor de una mente preparada”.

— Louis Pasteur.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson S, Miller RG, Phillips RA (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. **J Exp Med** 145(6): 1567-1579.
- Akagawa KS (2002). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. **Int J Hematol** 76(1): 27-34.
- Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F (2006). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. **Respirology** 11 Suppl: S32-36.
- Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, Kimura Y, Kinoshita J, Miyazaki M *et al.* (2002). Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. **Surgery** 131(1 Suppl): S109-113.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. **Nature** 404(6774): 193-197.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int J Biochem Cell Biol** 42(10): 1634-1650.
- Allen RG (1998). Oxidative stress and superoxide dismutase in development, aging and gene regulation. **Age (Omaha)** 21(2): 47-76.
- Alonso-Fernandez P, de la Fuente M (2008). [Immunological markers of ageing]. **Rev Esp Geriatr Gerontol** 43(3): 167-179.
- Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A *et al.* (2012). Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. **PLoS One** 7(2): e29948.
- Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ (2013). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. **Nat Rev Genet** 14(1): 35-48.
- Altomonte M, Montagner R, Fonsatti E, Colizzi F, Cattarossi I, Brasoveanu LI *et al.* (1996). Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. **Br J Cancer** 74(10): 1586-1591.
- Andersen JS, Mann M (2000). Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS Lett** 480(1): 25-31.
- Ansorge S, Bank U, Heimburg A, Helmuth M, Koch G, Tadge J *et al.* (2009). Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. **Clin Chem Lab Med** 47(3): 253-261.
- Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A *et al.* (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med** 204(5): 1057-1069.
- Baccarelli A, Morpurgo PS, Corsi A, Vaghi I, Fanelli M, Cremonesi G *et al.* (2001). Activin A serum levels and aging of the pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. **Exp Gerontol** 36(8): 1403-1412.
- Banda MJ, Werb Z (1981). Mouse macrophage elastase. Purification and characterization as a metalloproteinase. **Biochem J** 193(2): 589-605.

- Barbara NP, Wrana JL, 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(2): 584-594.
- Barton GM (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest** 118(2): 413-420.
- Baumeister W, Steven AC (2000). Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics. **Trends Biochem Sci** 25(12): 624-631.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T *et al.* (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. **Am J Med Genet A** 140(20): 2155-2162.
- Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D *et al.* (2010). Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. **Proc Natl Acad Sci U S A** 107(12): 5465-5470.
- Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK (2006). Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(35): 13004-13009.
- Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrian M, Vera S *et al.* (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(9): 2340-2345.
- Bender BS (2003). Infectious disease risk in the elderly. **Immunol Allergy Clin North Am** 23(1): 57-64, vi.
- Benoit M, Desnues B, Mege JL (2008). Macrophage polarization in bacterial infections. **J Immunol** 181(6): 3733-3739.
- Bernabeu C, Conley BA, Vary CP (2007). Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. **J Cell Biochem** 102(6): 1375-1388.
- Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. **Biochim Biophys Acta** 1792(10): 954-973.
- Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE (2002). Recent advances in cutaneous angiogenesis. **Br J Dermatol** 147(3): 418-425.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). **Blood** 107(5): 2112-2122.
- Biswas SK, Sica A, Lewis CE (2008). Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. **J Immunol** 180(4): 2011-2017.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R *et al.* (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. **J Biochem Biophys Methods** 6(4): 317-339.
- Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M *et al.* (2008). Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis** 197(1): 264-270.
- Blanco FJ, Bernabeu C (2011). Alternative splicing factor or splicing factor-2 plays a key role in intron retention of the endoglin gene during endothelial senescence. **Aging Cell** 10(5): 896-907.

- Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A *et al.* (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. **Circ Res** 103(12): 1383-1392.
- 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(2): 574-584.
- Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S (1996). Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. **Atherosclerosis** 120(1-2): 221-226.
- Blazquez-Medela AM, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C (2011). Osteoprotegerin and diabetes-associated pathologies. **Curr Mol Med** 11(5): 401-416.
- Bode W (2003). Structural basis of matrix metalloproteinase function. **Biochem Soc Symp**(70): 1-14.
- Boehmer ED, Goral J, Faunce DE, Kovacs EJ (2004). Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression. **J Leukoc Biol** 75(2): 342-349.
- Boehmer ED, Meehan MJ, Cutro BT, Kovacs EJ (2005). Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway. **Mech Ageing Dev** 126(12): 1305-1313.
- Borges L, Iacovino M, Mayerhofer T, Koyano-Nakagawa N, Baik J, Garry DJ *et al.* (2012). A critical role for endoglin in the emergence of blood during embryonic development. **Blood** 119(23): 5417-5428.
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M *et al.* (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(12): 4001-4010.
- Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, Johnston JM, Mann JL, McAsey ME (2000). Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer. **Obstet Gynecol** 96(2): 224-228.
- Buhring HJ, Muller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmuller A, van Agthoven AJ *et al.* (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. **Leukemia** 5(10): 841-847.
- Bundi A, Wüthrich K (1979). ¹H-nmr parameters of the common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides H-Gly-Gly-X-L-Ala-OH. **Biopolymers** 18(2): 285-297.
- Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW *et al.* (1995). Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. **Clin Cancer Res** 1(12): 1623-1634.
- Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Aller P, Yague E, Bernabeu C (1990). Phorbol esters induce differentiation of U-937 human promonocytic cells in the absence of LFA-1/ICAM-1-mediated intercellular adhesion. **Eur J Biochem** 191(3): 599-604.
- Calabro L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L *et al.* (2003). Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. **J Cell Physiol** 194(2): 171-175.
- Caliandro R, Belviso DB, Aresta BM, de Candia M, Altomare CD (2013). Protein crystallography and fragment-based drug design. **Future Med Chem** 5(10): 1121-1140.

- Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA (2000). The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. **J Leukoc Biol** 68(1): 144-150.
- Caruso C, Buffa S, Candore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D *et al.* (2009). Mechanisms of immunosenescence. **Immun Ageing** 6: 10.
- Cassado Ados A, de Albuquerque JA, Sardinha LR, Buzzo Cde L, Faustino L, Nascimento R *et al.* (2011). Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. **PLoS One** 6(7): e22141.
- Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solban N *et al.* (2011). Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. **J Biol Chem** 286(34): 30034-30046.
- Celada A, Nathan C (1994). Macrophage activation revisited. **Immunol Today** 15(3): 100-102.
- Cengiz E (2013). Closer to ideal insulin action: ultra fast acting insulins. **Panminerva Med** 55(3): 269-275.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocr Rev** 23(6): 787-823.
- Chaudhuri R, McSharry C, Brady J, Donnelly I, Grierson C, McGuinness S *et al.* (2012). Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity. **J Allergy Clin Immunol** 129(3): 655-663 e658.
- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J *et al.* (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **J Biol Chem** 267(27): 19027-19030.
- Chelvarajan RL, Collins SM, Van Willigen JM, Bondada S (2005). The unresponsiveness of aged mice to polysaccharide antigens is a result of a defect in macrophage function. **J Leukoc Biol** 77(4): 503-512.
- Chen CZ, Li L, Li M, Lodish HF (2003). The endoglin(positive) sca-1(positive) rhodamine(low) phenotype defines a near-homogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Immunity** 19(4): 525-533.
- Chien CY, Su CY, Hwang CF, Chuang HC, Chen CM, Huang CC (2006). High expressions of CD105 and VEGF in early oral cancer predict potential cervical metastasis. **J Surg Oncol** 94(5): 413-417.
- Colantoni A, Idilman R, de Maria N, Duffner LA, Van Thiel DH, Witte PL *et al.* (2001). Evidence of oxidative injury during aging of the liver in a mouse model. **J Am Aging Assoc** 24(2): 51-57.
- 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(7): 577-582.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C *et al.* (2004). Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. **J Biol Chem** 279(26): 27440-27449.
- Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP (2000). Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. **Atherosclerosis** 153(2): 323-335.
- Conti L, Gessani S (2008). GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. **Immunobiology** 213(9-10): 859-870.

- Craft CS, Romero D, Vary CP, Bergan RC (2007). Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. **Oncogene** 26(51): 7240-7250.
- Cruz-Gonzalez I, Pabon P, Rodriguez-Barbero A, Martin-Moreiras J, Pericacho M, Sanchez PL *et al.* (2008). Identification of serum endoglin as a novel prognostic marker after acute myocardial infarction. **J Cell Mol Med** 12(3): 955-961.
- Dace DS, Apte RS (2008). Effect of senescence on macrophage polarization and angiogenesis. **Rejuvenation Res** 11(1): 177-185.
- David L, Feige JJ, Bailly S (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev** 20(3): 203-212.
- de las Casas-Engel M, Dominguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, Puig-Kroger A *et al.* (2013). Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. **J Immunol** 190(5): 2301-2310.
- Delaney JR, Mlodzik M (2006). TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. **Cell Cycle** 5(24): 2852-2855.
- DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, Mocchegiani E *et al.* (2006). Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. **Biogerontology** 7(5-6): 471-481.
- Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, Saresella M *et al.* (2007). Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. **Clin Immunol** 122(2): 220-228.
- Derynck R, Zhang YE (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature** 425(6958): 577-584.
- Desai A, Grolleau-Julius A, Yung R (2010). Leukocyte function in the aging immune system. **J Leukoc Biol** 87(6): 1001-1009.
- Docherty NG, Lopez-Novoa JM, Arevalo M, Duwel A, Rodriguez-Pena A, Perez-Barriocanal F *et al.* (2006). Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. **Nephrol Dial Transplant** 21(8): 2106-2119.
- Dong C, Li Z, Alvarez R, Jr., Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. **Mol Cell** 5(1): 27-34.
- Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. **FASEB J** 17(9): 984-992.
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. **J Biol Chem** 273(19): 11619-11624.
- Eberl HC, Mann M, Vermeulen M (2011). Quantitative proteomics for epigenetics. **Chembiochem** 12(2): 224-234.
- Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H, Ataoglu O (2006). CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 103(3): 1007-1011.
- Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD *et al.* (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. **J Med Genet** 48(2): 73-87.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science** 246(4926): 64-71.

- 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(3-4): 204-207.
- Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. **J Immunol** 178(8): 5245-5252.
- Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M (2003). Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. **Oncogene** 22(42): 6557-6563.
- Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR *et al.* (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(5): 2037-2043.
- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F *et al.* (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mech Ageing Dev** 128(1): 92-105.
- Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA (2005). Innate immunity and angiogenesis. **Circ Res** 96(1): 15-26.
- Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP *et al.* (2006). SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. **J Med Genet** 43(10): 793-797.
- Gallucci S, Matzinger P (2001). Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol** 13(1): 114-119.
- Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR, Mann M (2010). Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. **Nat Methods** 7(5): 383-385.
- Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ (2005). The aging innate immune system. **Curr Opin Immunol** 17(5): 457-462.
- Gomez CR, Hirano S, Cutro BT, Birjandi S, Baila H, Nomellini V *et al.* (2007). Advanced age exacerbates the pulmonary inflammatory response after lipopolysaccharide exposure. **Crit Care Med** 35(1): 246-251.
- Gomez CR, Nomellini V, Baila H, Oshima K, Kovacs EJ (2009). Comparison of the effects of aging and IL-6 on the hepatic inflammatory response in two models of systemic injury: scald injury versus i.p. LPS administration. **Shock** 31(2): 178-184.
- Gordon KJ, Blobel GC (2008). Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. **Biochim Biophys Acta** 1782(4): 197-228.
- Gordon S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol** 5(12): 953-964.
- Gougos A, Letarte M (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. **J Biol Chem** 265(15): 8361-8364.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ *et al.* (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. **Int Immunol** 4(1): 83-92.
- Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P (2009). TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. **Cell Res** 19(1): 116-127.

- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. **EMBO J** 21(7): 1743-1753.
- Govinden R, Bhoola KD (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. **Pharmacol Ther** 98(2): 257-265.
- Graveley BR (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. **RNA** 6(9): 1197-1211.
- Graveley BR (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. **Trends Genet** 17(2): 100-107.
- Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL (2008). Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. **Cancer Res** 68(15): 6341-6349.
- Gronski TJ, Jr., Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, Huber M *et al.* (1997). Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. **J Biol Chem** 272(18): 12189-12194.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Perez-Alvarez MJ, Langa C, Lopez LA *et al.* (1999). Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts. **Eur J Cell Biol** 78(9): 614-623.
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. **J Biol Chem** 277(32): 29197-29209.
- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI, Jr. (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. **N Engl J Med** 333(14): 918-924.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol** 19(3): 1720-1730.
- Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM *et al.* (2004). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. **Circ Res** 94(6): 768-775.
- Hall SL, Padgett RA (1996). Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns. **Science** 271(5256): 1716-1718.
- Hamilton JA, Tak PP (2009). The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. **Arthritis Rheum** 60(5): 1210-1221.
- Hanamura T, Motoyoshi K, Yoshida K, Saito M, Miura Y, Kawashima T *et al.* (1988). Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. **Blood** 72(3): 886-892.
- Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ (2002). Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circ Res** 91(4): 281-291.
- Harries LW, Hernandez D, Henley W, Wood AR, Holly AC, Bradley-Smith RM *et al.* (2011). Human aging is characterized by focused changes in gene expression and deregulation of alternative splicing. **Aging Cell** 10(5): 868-878.
- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E *et al.* (2010). Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res** 70(10): 4141-4150.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature** 390(6659): 465-471.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circ J** 73(3): 411-418.

- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 284(5418): 1313-1318.
- Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P (2009). Elevated circulating and synovial fluid endoglin are associated with primary knee osteoarthritis severity. **Arch Med Res** 40(7): 590-594.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nat Protoc** 4(1): 44-57.
- Jahn SC, Law ME, Corsino PE, Law BK (2012). TGF-beta antiproliferative effects in tumor suppression. **Front Biosci (Schol Ed)** 4: 749-766.
- Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM (2013). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. **Angiogenesis** 10.1007/s10456-013-9381-6.
- Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, Takakura N (2013). Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. **Am J Pathol** 182(5): 1821-1831.
- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ *et al.* (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. **Nat Genet** 13(2): 189-195.
- Johnson JL, Devel L, Czarny B, George SJ, Jackson CL, Rogakos V *et al.* (2011). A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 31(3): 528-535.
- Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM *et al.* (2007). Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(41): 16239-16244.
- Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E, Wassarman PM (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. **Nat Cell Biol** 4(6): 457-461.
- Jurica MS, Moore MJ (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. **Mol Cell** 12(1): 5-14.
- Kall L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ (2007). Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. **Nat Methods** 4(11): 923-925.
- Karas M, Hillenkamp F (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem** 60(20): 2299-2301.
- Kassouf W, Ismail HR, Aprikian AG, Chevalier S (2004). Whole-mount prostate sections reveal differential endoglin expression in stromal, epithelial, and endothelial cells with the development of prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis** 7(2): 105-110.
- Kennedy MA, Montelione GT, Arrowsmith CH, Markley JL (2002). Role for NMR in structural genomics. **J Struct Funct Genomics** 2(3): 155-169.
- Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **Br J Obstet Gynaecol** 93(10): 1049-1059.
- Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A *et al.* (1998). The Syk protein tyrosine kinase is essential for Fc gamma receptor signaling in macrophages and neutrophils. **Mol Cell Biol** 18(7): 4209-4220.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A *et al.* (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by

- transforming growth factor-beta receptors. **J Biol Chem** 281(35): 25110-25123.
- Komuro I, Keicho N, Iwamoto A, Akagawa KS (2001). Human alveolar macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H₂O₂ via their high basal and inducible levels of catalase activity. **J Biol Chem** 276(26): 24360-24364.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell** 91(5): 661-672.
- Konig H, Matter N, Bader R, Thiele W, Muller F (2007). Splicing segregation: the minor spliceosome acts outside the nucleus and controls cell proliferation. **Cell** 131(4): 718-729.
- Kruger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubber CA, Forner F *et al.* (2008). SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. **Cell** 134(2): 353-364.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC *et al.* (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(2): 770-774.
- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM *et al.* (1999). Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. **Cancer Res** 59(4): 856-861.
- Kumar S, Pan CC, Bloodworth JC, Nixon A, Theuer C, Hoyt DG *et al.* (2013). Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF-beta signaling. **Oncogene** 10.1038/onc.2013.386.
- Kwan T, Benovoy D, Dias C, Gurd S, Serre D, Zuzan H *et al.* (2007). Heritability of alternative splicing in the human genome. **Genome Res** 17(8): 1210-1218.
- Kyzas PA, Agnantis NJ, Stefanou D (2006). Endoglin (CD105) as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. **Virchows Arch** 448(6): 768-775.
- Lastres P, Bellon T, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A *et al.* (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. **Eur J Immunol** 22(2): 393-397.
- Lastres P, Letamendia A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U *et al.* (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. **J Cell Biol** 133(5): 1109-1121.
- Lastres P, Martin-Perez J, Langa C, Bernabeu C (1994). Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. **Biochem J** 301 (Pt 3): 765-768.
- Ledee DR, Chen J, Tonelli LH, Takase H, Gery I, Zelenka PS (2004). Differential expression of splice variants of chemokine CCL27 mRNA in lens, cornea, and retina of the normal mouse eye. **Mol Vis** 10: 663-667.
- Lenferink AE, Cantin C, Nantel A, Wang E, Durocher Y, Banville M *et al.* (2010). Transcriptome profiling of a TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies. **Oncogene** 29(6): 831-844.
- Leng SX, Xue QL, Tian J, Huang Y, Yeh SH, Fried LP (2009). Associations of neutrophil and monocyte counts with frailty in community-dwelling disabled older women: results from the Women's Health and Aging Studies I. **Exp Gerontol** 44(8): 511-516.
- Leong TT, Fearon U, Veale DJ (2005). Angiogenesis in psoriasis and psoriatic arthritis: clues to disease pathogenesis. **Curr Rheumatol Rep** 7(4): 325-329.

- Letamendia A, Lastres P, Almendro N, Raab U, Buhning HJ, Kumar S *et al.* (1998). Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells. **Int J Cancer** 76(4): 541-546.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP *et al.* (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. **N Engl J Med** 355(10): 992-1005.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol** 7(9): 678-689.
- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N *et al.* (2000). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. **Int J Cancer** 89(2): 122-126.
- Li G, Kim YJ, Broxmeyer HE (2005). Macrophage colony-stimulating factor drives cord blood monocyte differentiation into IL-10(high)IL-12absent dendritic cells with tolerogenic potential. **J Immunol** 174(8): 4706-4717.
- Li W (2013). Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration. **Ageing Res Rev** 10.1016/j.arr.2013.05.006.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. **Cell** 68(4): 775-785.
- Liu M, Sun H, Wang X, Koike T, Mishima H, Ikeda K *et al.* (2004). Association of increased expression of macrophage elastase (matrix metalloproteinase 12) with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 50(10): 3112-3117.
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C, Bergan RC (2002). Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion. **Oncogene** 21(54): 8272-8281.
- Lloberas J, Celada A (2002). Effect of aging on macrophage function. **Exp Gerontol** 37(12): 1325-1331.
- Llorca O (2005). Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. **Acta Pharmacol Sin** 26(10): 1153-1164.
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. **J Mol Biol** 365(3): 694-705.
- Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 299(4): H959-974.
- Ma X, Labinaz M, Goldstein J, Miller H, Keon WJ, Letarte M *et al.* (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(12): 2546-2552.
- Mahbub S, Deburghgraeve CR, Kovacs EJ (2012). Advanced age impairs macrophage polarization. **J Interferon Cytokine Res** 32(1): 18-26.
- Maiorano M, Altomonte M, Fonsatti E (2006). Is it the primetime for endoglin (CD105) in the clinical setting? **Cardiovasc Res** 69(4): 781-783.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol** 25(12): 677-686.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 23(11): 549-555.

- Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D (2006). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Histol Histopathol** 21(5): 557-566.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem** 67: 753-791.
- Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M (2000). Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. **Stroke** 31(11): 2653-2660.
- Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M *et al.* (1998). Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. **Am J Pathol** 153(1): 109-119.
- Maynard SE, Karumanchi SA (2011). Angiogenic factors and preeclampsia. **Semin Nephrol** 31(1): 33-46.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE *et al.* (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. **Nat Genet** 8(4): 345-351.
- Medzhitov R (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature** 449(7164): 819-826.
- Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. **Nature** 454(7203): 428-435.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **Semin Immunol** 10(5): 351-353.
- Moustakas A, Heldin CH (2005). Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci** 118(Pt 16): 3573-3584.
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 39(1): 115-124.
- Nachtigal P, Vecerova L, Pospisilova N, Micuda S, Brackova E, Navarro Hernandez E *et al.* (2009). Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: an immunohistochemical study. **Histol Histopathol** 24(12): 1499-1506.
- Nakagawara A, DeSantis NM, Nogueira N, Nathan CF (1982). Lymphokines enhance the capacity of human monocytes to secrete reactive oxygen intermediates. **J Clin Invest** 70(5): 1042-1048.
- Nathan C (2002). Points of control in inflammation. **Nature** 420(6917): 846-852.
- Nathan C (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol** 6(3): 173-182.
- Nott A, Meislin SH, Moore MJ (2003). A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. **RNA** 9(5): 607-617.
- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G *et al.* (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. **J Biol Chem** 285(8): 5532-5540.
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fisicaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice AJ (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. **Clin Exp Immunol** 90(1): 154-159.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK *et al.* (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(6): 2626-2631.

- Okuma E, Saeki K, Shimura M, Ishizaka Y, Yasugi E, Yuo A (2000). Induction of apoptosis in human hematopoietic U937 cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible existence of caspase 3-like pathway. **Leukemia** 14(4): 612-619.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A *et al.* (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. **Mol Cell Proteomics** 1(5): 376-386.
- Ong SE, Foster LJ, Mann M (2003). Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. **Methods** 29(2): 124-130.
- Oujo B, Perez-Barriocanal F, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM (2013). Membrane and soluble forms of endoglin in preeclampsia. **Curr Mol Med** 13(8): 1345-1357.
- Parker WL, Goldring MB, Philip A (2003). Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner. **J Bone Miner Res** 18(2): 289-302.
- Patel AA, Steitz JA (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. **Nat Rev Mol Cell Biol** 4(12): 960-970.
- Pello OM, Silvestre C, De Pizzol M, Andres V (2011). A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. **Immunobiology** 216(11): 1172-1176.
- Perez-Gomez E, Del Castillo G, Juan Francisco S, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Quintanilla M (2010). The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. **ScientificWorldJournal** 10: 2367-2384.
- Perez-Gomez E, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M *et al.* (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. **Oncogene** 24(27): 4450-4461.
- Perez-Gomez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernandez-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J *et al.* (2007). A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. **Cancer Res** 67(21): 10268-10277.
- Pfister G, Savino W (2008). Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoendocrine therapeutic perspective. **Neuroimmunomodulation** 15(4-6): 351-364.
- Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP (2009). Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. **Cytokine Growth Factor Rev** 20(2): 153-164.
- Pitt WR, Calmiano MD, Kroeplien B, Taylor RD, Turner JP, King MA (2013). Structure-based virtual screening for novel ligands. **Methods Mol Biol** 1008: 501-519.
- Plaza S, Chanut-Delalande H, Fernandes I, Wassarman PM, Payre F (2010). From A to Z: apical structures and zona pellucida-domain proteins. **Trends Cell Biol** 20(9): 524-532.
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging Cell** 3(4): 161-167.
- Pober JS, Sessa WC (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol** 7(10): 803-815.
- Pohl D, Andrys C, Borska L, Fiala Z, Hamakova K, Ettler K *et al.* (2011). Serum level of a soluble form of endoglin (CD105) is decreased after Goeckerman's therapy of psoriasis. **Acta Medica (Hradec Kralove)** 54(2): 59-62.
- Prestegard JH, Valafar H, Glushka J, Tian F (2001). Nuclear magnetic resonance in the era of structural genomics. **Biochemistry** 40(30): 8677-8685.

- Pruneri G, Bertolini F, Baldini L, Valentini S, Goldaniga M, Soligo D *et al.* (2003). Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. **Br J Haematol** 120(4): 695-698.
- Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F *et al.* (2002). Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. **Br J Haematol** 118(3): 817-820.
- Quintanilla M, Ramirez JR, Perez-Gomez E, Romero D, Velasco B, Letarte M *et al.* (2003). Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. **Oncogene** 22(38): 5976-5985.
- Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M, Courchesne PL, Patterson SD *et al.* (1998). Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: Toward a human mitochondrial proteome. **ELECTROPHORESIS** 19(6): 1006-1014.
- Racioppi L, Means AR (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. **J Biol Chem** 287(38): 31658-31665.
- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **J Mol Biol** 7: 95-99.
- Robledo MM, Hidalgo A, Lastres P, Arroyo AG, Bernabeu C, Sanchez-Madrid F *et al.* (1996). Characterization of TGF-beta 1-binding proteins in human bone marrow stromal cells. **Br J Haematol** 93(3): 507-514.
- Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T *et al.* (2008). Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. **Blood** 111(5): 2733-2743.
- Rodriguez-Barbero A, Obreo J, Eleno N, Rodriguez-Pena A, Duwel A, Jerkic M *et al.* (2001). Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta1. **Biochem Biophys Res Commun** 282(1): 142-147.
- Romani AA, Borghetti AF, Del Rio P, Sianesi M, Soliani P (2006). The risk of developing metastatic disease in colorectal cancer is related to CD105-positive vessel count. **J Surg Oncol** 93(6): 446-455.
- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Duwell A, Blanco FJ, Langa C *et al.* (2013). Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. **Blood** 121(2): 403-415.
- Saad RS, El-Gohary Y, Memari E, Liu YL, Silverman JF (2005). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma. **Hum Pathol** 36(9): 955-961.
- Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF (2003). Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 22(3): 248-253.
- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF (2004). Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. **Mod Pathol** 17(2): 197-203.
- Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K *et al.* (2007). Immunopathogenesis of psoriasis. **Exp Dermatol** 16(10): 779-798.
- Sanford JR, Coutinho P, Hackett JA, Wang X, Ranahan W, Caceres JF (2008). Identification of nuclear and cytoplasmic mRNA targets for the shuttling protein SF2/ASF. **PLoS One** 3(10): e3369.
- Sanford JR, Ellis JD, Cazalla D, Caceres JF (2005). Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(42): 15042-15047.

- Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L *et al.* (2008). The immune system in extreme longevity. **Exp Gerontol** 43(2): 61-65.
- Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C (2011). TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)** 121(6): 233-251.
- Sanz-Rodriguez F, Fernandez LA, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E *et al.* (2004a). Mutation analysis in Spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. **Clin Chem** 50(11): 2003-2011.
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C (2004b). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. **J Biol Chem** 279(31): 32858-32868.
- Schmierer B, Hill CS (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8(12): 970-982.
- Scutera S, Riboldi E, Daniele R, Elia AR, Fraone T, Castagnoli C *et al.* (2008). Production and function of activin A in human dendritic cells. **Eur Cytokine Netw** 19(1): 60-68.
- Sebastian C, Herrero C, Serra M, Lloberas J, Blasco MA, Celada A (2009). Telomere shortening and oxidative stress in aged macrophages results in impaired STAT5a phosphorylation. **J Immunol** 183(4): 2356-2364.
- Seon BK, Haba A, Matsuno F, Takahashi N, Tsujie M, She X *et al.* (2011). Endoglin-targeted cancer therapy. **Curr Drug Deliv** 8(1): 135-143.
- Serhan CN, Savill J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol** 6(12): 1191-1197.
- Serra R, Moses HL (1996). Tumor suppressor genes in the TGF-beta signaling pathway? **Nat Med** 2(4): 390-391.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ (1993). Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. **J Biol Chem** 268(32): 23824-23829.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM (2010). Aging of the innate immune system. **Curr Opin Immunol** 22(4): 507-513.
- Shi Y, Massague J (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell** 113(6): 685-700.
- Shovlin CL (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. **Blood Rev** 24(6): 203-219.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ *et al.* (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). **Am J Med Genet** 91(1): 66-67.
- Shovlin CL, Letarte M (1999). Hereditary haemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: issues in clinical management and review of pathogenic mechanisms. **Thorax** 54(8): 714-729.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M (2005). Pre-eclampsia. **Lancet** 365(9461): 785-799.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG *et al.* (2008). Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol** 18(5): 349-355.
- Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI *et al.* (2011). Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. **Blood** 117(19): 5092-5101.

- Sinha R, Allemand E, Zhang Z, Karni R, Myers MP, Krainer AR (2010). Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. **Mol Cell Biol** 30(11): 2762-2774.
- Soleymanlou N, Jurisica I, Nevo O, Ietta F, Zhang X, Zamudio S *et al.* (2005). Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab** 90(7): 4299-4308.
- Sozzani S, Musso T (2011). The yin and yang of Activin A. **Blood** 117(19): 5013-5015.
- St-Jacques S, Cymerman U, Pece N, 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(6): 2645-2657.
- Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brckova E, Kudlackova Z *et al.* (2011). Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. **Circ J** 75(7): 1747-1755.
- Suomela S, Kariniemi AL, Snellman E, Saarialho-Kere U (2001). Metalloelastase (MMP-12) and 92-kDa gelatinase (MMP-9) as well as their inhibitors, TIMP-1 and -3, are expressed in psoriatic lesions. **Exp Dermatol** 10(3): 175-183.
- Szekanecz Z, Szegedi G, Koch AE (1998). Angiogenesis in rheumatoid arthritis: pathogenic and clinical significance. **J Invest Med** 46(2): 27-41.
- Tacke F, Randolph GJ (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology** 211(6-8): 609-618.
- Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M *et al.* (2001). Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. **Clin Cancer Res** 7(11): 3410-3415.
- Tarn WY, Steitz JA (1996). Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. **Science** 273(5283): 1824-1832.
- ten Dijke P, Arthur HM (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8(11): 857-869.
- ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. **Angiogenesis** 11(1): 79-89.
- Thomas CP, Andrews JI, Liu KZ (2007). Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta. **FASEB J** 21(14): 3885-3895.
- Thorpe PE, Burrows FJ (1995). Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. **Breast Cancer Res Treat** 36(2): 237-251.
- Tian H, Mythreye K, Golzio C, Katsanis N, Blobel GC (2012). Endoglin mediates fibronectin/alpha5beta1 integrin and TGF-beta pathway crosstalk in endothelial cells. **EMBO J** 31(19): 3885-3900.
- Toapanta FR, Ross TM (2009). Impaired immune responses in the lungs of aged mice following influenza infection. **Respir Res** 10: 112.
- Torrado M, Iglesias R, Nespereira B, Centeno A, Lopez E, Mikhailov AT (2009). Intron retention generates ANKRD1 splice variants that are co-regulated with the main transcript in normal and failing myocardium. **Gene** 440(1-2): 28-41.
- Torsney E, Charlton R, Parums D, Collis M, Arthur HM (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. **Inflamm Res** 51(9): 464-470.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. **Cell** 95(6): 779-791.

- Tugarinov V, Kanelis V, Kay LE (2006). Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. **Nat Protoc** 1(2): 749-754.
- Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG *et al.* (2009). Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. **Crit Care Med** 37(3): 1018-1023.
- Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E *et al.* (2012). Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. **Circulation** 126(22): 2612-2624.
- Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, 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 PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM (1998). Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. **Acta Derm Venereol** 78(1): 19-21.
- van Duin D, Allore HG, Mohanty S, Ginter S, Newman FK, Belshe RB *et al.* (2007a). Pre-vaccine determination of the expression of costimulatory B7 molecules in activated monocytes predicts influenza vaccine responses in young and older adults. **J Infect Dis** 195(11): 1590-1597.
- van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E *et al.* (2007b). Age-associated defect in human TLR-1/2 function. **J Immunol** 178(2): 970-975.
- van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn R, Pape T *et al.* (2000). Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. **Q Rev Biophys** 33(4): 307-369.
- Van Le B, Franke D, Svergun DI, Han T, Hwang HY, Kim KK (2009). Structural and functional characterization of soluble endoglin receptor. **Biochem Biophys Res Commun** 383(4): 386-391.
- Vecerova L, Strasky Z, Rathouska J, Slanarova M, Brackova E, Micuda S *et al.* (2012). Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. **J Atheroscler Thromb** 19(2): 115-126.
- Velasco S, Alvarez-Munoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabeu C, Lopez-Novoa JM *et al.* (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. **J Cell Sci** 121(Pt 6): 913-919.
- Velasco-Loyden G, Arribas J, Lopez-Casillas F (2004). The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloproteinase-1. **J Biol Chem** 279(9): 7721-7733.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM *et al.* (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med** 12(6): 642-649.
- Verma RP, Hansch C (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. **Bioorg Med Chem** 15(6): 2223-2268.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E *et al.* (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(13): 4560-4565.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and

- IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. **J Leukoc Biol** 79(2): 285-293.
- Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA (2009). Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 29(8): 1185-1192.
- Weber MS, Prod'homme T, Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee L *et al.* (2007). Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. **Nat Med** 13(8): 935-943.
- Werner S, Alzheimer C (2006). Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. **Cytokine Growth Factor Rev** 17(3): 157-171.
- Weyemi U, Parekh PR, Redon CE, Bonner WM (2012). SOD2 deficiency promotes aging phenotypes in mouse skin. **Aging (Albany NY)** 4(2): 116-118.
- Wieser R, Wrana JL, Massague J (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. **EMBO J** 14(10): 2199-2208.
- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW *et al.* (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(12): 4828-4832.
- Will CL, Luhrmann R (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. **Biol Chem** 386(8): 713-724.
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T *et al.* (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. **Nature** 379(6564): 466-469.
- Wilson A, Trumpp A (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat Rev Immunol** 6(2): 93-106.
- Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL *et al.* (2013). BMP9 Mutations Cause a Vascular-Anomaly Syndrome with Phenotypic Overlap with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. **Am J Hum Genet** 10.1016/j.ajhg.2013.07.004.
- Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Cardo M, Herrero C, Soler C *et al.* (2001). Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. **Immunobiology** 204(5): 543-550.
- Xue L, Geahlen RL, Tao WA (2013). Identification of Direct Tyrosine Kinase Substrates Based on Protein Kinase Assay-Linked Phosphoproteomics. **Mol Cell Proteomics** 10.1074/mcp.O113.027722.
- Yang LY, Lu WQ, Huang GW, Wang W (2006). Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer** 6: 110.
- Yee AA, Savchenko A, Ignachenko A, Lukin J, Xu X, Skarina T *et al.* (2005). NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. **J Am Chem Soc** 127(47): 16512-16517.
- Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol** 36(1): 128-137.
- Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA (2010). Pathogenesis of preeclampsia. **Annu Rev Pathol** 5: 173-192.
- Yu J, Shao LE, Frigon NL, Jr., Lofgren J, Schwall R (1996). Induced expression of the new cytokine, activin A, in human monocytes: inhibition by glucocorticoids and retinoic acid. **Immunology** 88(3): 368-374.

- Zhang H, Shaw AR, Mak A, Letarte M (1996). Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. **J Immunol** 156(2): 564-573.
- Zhang YE (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell Res** 19(1): 128-139.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. **Nature** 419(6903): 182-185.

Anexo---

El trabajo realizado durante la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, **Aristorena M**, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C, Marina A. "*Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding*". **PlosOne** 2012;7(2):e29948
2. **Aristorena M**, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Maria, Ojeda-Fernandez L, Gallardo-Vara E, Corbi AL, Botella LM, Bernabeu C. "*Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization*". **Manuscrito sometido a publicación**
3. **Aristorena M** y de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernandez L, Gallardo-Vara E, Blanco FJ, Valbuena-Diez AC, Botella LM, Corbi AL, Bernabeu C. "*The MMP12/soluble endoglin axis characterizes the M1 pro-inflammatory macrophage polarization*". **Manuscrito en preparación**
4. Blanco FJ, Ojeda-Fernández L, **Aristorena M**, Benguría A, Dopazo A, Langa C, Botella LM, Bernabéu C "*Functional analysis of the endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937*". **Manuscrito sometido a publicación**

TABLA SUPLEMENTARIA - Lista Completa SILAC

| Endoglina Larga (EngL) | | |
|------------------------|--|-------|
| Nº Acceso | Descripción | Ratio |
| Q96GW9 | Methionyl-tRNA synthetase, mitochondrial | 7,338 |
| P49407 | Beta-arrestin-1 | 7,224 |
| P08311 | Cathepsin G | 4,547 |
| Q9H939 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 | 4,385 |
| O43159 | Ribosomal RNA-processing protein 8 | 3,960 |
| Q3LXA3 | Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) | 3,929 |
| Q96RQ9 | L-amino-acid oxidase | 3,698 |
| P61011 | Signal recognition particle 54 kDa protein | 3,548 |
| P24468 | COUP transcription factor 2 | 3,391 |
| O76096 | Cystatin-F | 3,275 |
| O43586 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 | 3,204 |
| P09488 | Glutathione S-transferase Mu 1 | 3,007 |
| Q9H939 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 | 2,953 |
| Q9C0B1 | Protein fto | 2,851 |
| Q9P016 | Thymocyte nuclear protein 1 | 2,826 |
| P04179 | Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial O | 2,799 |
| P15559 | NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 | 2,797 |
| P30038 | Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial | 2,698 |
| O75113 | NEDD4-binding protein 1 | 2,669 |
| Q9H2W6 | 39S ribosomal protein L46, mitochondrial | 2,647 |
| Q8IZQ5 | Selenoprotein H | 2,621 |
| P04066 | Tissue alpha-L-fucosidase | 2,555 |
| P08246 | Neutrophil elastase | 2,539 |
| P32320 | Cytidine deaminase | 2,526 |
| P46379 | Large proline-rich protein BAT3 | 2,506 |
| P62805 | Histone H4 | 2,505 |
| P80723 | Brain acid soluble protein 1 | 2,469 |
| Q14956 | Transmembrane glycoprotein NMB | 2,421 |
| P24557 | Thromboxane-A synthase | 2,321 |
| P53602 | Diphosphomevalonate decarboxylase | 2,319 |
| Q5VT52 | Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2 | 2,313 |
| Q9Y294 | Histone chaperone ASF1A | 2,281 |
| Q9Y3B2 | 3'-5' exoribonuclease CSL4 homolog | 2,280 |
| P10619 | Lysosomal protective protein | 2,262 |
| P56377 | AP-1 complex subunit sigma-2 | 2,215 |
| Q9BYD6 | 39S ribosomal protein L1, mitochondrial | 2,203 |
| Q15067 | Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 | 2,193 |
| Q9BXY0 | Protein MAK16 homolog | 2,174 |
| P23141 | Liver carboxylesterase 1 | 2,148 |
| Q92478 | C-type lectin domain family 2 member B | 2,124 |
| Q14956 | Transmembrane glycoprotein NMB | 2,114 |
| P09668 | Cathepsin H | 2,113 |
| P62166 | Neuronal calcium sensor 1 | 2,109 |
| Q14151 | Scaffold attachment factor B2 | 2,101 |
| O00567 | Nucleolar protein 56 | 2,061 |
| Q15628 | Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein | 2,050 |

| | | |
|--------|---|-------|
| Q15080 | Neutrophil cytosol factor 4 | 2,017 |
| Q01432 | AMP deaminase 3 | 2,015 |
| O95361 | Tripartite motif-containing protein 16 | 2,014 |
| P08243 | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] | 2,012 |
| P36222 | Chitinase-3-like protein 1 | 1,987 |
| P15144 | Aminopeptidase N | 1,976 |
| Q01650 | Large neutral amino acids transporter small subunit 1 | 1,966 |
| Q9NSD9 | Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain | 1,956 |
| P30405 | Homo sapiens GN=PPIF PE=1 SV=1 - [PPIF_HUMAN] | 1,941 |
| O00182 | Galectin-9 | 1,938 |
| P07203 | Glutathione peroxidase 1 | 1,924 |
| P54886 | Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase | 1,905 |
| P08195 | 4F2 cell-surface antigen heavy chain | 1,901 |
| Q96GQ7 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27 | 1,887 |
| Q6IAA8 | RhoA activator C11orf59 | 1,879 |
| Q9UL46 | Proteasome activator complex subunit 2 | 1,854 |
| Q13451 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 | 1,853 |
| Q04760 | Lactoylglutathione lyase | 1,848 |
| P04839 | Cytochrome b-245 heavy chain | 1,837 |
| Q9Y6K5 | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3 | 1,836 |
| Q14019 | Coactosin-like protein | 1,835 |
| P46977 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide protein glycosyltransferase subunit STT3A | 1,822 |
| Q86WB0 | Nuclear-interacting partner of ALK | 1,818 |
| Q8NEZ5 | F-box only protein 22 | 1,817 |
| P08240 | Signal recognition particle receptor subunit alpha | 1,805 |
| P23141 | Liver carboxylesterase 1 | 1,803 |
| P51606 | N-acylglucosamine 2-epimerase | 1,796 |
| Q9Y3C7 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31 | 1,786 |
| Q96FV2 | Secernin-2 | 1,779 |
| Q96C86 | Scavenger mRNA-decapping enzyme DcpS | 1,764 |
| Q8NCC3 | Group XV phospholipase A2 | 1,760 |
| Q96IU4 | Abhydrolase domain-containing protein 14B | 1,751 |
| Q03518 | Antigen peptide transporter 1 | 1,746 |
| Q9P0J0 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 | 1,738 |
| O95104 | Splicing factor, arginine/serine-rich 15 | 1,732 |
| Q08AM6 | Protein VAC14 homolog | 1,720 |
| Q96B26 | Exosome complex exonuclease RRP43 | 1,719 |
| P06396 | Gelsolin | 1,718 |
| Q8N1F7 | Nuclear pore complex protein Nup93 | 1,718 |
| Q6P589 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8-like protein 2 | 1,716 |
| P10620 | Microsomal glutathione S-transferase 1 | 1,714 |
| P11166 | Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 | 1,713 |
| Q8NB16 | Mixed lineage kinase domain-like protein | 1,706 |
| O00767 | Acyl-CoA desaturase | 1,705 |
| Q4G0F5 | Vacuolar protein sorting-associated protein 26B | 1,705 |
| Q9C0E8 | Protein lunapark | 1,704 |
| Q9Y679 | Ancient ubiquitous protein 1 | 1,694 |
| Q8N5M4 | Tetratricopeptide repeat protein 9C | 1,693 |
| P11279 | Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 | 1,688 |
| Q9BU76 | Multiple myeloma tumor-associated protein 2 | 1,682 |
| Q9Y2Y0 | ADP-ribosylation factor-like protein 2-binding protein | 1,680 |
| P49591 | Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic | 1,666 |
| Q7Z5G4 | Golgin subfamily A member 7 | 1,664 |

| | | |
|--------|---|-------|
| Q7L5N7 | Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 | 1,659 |
| Q96GK7 | Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A | 1,658 |
| Q9Y5M8 | Signal recognition particle receptor subunit beta | 1,646 |
| Q13510 | Acid ceramidase | 1,632 |
| P16885 | 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2 | 1,620 |
| P46734 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3 | 1,616 |
| Q9UI09 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 | 1,616 |
| P99999 | Cytochrome c | 1,611 |
| Q9Y4C8 | Probable RNA-binding protein 19 | 1,601 |
| O43759 | Synaptogyrin-1 | 1,599 |
| Q9Y4Z0 | U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm4 | 1,597 |
| Q9Y5K5 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 | 1,596 |
| Q9Y4W6 | AFG3-like protein 2 | 1,593 |
| P62191 | 26S protease regulatory subunit 4 | 1,591 |
| P09110 | 3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal | 1,584 |
| P00505 | Aspartate aminotransferase, mitochondrial | 1,578 |
| Q9Y285 | Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain | 1,576 |
| P28066 | Proteasome subunit alpha type-5 | 1,574 |
| O75521 | Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase | 1,564 |
| Q9Y3E5 | Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial | 1,563 |
| P60520 | Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2 | 1,559 |
| P61626 | Lysozyme C | 1,558 |
| O96000 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 | 1,551 |
| P48454 | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit gamma isoform | 1,551 |
| P06865 | Beta-hexosaminidase subunit alpha | 1,549 |
| Q9Y6M9 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9 | 1,548 |
| Q02127 | Dihydroorotate dehydrogenase, mitochondrial | 1,548 |
| Q6P2E9 | Enhancer of mRNA-decapping protein 4 | 1,547 |
| P30740 | Leukocyte elastase inhibitor | 1,536 |
| Q96A26 | Protein FAM162A | 1,535 |
| P11021 | 78 kDa glucose-regulated protein | 1,532 |
| P19784 | Casein kinase II subunit alpha' | 1,510 |
| P49821 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial | 1,503 |
| Q06265 | Exosome complex exonuclease RRP45 | 1,501 |
| O00217 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial | 1,495 |
| Q13217 | DnaJ homolog subfamily C member 3 | 1,495 |
| Q96PU8 | Protein quaking | 1,487 |
| P46976 | Glycogenin-1 | 1,480 |
| P49406 | 39S ribosomal protein L19, mitochondrial | 1,461 |
| Q9Y2L1 | Exosome complex exonuclease RRP44 | 1,452 |
| Q9Y4I1 | Myosin-Va | 1,446 |
| Q7Z434 | Mitochondrial antiviral-signaling protein | 1,418 |
| O60315 | Zinc finger E-box-binding homeobox 2 | 0,818 |
| P34897 | Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial | 0,812 |
| P30153 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha | 0,807 |
| O43169 | Cytochrome b5 type B | 0,806 |
| Q16881 | Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic | 0,805 |
| P54105 | Methylosome subunit pICln | 0,802 |
| Q9Y448 | Putative TRAF4-associated factor 1 | 0,800 |
| Q9UJX2 | Cell division cycle protein 23 homolog | 0,800 |
| P49189 | 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase | 0,800 |
| O60610 | Protein diaphanous homolog 1 | 0,799 |
| P23526 | Adenosylhomocysteinase | 0,797 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| Q9BVJ6 | U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A | 0,794 |
| Q9NUY8 | TBC1 domain family member 23 | 0,792 |
| Q9Y266 | Nuclear migration protein nudC | 0,792 |
| Q9Y570 | Protein phosphatase methylesterase 1 | 0,791 |
| Q15758 | Neutral amino acid transporter B(0) | 0,791 |
| Q6ICG6 | Uncharacterized protein C22orf9 | 0,791 |
| P52701 | DNA mismatch repair protein Msh6 | 0,790 |
| Q9H444 | Charged multivesicular body protein 4b | 0,789 |
| Q9NQR4 | Omega-amidase NIT2 | 0,787 |
| O95379 | Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8 | 0,787 |
| Q14919 | Dr1-associated corepressor | 0,785 |
| P25098 | Beta-adrenergic receptor kinase 1 | 0,785 |
| Q99661 | Kinesin-like protein KIF2C | 0,784 |
| Q8WUM4 | Programmed cell death 6-interacting protein | 0,784 |
| O00170 | AH receptor-interacting protein | 0,783 |
| O95983 | Methyl-CpG-binding domain protein 3 | 0,783 |
| Q12846 | Syntaxin-4 | 0,782 |
| Q9BUJ2 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 | 0,780 |
| P33991 | DNA replication licensing factor MCM4 | 0,778 |
| Q86VP6 | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 | 0,776 |
| Q9Y315 | Putative deoxyribose-phosphate aldolase | 0,776 |
| Q9NS87 | Kinesin-like protein KIF15 | 0,775 |
| P60468 | Protein transport protein Sec61 subunit beta | 0,775 |
| Q9P289 | Serine/threonine-protein kinase MST4 | 0,775 |
| Q9UH65 | Switch-associated protein 70 | 0,774 |
| Q9NWZ3 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 | 0,772 |
| Q9NTJ5 | Phosphatidylinositide phosphatase SAC1 | 0,772 |
| Q14008 | Cytoskeleton-associated protein 5 | 0,772 |
| P07355 | Annexin A2 | 0,772 |
| Q9NZ01 | Trans-2,3-enoyl-CoA reductase | 0,770 |
| Q15059 | Bromodomain-containing protein 3 | 0,770 |
| P18887 | DNA repair protein XRCC1 | 0,770 |
| Q5VIR6 | Vacuolar protein sorting-associated protein 53 homolog | 0,769 |
| P04075 | Fructose-bisphosphate aldolase A | 0,767 |
| Q15036 | Sorting nexin-17 | 0,766 |
| P83876 | Thioredoxin-like protein 4A | 0,765 |
| Q9HAF1 | Chromatin modification-related protein MEAF6 | 0,763 |
| Q96EY5 | Multivesicular body subunit 12A | 0,763 |
| Q13011 | Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial | 0,762 |
| Q99613 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C | 0,762 |
| P42765 | 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial | 0,762 |
| Q9UBM7 | 7-dehydrocholesterol reductase | 0,762 |
| Q86V88 | Magnesium-dependent phosphatase 1 | 0,761 |
| Q96PU5 | E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4-like | 0,760 |
| Q9UBB5 | Methyl-CpG-binding domain protein 2 | 0,759 |
| O15355 | Protein phosphatase 1G | 0,759 |
| P09874 | Poly [ADP-ribose] polymerase 1 | 0,759 |
| Q9BTE7 | DCN1-like protein 5 | 0,758 |
| P16150 | Leukosialin | 0,758 |
| P49736 | DNA replication licensing factor MCM2 | 0,758 |
| Q9H4A3 | Serine/threonine-protein kinase WNK1 | 0,757 |
| P33992 | DNA replication licensing factor MCM5 | 0,756 |
| O00186 | Syntaxin-binding protein 3 | 0,754 |

| | | |
|--------|--|-------|
| Q68CZ2 | Tensin-3 | 0,754 |
| Q9NP77 | RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72 | 0,754 |
| P55957 | BH3-interacting domain death agonist | 0,753 |
| P21796 | Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | 0,751 |
| Q9BS26 | Endoplasmic reticulum resident protein 44 | 0,751 |
| Q8WVN8 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2 | 0,751 |
| Q00341 | Vigilin | 0,751 |
| Q13576 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 | 0,751 |
| Q96A49 | Synapse-associated protein 1 | 0,751 |
| O43143 | Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 | 0,750 |
| Q92667 | A kinase anchor protein 1, mitochondrial | 0,749 |
| Q93009 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 | 0,748 |
| Q07812 | Apoptosis regulator BAX | 0,748 |
| P13807 | Glycogen [starch] synthase, muscle | 0,747 |
| P30041 | Peroxiredoxin-6 | 0,746 |
| P61204 | ADP-ribosylation factor 3 | 0,743 |
| Q14728 | Major facilitator superfamily domain-containing protein 10 | 0,743 |
| Q8IU81 | Interferon regulatory factor 2-binding protein 1 | 0,743 |
| Q96N66 | Lysophospholipid acyltransferase 7 | 0,742 |
| P12955 | Xaa-Pro dipeptidase | 0,741 |
| Q96KP4 | Cytosolic non-specific dipeptidase | 0,741 |
| Q96EY4 | UPF0534 protein C4orf43 | 0,740 |
| P49321 | Nuclear autoantigenic sperm protein | 0,740 |
| P62316 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 | 0,739 |
| Q9NVT9 | Armadillo repeat-containing protein 1 | 0,738 |
| Q96GD4 | Serine/threonine-protein kinase 12 | 0,736 |
| P98194 | Calcium-transporting ATPase type 2C member 1 | 0,735 |
| O95831 | Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial | 0,735 |
| P33993 | DNA replication licensing factor MCM7 | 0,733 |
| Q53FV1 | ORM1-like protein 2 | 0,733 |
| P29401 | Transketolase | 0,733 |
| O14972 | Down syndrome critical region protein 3 | 0,732 |
| P61599 | N-terminal acetyltransferase B complex catalytic subunit NAT5 | 0,732 |
| Q96HE7 | ERO1-like protein alpha | 0,732 |
| P52732 | Kinesin-like protein KIF11 | 0,731 |
| P49137 | MAP kinase-activated protein kinase 2 | 0,729 |
| Q99426 | Tubulin-folding cofactor B | 0,728 |
| O75312 | Zinc finger protein ZPR1 | 0,728 |
| Q9Y376 | Calcium-binding protein 39 | 0,727 |
| Q13526 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 | 0,727 |
| Q8TDX7 | Serine/threonine-protein kinase Nek7 | 0,727 |
| Q6ZUJ8 | Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1 | 0,727 |
| Q53EL6 | Programmed cell death protein 4 | 0,727 |
| Q15021 | Condensin complex subunit 1 | 0,725 |
| Q9Y4L1 | Hypoxia up-regulated protein 1 | 0,725 |
| P40937 | Replication factor C subunit 5 | 0,725 |
| Q96IX5 | Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5 | 0,724 |
| P17174 | Aspartate aminotransferase, cytoplasmic | 0,724 |
| Q8NDI1 | EH domain-binding protein 1 | 0,723 |
| P16949 | Stathmin | 0,723 |
| Q9HCN4 | GPN-loop GTPase 1 | 0,721 |
| O14929 | Histone acetyltransferase type B catalytic subunit | 0,721 |
| P50897 | Palmitoyl-protein thioesterase 1 | 0,720 |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| Q68CQ4 | Digestive organ expansion factor homolog | 0,720 |
| Q8NBS9 | Thioredoxin domain-containing protein 5 | 0,719 |
| Q9BZF1 | Oxysterol-binding protein-related protein 8 | 0,719 |
| A2RRP1 | Neuroblastoma-amplified sequence | 0,718 |
| P35251 | Replication factor C subunit 1 | 0,718 |
| P50579 | Methionine aminopeptidase 2 | 0,716 |
| P08648 | Integrin alpha-5 | 0,715 |
| Q9NRN7 | L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase | 0,715 |
| O00429 | Dynamin-1-like protein | 0,715 |
| Q9NRL2 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A | 0,712 |
| Q16706 | Alpha-mannosidase 2 | 0,712 |
| P49915 | GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] | 0,712 |
| O75083 | WD repeat-containing protein 1 | 0,709 |
| O43707 | Alpha-actinin-4 | 0,707 |
| P07858 | Cathepsin B | 0,705 |
| P30043 | Flavin reductase | 0,704 |
| O14737 | Programmed cell death protein 5 | 0,703 |
| Q9H5X1 | Protein FAM96A | 0,702 |
| P62314 | Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 | 0,701 |
| P20073 | Annexin A7 | 0,701 |
| Q8WXG6 | MAP kinase-activating death domain protein | 0,700 |
| Q9Y5Q8 | General transcription factor 3C polypeptide 5 | 0,700 |
| Q13303 | Voltage-gated potassium channel subunit beta-2 | 0,700 |
| Q13188 | Serine/threonine-protein kinase 3 | 0,698 |
| O75477 | Erlin-1 | 0,697 |
| P05556 | Integrin beta-1 | 0,697 |
| P29084 | Transcription initiation factor IIE subunit beta | 0,696 |
| Q96S19 | UPF0585 protein C16orf13 | 0,696 |
| P49840 | Glycogen synthase kinase-3 alpha | 0,695 |
| Q9UQE7 | Structural maintenance of chromosomes protein 3 | 0,695 |
| P36639 | 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase | 0,695 |
| O95071 | E3 ubiquitin-protein ligase UBR5 | 0,694 |
| Q8ND24 | RING finger protein 214 | 0,694 |
| Q9UMY4 | Sorting nexin-12 | 0,693 |
| Q13363 | C-terminal-binding protein 1 | 0,693 |
| Q9H2U2 | Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial | 0,692 |
| O14976 | Cyclin-G-associated kinase | 0,692 |
| Q9UPU5 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24 | 0,691 |
| P09960 | Leukotriene A-4 hydrolase | 0,690 |
| Q14139 | Ubiquitin conjugation factor E4 A | 0,689 |
| P05771 | Protein kinase C beta type | 0,689 |
| P48426 | Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha | 0,689 |
| P28340 | DNA polymerase delta catalytic subunit | 0,686 |
| Q96T88 | E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1 | 0,686 |
| P38117 | Electron transfer flavoprotein subunit beta | 0,685 |
| Q8IWX8 | Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein | 0,685 |
| Q96BD8 | Spindle and kinetochore-associated protein 1 | 0,684 |
| P09972 | Fructose-bisphosphate aldolase C | 0,684 |
| Q00765 | Receptor expression-enhancing protein 5 | 0,684 |
| P35232 | Prohibitin | 0,684 |
| P22681 | E3 ubiquitin-protein ligase CBL | 0,683 |
| Q9NQC3 | Reticulon-4 | 0,682 |
| P15927 | Replication protein A 32 kDa subunit | 0,682 |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| Q8IYS1 | Peptidase M20 domain-containing protein 2 | 0,681 |
| P45974 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 | 0,679 |
| P61081 | NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 | 0,678 |
| Q96C19 | EF-hand domain-containing protein D2 | 0,678 |
| Q9UJY4 | ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2 | 0,677 |
| Q99623 | Prohibitin-2 | 0,677 |
| O43633 | Charged multivesicular body protein 2a | 0,674 |
| Q5JPH6 | Probable glutamyl-tRNA synthetase, mitochondrial | 0,673 |
| P33316 | Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial | 0,673 |
| O00273 | DNA fragmentation factor subunit alpha | 0,671 |
| Q9NZL4 | Hsp70-binding protein 1 | 0,671 |
| Q13642 | Four and a half LIM domains protein 1 | 0,670 |
| P19174 | 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 | 0,669 |
| Q8NBF6 | Late secretory pathway protein AVL9 homolog | 0,669 |
| Q01082 | Spectrin beta chain, brain 1 | 0,668 |
| O60488 | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 | 0,667 |
| Q9NVE7 | Pantothenate kinase 4 | 0,666 |
| Q07065 | Cytoskeleton-associated protein 4 | 0,665 |
| P16401 | Histone H1.5 | 0,663 |
| P16615 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 | 0,662 |
| Q9NV35 | Probable 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase NUDT15 | 0,661 |
| Q13263 | Transcription intermediary factor 1-beta | 0,660 |
| Q96A72 | Protein mago nashi homolog 2 | 0,660 |
| Q15637 | Splicing factor 1 | 0,659 |
| Q99808 | Equilibrative nucleoside transporter 1 | 0,659 |
| O43390 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R | 0,656 |
| O75390 | Citrate synthase, mitochondrial | 0,654 |
| P13489 | Ribonuclease inhibitor | 0,653 |
| P35250 | Replication factor C subunit 2 | 0,653 |
| O43156 | Uncharacterized protein KIAA0406 | 0,652 |
| P83731 | 60S ribosomal protein L24 | 0,652 |
| Q96G23 | LAG1 longevity assurance homolog 2 | 0,650 |
| P35611 | Alpha-adducin | 0,649 |
| Q9NTJ3 | Structural maintenance of chromosomes protein 4 | 0,648 |
| P19388 | DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1 | 0,644 |
| Q9Y6I3 | Epsin-1 | 0,644 |
| O95273 | Cyclin-D1-binding protein 1 | 0,644 |
| Q9UK76 | Hematological and neurological expressed 1 protein | 0,640 |
| Q13185 | Chromobox protein homolog 3 | 0,639 |
| Q9UBT2 | SUMO-activating enzyme subunit 2 | 0,636 |
| Q5BJH7 | Protein YIF1B | 0,630 |
| Q9UBE0 | SUMO-activating enzyme subunit 1 | 0,630 |
| Q8TCG1 | Protein CIP2A | 0,629 |
| Q96KC2 | ADP-ribosylation factor-like protein 5B | 0,629 |
| O75787 | Renin receptor | 0,629 |
| P52294 | Importin subunit alpha-1 | 0,628 |
| Q9ULZ3 | Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD | 0,627 |
| P04792 | Heat shock protein beta-1 | 0,627 |
| Q9BTE3 | UPF0557 protein C10orf119 | 0,626 |
| P48595 | Serpin B10 | 0,624 |
| P30520 | Adenylosuccinate synthetase isozyme 2 | 0,624 |
| Q9H5N1 | Rab GTPase-binding effector protein 2 | 0,620 |
| O60568 | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 | 0,619 |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| Q9UQ13 | Leucine-rich repeat protein SHOC-2 | 0,619 |
| Q12959 | Disks large homolog 1 | 0,612 |
| P24752 | Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial | 0,612 |
| Q969Z0 | Protein TBRG4 | 0,608 |
| P84022 | Mothers against decapentaplegic homolog 3 | 0,606 |
| Q9H098 | Protein FAM107B | 0,606 |
| Q8NF37 | Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 | 0,604 |
| Q9NTG7 | NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial | 0,603 |
| O75391 | Sperm-associated antigen 7 | 0,602 |
| P53367 | Arfaptin-1 | 0,602 |
| Q9P031 | Thyroid transcription factor 1-associated protein 26 | 0,601 |
| Q12882 | Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP+] | 0,600 |
| P05107 | Integrin beta-2 | 0,595 |
| Q2M2I8 | AP2-associated protein kinase 1 | 0,595 |
| Q9Y6A5 | Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3 | 0,595 |
| Q53FT3 | Uncharacterized protein C11orf73 | 0,587 |
| Q6PII5 | Hydroxyacylglutathione hydrolase-like protein | 0,587 |
| O43379 | WD repeat-containing protein 62 | 0,583 |
| Q68EM7 | Rho GTPase-activating protein 17 | 0,581 |
| Q92673 | Sortilin-related receptor | 0,578 |
| Q86VP1 | Tax1-binding protein 1 | 0,576 |
| Q03426 | Mevalonate kinase | 0,570 |
| P49643 | DNA primase large subunit | 0,565 |
| Q9Y2V2 | Calcium-regulated heat stable protein 1 | 0,563 |
| P49411 | Elongation factor Tu, mitochondrial | 0,562 |
| Q9UNP9 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E | 0,560 |
| Q9Y240 | C-type lectin domain family 11 member A | 0,557 |
| Q8IXW5 | Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2 | 0,557 |
| Q9NVV4 | Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial | 0,556 |
| P52756 | RNA-binding protein 5 | 0,551 |
| P42330 | Aldo-keto reductase family 1 member C3 | 0,547 |
| Q8IX90 | Spindle and kinetochore-associated protein 3 | 0,547 |
| P36871 | Phosphoglucomutase-1 | 0,545 |
| Q8NBJ5 | Procollagen galactosyltransferase 1 | 0,544 |
| Q9H773 | dCTP pyrophosphatase 1 | 0,536 |
| O15305 | Phosphomannomutase 2 | 0,533 |
| P18858 | DNA ligase 1 | 0,528 |
| Q9NXX8 | F-box/LRR-repeat protein 12 | 0,525 |
| P30533 | Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein | 0,518 |
| Q9UBR2 | Cathepsin Z | 0,514 |
| Q9H074 | Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 | 0,514 |
| Q9NX70 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 29 | 0,510 |
| P08670 | Vimentin | 0,499 |
| Q9Y4K1 | Absent in melanoma 1 protein | 0,497 |
| Q86VI3 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3 | 0,496 |
| Q86WQ0 | Nuclear receptor 2C2-associated protein | 0,493 |
| Q8TEM1 | Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | 0,492 |
| Q8N2K1 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J2 | 0,488 |
| A3KN83 | Protein strawberry notch homolog 1 | 0,484 |
| P15090 | Fatty acid-binding protein, adipocyte | 0,482 |
| Q8N335 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein | 0,481 |
| Q9UQN3 | Charged multivesicular body protein 2b | 0,464 |
| P61313 | 60S ribosomal protein L15 | 0,435 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| Q9UKT5 | F-box only protein 4 | 0,433 |
| P49366 | Deoxyhypusine synthase | 0,432 |
| Q9UKG1 | DCC-interacting protein 13-alpha | 0,427 |
| Q8TF42 | Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein B | 0,424 |
| Q9UGI8 | Testin | 0,421 |
| Q9P2N5 | RNA-binding protein 27 | 0,402 |
| Q96S97 | Myeloid-associated differentiation marker | 0,310 |

Endoglina Corta

| Nº Acceso | Descripción | Ratio |
|---------------|--|--------------|
| P08311 | Cathepsin G | 7,045 |
| P24158 | Myeloblastin | 6,438 |
| Q9H939 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2 | 5,408 |
| P09132 | Signal recognition particle 19 kDa protein | 4,902 |
| P14373 | Zinc finger protein RFP | 4,071 |
| P32320 | Cytidine deaminase | 3,945 |
| Q9P016 | Thymocyte nuclear protein 1 | 3,932 |
| P24468 | COUP transcription factor 2 | 3,101 |
| Q92905 | COP9 signalosome complex subunit 5 | 2,675 |
| Q8IZQ5 | Selenoprotein H | 2,657 |
| O76096 | Cystatin-F | 2,605 |
| O43586 | Proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 | 2,397 |
| Q9GZQ3 | COMM domain-containing protein 5 | 2,323 |
| O14907 | Tax1-binding protein 3 | 2,250 |
| O95361 | Tripartite motif-containing protein 16 | 2,221 |
| Q9H7L9 | Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3 | 2,167 |
| Q9Y3C1 | Nucleolar protein 16 | 2,031 |
| Q96ES7 | SAGA-associated factor 29 homolog | 2,031 |
| Q8TB61 | Adenosine 3'-phospho 5'-phosphosulfate transporter 1 | 2,022 |
| P05120 | Plasminogen activator inhibitor 2 | 1,980 |
| Q4G0F5 | Vacuolar protein sorting-associated protein 26B | 1,936 |
| Q15080 | Neutrophil cytosol factor 4 | 1,914 |
| Q9C0B1 | Protein fto | 1,909 |
| Q9BYD6 | 39S ribosomal protein L1, mitochondrial | 1,900 |
| Q01432 | AMP deaminase 3 | 1,885 |
| P30740 | Leukocyte elastase inhibitor | 1,868 |
| Q13765 | Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha | 1,859 |
| P50225 | Sulfotransferase 1A1 | 1,855 |
| P28070 | Proteasome subunit beta type-4 | 1,854 |
| P08134 | Rho-related GTP-binding protein RhoC | 1,763 |
| P46977 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | 1,752 |
| Q9Y5M8 | Signal recognition particle receptor subunit beta | 1,728 |
| P15104 | Glutamine synthetase | 1,696 |
| Q13636 | Ras-related protein Rab-31 | 1,695 |
| P19623 | Spermidine synthase | 1,693 |
| P08246 | Neutrophil elastase | 1,675 |
| Q01543 | Friend leukemia integration 1 transcription factor | 1,665 |
| P11166 | Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 | 1,661 |
| P15144 | Aminopeptidase N | 1,659 |
| P50995 | Annexin A11 | 1,653 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| P39687 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A | 1,640 |
| P04839 | Cytochrome b-245 heavy chain | 1,628 |
| P51665 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 | 1,611 |
| Q92478 | C-type lectin domain family 2 member B | 1,610 |
| Q969U7 | Proteasome assembly chaperone 2 | 1,608 |
| O00182 | Galectin-9 | 1,567 |
| P31930 | Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial | 1,565 |
| Q5JTV8 | Torsin-1A-interacting protein 1 | 1,559 |
| O95544 | NAD kinase | 1,556 |
| O60762 | Dolichol-phosphate mannosyltransferase | 1,538 |
| P20618 | Proteasome subunit beta type-1 | 1,529 |
| Q8NCE2 | Myotubularin-related protein 14 | 1,528 |
| P62873 | Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 | 1,519 |
| O95352 | Autophagy-related protein 7 | 1,498 |
| P06132 | Uroporphyrinogen decarboxylase | 1,486 |
| Q02252 | Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial | 1,480 |
| Q9Y6K5 | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3 | 1,476 |
| Q9Y285 | Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain | 1,459 |
| O75190 | DnaJ homolog subfamily B member 6 | 1,456 |
| P68400 | Casein kinase II subunit alpha | 1,456 |
| P11279 | Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 | 1,449 |
| P02545 | Lamin-A/C | 1,386 |
| Q8N0X7 | Spartin | 0,830 |
| O60231 | Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16 | 0,824 |
| Q9BTT0 | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E | 0,818 |
| P13489 | Ribonuclease inhibitor | 0,818 |
| O75494 | Splicing factor, arginine/serine-rich 13A | 0,817 |
| Q14157 | Ubiquitin-associated protein 2-like | 0,816 |
| P35250 | Replication factor C subunit 2 | 0,811 |
| Q16666 | Gamma-interferon-inducible protein 16 | 0,809 |
| Q9H307 | Pinin | 0,808 |
| Q14739 | Lamin-B receptor | 0,805 |
| Q92888 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 | 0,805 |
| O00429 | Dynamin-1-like protein | 0,803 |
| Q9NWS0 | PIH1 domain-containing protein 1 | 0,801 |
| P06744 | Glucose-6-phosphate isomerase | 0,801 |
| P53621 | Coatomer subunit alpha | 0,798 |
| Q8N8A2 | Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B | 0,798 |
| P42330 | Aldo-keto reductase family 1 member C3 | 0,797 |
| P54727 | UV excision repair protein RAD23 homolog B | 0,795 |
| P62158 | Calmodulin | 0,794 |
| Q07960 | Rho GTPase-activating protein 1 | 0,794 |
| P63104 | 14-3-3 protein zeta/delta | 0,792 |
| Q8WV22 | Non-structural maintenance of chromosomes element 1 homolog | 0,792 |
| Q9ULW0 | Targeting protein for Xklp2 | 0,792 |
| Q9NP77 | RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72 | 0,791 |
| Q92522 | Histone H1x | 0,791 |
| O75390 | Citrate synthase, mitochondrial | 0,790 |
| P25205 | DNA replication licensing factor MCM3 | 0,788 |
| P50570 | Dynamin-2 | 0,787 |
| Q9NRX1 | RNA-binding protein PNO1 | 0,786 |
| P00338 | L-lactate dehydrogenase A chain | 0,786 |
| Q8WX92 | Negative elongation factor B | 0,786 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| Q9Y6Y0 | Influenza virus NS1A-binding protein | 0,786 |
| P63241 | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1 | 0,785 |
| P40425 | Pre-B-cell leukemia transcription factor 2 | 0,784 |
| Q13123 | Protein Red | 0,784 |
| Q99661 | Kinesin-like protein KIF2C | 0,783 |
| Q8N668 | COMM domain-containing protein 1 | 0,782 |
| P50613 | Cell division protein kinase 7 | 0,779 |
| O60828 | Polyglutamine-binding protein 1 | 0,779 |
| Q86VP6 | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 | 0,779 |
| Q9H467 | CUE domain-containing protein 2 | 0,779 |
| P49840 | Glycogen synthase kinase-3 alpha | 0,778 |
| Q8NF50 | Dedicator of cytokinesis protein 8 | 0,777 |
| Q9NQW6 | Actin-binding protein anillin | 0,777 |
| Q01844 | RNA-binding protein EWS | 0,777 |
| Q96G23 | LAG1 longevity assurance homolog 2 | 0,776 |
| Q8N4C8 | Misshapen-like kinase 1 | 0,776 |
| Q9NTJ3 | Structural maintenance of chromosomes protein 4 | 0,776 |
| P53999 | Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 | 0,775 |
| P49189 | 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase | 0,775 |
| O00287 | Regulatory factor X-associated protein | 0,775 |
| Q96G03 | Phosphoglucomutase-2 | 0,774 |
| Q9P031 | Thyroid transcription factor 1-associated protein 26 | 0,774 |
| Q96SY0 | UPF0464 protein C15orf44 | 0,773 |
| P51946 | Cyclin-H | 0,773 |
| Q9UNN5 | FAS-associated factor 1 | 0,771 |
| P11717 | Cation-independent mannose-6-phosphate receptor | 0,771 |
| Q9NV70 | Exocyst complex component 1 | 0,770 |
| Q8NBJ5 | Procollagen galactosyltransferase 1 | 0,770 |
| O95831 | Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial | 0,770 |
| O95347 | Structural maintenance of chromosomes protein 2 | 0,770 |
| Q16706 | Alpha-mannosidase 2 | 0,769 |
| Q12882 | Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP+] | 0,768 |
| P60468 | Protein transport protein Sec61 subunit beta | 0,768 |
| P14314 | Glucosidase 2 subunit beta | 0,768 |
| Q70UQ0 | Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein | 0,767 |
| Q13442 | 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein | 0,766 |
| Q12834 | Cell division cycle protein 20 homolog | 0,765 |
| Q96P16 | Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A | 0,765 |
| Q96DB5 | Regulator of microtubule dynamics protein 1 | 0,765 |
| P62241 | 40S ribosomal protein S8 | 0,765 |
| Q13889 | General transcription factor IIH subunit 3 | 0,765 |
| Q96KB5 | Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase | 0,764 |
| P78362 | Serine/threonine-protein kinase SRPK2 | 0,764 |
| Q99700 | Ataxin-2 | 0,763 |
| P06493 | Cell division control protein 2 homolog | 0,763 |
| Q9NYB0 | Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1 | 0,763 |
| O75116 | Rho-associated protein kinase 2 | 0,763 |
| Q04726 | Transducin-like enhancer protein 3 | 0,762 |
| O00170 | AH receptor-interacting protein | 0,761 |
| O75044 | SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2 | 0,761 |
| Q86V88 | Magnesium-dependent phosphatase 1 | 0,761 |
| Q8NHP8 | Putative phospholipase B-like 2 | 0,761 |
| Q9H4A3 | Serine/threonine-protein kinase WNK1 | 0,759 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| P52732 | Kinesin-like protein KIF11 | 0,759 |
| Q93009 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 | 0,758 |
| Q9H0C8 | Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C | 0,758 |
| A0AVT1 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 | 0,757 |
| Q0VDF9 | Heat shock 70 kDa protein 14 | 0,756 |
| P40763 | Signal transducer and activator of transcription 3 | 0,756 |
| Q5T6F2 | Ubiquitin-associated protein 2 | 0,755 |
| O75475 | PC4 and SFRS1-interacting protein | 0,755 |
| Q14694 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10 | 0,755 |
| P52294 | Importin subunit alpha-1 | 0,754 |
| Q8IU81 | Interferon regulatory factor 2-binding protein 1 | 0,753 |
| Q13011 | Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial | 0,752 |
| Q14653 | Interferon regulatory factor 3 | 0,752 |
| P04792 | Heat shock protein beta-1 | 0,752 |
| Q86WQ0 | Nuclear receptor 2C2-associated protein | 0,752 |
| P08575 | Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C | 0,752 |
| Q7Z460 | CLIP-associating protein 1 | 0,750 |
| P52701 | DNA mismatch repair protein Msh6 | 0,749 |
| Q08209 | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform | 0,749 |
| Q9Y388 | RNA-binding motif protein, X-linked 2 | 0,748 |
| P09884 | DNA polymerase alpha catalytic subunit | 0,748 |
| P22314 | Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 | 0,748 |
| P78318 | Immunoglobulin-binding protein 1 | 0,746 |
| Q13451 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP5 | 0,746 |
| Q8TD19 | Serine/threonine-protein kinase Nek9 | 0,746 |
| Q96N66 | Lysophospholipid acyltransferase 7 | 0,745 |
| P30533 | Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein | 0,745 |
| Q92696 | Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha | 0,745 |
| Q16576 | Histone-binding protein RBBP7 | 0,744 |
| P17480 | Nucleolar transcription factor 1 | 0,743 |
| Q12962 | Transcription initiation factor TFIID subunit 10 | 0,742 |
| P61081 | NEDD8-conjugating enzyme Ubc12 | 0,742 |
| P43246 | DNA mismatch repair protein Msh2 | 0,742 |
| Q9NX63 | Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 3, mitochondrial | 0,742 |
| P47813 | Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal | 0,742 |
| P18669 | Phosphoglycerate mutase 1 | 0,741 |
| P05556 | Integrin beta-1 | 0,741 |
| P37268 | Squalene synthetase | 0,741 |
| A0FGR8 | Extended synaptotagmin-2 | 0,741 |
| Q9Y383 | Putative RNA-binding protein Luc7-like 2 | 0,741 |
| Q9H129 | Tetraspanin-10 | 0,740 |
| P84022 | Mothers against decapentaplegic homolog 3 | 0,740 |
| Q86VS8 | Protein Hook homolog 3 | 0,740 |
| Q8IYS1 | Peptidase M20 domain-containing protein 2 | 0,740 |
| P14735 | Insulin-degrading enzyme | 0,739 |
| O60488 | Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 | 0,739 |
| P26639 | Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic | 0,739 |
| Q567U6 | Coiled-coil domain-containing protein 93 | 0,739 |
| Q9BWS9 | Chitinase domain-containing protein 1 | 0,738 |
| Q8IX04 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 3 | 0,738 |
| P31946 | 14-3-3 protein beta/alpha | 0,738 |
| Q13576 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2 | 0,737 |
| Q9Y6N5 | Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial | 0,737 |

| | | |
|--------|--|-------|
| P24752 | Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial | 0,737 |
| Q9UQN3 | Charged multivesicular body protein 2b | 0,736 |
| P53396 | ATP-citrate synthase | 0,734 |
| Q9NQC3 | Reticulon-4 | 0,733 |
| Q68CQ4 | Digestive organ expansion factor homolog | 0,733 |
| Q9BUJ2 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 | 0,733 |
| Q9NZK5 | Adenosine deaminase CECR1 | 0,732 |
| Q9BS26 | Endoplasmic reticulum resident protein 44 | 0,731 |
| O14727 | Apoptotic protease-activating factor 1 | 0,731 |
| P36871 | Phosphoglucomutase-1 | 0,730 |
| P30153 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A | 0,729 |
| O75688 | Protein phosphatase 1B | 0,729 |
| P38117 | Electron transfer flavoprotein subunit beta | 0,728 |
| Q96EY5 | Multivesicular body subunit 12A | 0,728 |
| Q9UKX7 | Nuclear pore complex protein Nup50 | 0,728 |
| Q9ULH1 | Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 | 0,727 |
| Q96GG9 | DCN1-like protein 1 | 0,727 |
| P08621 | U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa | 0,726 |
| P33316 | Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial | 0,726 |
| P16401 | Histone H1.5 | 0,726 |
| O60701 | UDP-glucose 6-dehydrogenase | 0,725 |
| Q06830 | Peroxiredoxin-1 | 0,725 |
| Q9NVI1 | Fanconi anemia group I protein | 0,725 |
| P00390 | Glutathione reductase, mitochondrial | 0,725 |
| Q15750 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7-interacting protein 1 | 0,725 |
| P09429 | High mobility group protein B1 | 0,725 |
| Q96BN2 | Transcriptional adapter 1 | 0,724 |
| P49736 | DNA replication licensing factor MCM2 | 0,724 |
| O75179 | Ankyrin repeat domain-containing protein 17 | 0,724 |
| Q9NSI2 | Uncharacterized protein C21orf70 | 0,723 |
| Q07812 | Apoptosis regulator BAX | 0,723 |
| Q96KP4 | Cytosolic non-specific dipeptidase | 0,722 |
| Q13568 | Interferon regulatory factor 5 | 0,722 |
| P60174 | Triosephosphate isomerase | 0,722 |
| Q9NZ01 | Trans-2,3-enoyl-CoA reductase | 0,722 |
| Q8IY57 | YY1-associated factor 2 | 0,721 |
| Q9NV35 | Probable 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase NUDT15 | 0,721 |
| O43709 | Uncharacterized methyltransferase WBSCR22 | 0,721 |
| P05107 | Integrin beta-2 | 0,720 |
| P52594 | Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1 | 0,720 |
| Q96GM5 | SWI/SNF-related matrix associated actin dependent regulator of chromatin | 0,719 |
| Q01085 | Nucleolysin TIAR | 0,719 |
| P36222 | Chitinase-3-like protein 1 | 0,718 |
| P49643 | DNA primase large subunit | 0,717 |
| Q15554 | Telomeric repeat-binding factor 2 | 0,717 |
| Q8IUF8 | MYC-induced nuclear antigen | 0,717 |
| Q5BKZ1 | Zinc finger protein 326 | 0,716 |
| Q13619 | Cullin-4A | 0,716 |
| P51858 | Hepatoma-derived growth factor | 0,715 |
| Q15758 | Neutral amino acid transporter B(0) | 0,715 |
| P61313 | 60S ribosomal protein L15 | 0,714 |
| Q9NUU7 | ATP-dependent RNA helicase DDX19A | 0,714 |
| Q16763 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S | 0,714 |

| | | |
|--------|---|-------|
| P11388 | DNA topoisomerase 2-alpha | 0,714 |
| O00139 | Kinesin-like protein KIF2A | 0,713 |
| Q53EL6 | Programmed cell death protein 4 | 0,713 |
| O43707 | Alpha-actinin-4 | 0,713 |
| Q8IWS0 | PHD finger protein 6 | 0,712 |
| Q9BZQ8 | Protein Niban | 0,712 |
| P53618 | Coatomer subunit beta | 0,711 |
| Q9UHD1 | Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1 | 0,711 |
| Q9UJA5 | tRNA (adenine-N(1)-)-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6 | 0,711 |
| Q9NUQ2 | 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon | 0,710 |
| O60343 | TBC1 domain family member 4 | 0,710 |
| Q10471 | Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 | 0,710 |
| O60502 | Bifunctional protein NCOAT | 0,709 |
| Q9Y315 | Putative deoxyribose-phosphate aldolase | 0,707 |
| Q15637 | Splicing factor 1 | 0,707 |
| P33991 | DNA replication licensing factor MCM4 | 0,707 |
| O15533 | Tapasin | 0,706 |
| Q9ULV4 | Coronin-1C | 0,706 |
| P49915 | GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] | 0,706 |
| Q9ULW3 | Activator of basal transcription 1 | 0,704 |
| O00308 | NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase WWP2 | 0,704 |
| P05771 | Protein kinase C beta type | 0,703 |
| Q13813 | Spectrin alpha chain, brain | 0,702 |
| Q969Z0 | Protein TBRG4 | 0,701 |
| Q9NWX4 | UPF0609 protein C4orf27 | 0,701 |
| Q8NF37 | Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 | 0,701 |
| Q5JVF3 | PCI domain-containing protein 2 | 0,701 |
| Q9HBI1 | Beta-parvin | 0,699 |
| P53634 | Dipeptidyl peptidase 1 | 0,699 |
| O15355 | Protein phosphatase 1G | 0,698 |
| Q9NZZ2 | Opioid growth factor receptor | 0,696 |
| Q00765 | Receptor expression-enhancing protein 5 | 0,696 |
| Q99735 | Microsomal glutathione S-transferase 2 | 0,695 |
| Q96HR3 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30 | 0,694 |
| Q9BXS6 | Nucleolar and spindle-associated protein 1 | 0,694 |
| Q96EP5 | DAZ-associated protein 1 | 0,693 |
| Q9NPQ8 | Synembryn-A | 0,693 |
| Q13112 | Chromatin assembly factor 1 subunit B | 0,692 |
| Q9HB40 | Retinoid-inducible serine carboxypeptidase | 0,691 |
| Q12974 | Protein tyrosine phosphatase type IVA 2 | 0,690 |
| P49321 | Nuclear autoantigenic sperm protein | 0,689 |
| P16284 | Platelet endothelial cell adhesion molecule | 0,689 |
| O43175 | D-3-phosphoglycerate dehydrogenase | 0,689 |
| P42704 | Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial | 0,689 |
| P31689 | DnaJ homolog subfamily A member 1 | 0,687 |
| Q14566 | DNA replication licensing factor MCM6 | 0,687 |
| Q9BZX2 | Uridine-cytidine kinase 2 | 0,686 |
| Q99623 | Prohibitin-2 | 0,685 |
| O14545 | TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1 | 0,685 |
| Q96BD8 | Spindle and kinetochore-associated protein 1 | 0,684 |
| O95486 | Protein transport protein Sec24A | 0,684 |
| Q68EM7 | Rho GTPase-activating protein 17 | 0,684 |
| Q9BPX3 | Condensin complex subunit 3 | 0,682 |

| | | |
|--------|---|-------|
| P30041 | Peroxiredoxin-6 | 0,681 |
| P40121 | Macrophage-capping protein | 0,680 |
| P50502 | Hsc70-interacting protein | 0,680 |
| P46734 | Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3 | 0,679 |
| Q9Y678 | Coatomer subunit gamma | 0,679 |
| P52758 | Ribonuclease UK114 | 0,679 |
| Q9BTE7 | DCN1-like protein 5 | 0,679 |
| Q9UBW8 | COP9 signalosome complex subunit 7a | 0,678 |
| O00186 | Syntaxin-binding protein 3 | 0,678 |
| O15446 | DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA34 | 0,677 |
| O15525 | Transcription factor MafG | 0,677 |
| P14209 | CD99 antigen | 0,676 |
| Q9H1E5 | Thioredoxin-related transmembrane protein 4 | 0,676 |
| P78549 | Endonuclease III-like protein 1 | 0,675 |
| O96005 | Cleft lip and palate transmembrane protein 1 | 0,675 |
| P41208 | Centrin-2 | 0,675 |
| Q9Y2V2 | Calcium-regulated heat stable protein 1 | 0,673 |
| Q9H0Q0 | Protein FAM49A | 0,673 |
| Q9UGI8 | Testin | 0,672 |
| Q9BW19 | Kinesin-like protein KIFC1 | 0,672 |
| Q86VP1 | Tax1-binding protein 1 | 0,671 |
| Q96B97 | SH3 domain-containing kinase-binding protein 1 | 0,671 |
| Q9Y617 | Phosphoserine aminotransferase | 0,670 |
| P52565 | Rho GDP-dissociation inhibitor 1 | 0,670 |
| Q13423 | NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial | 0,670 |
| Q8IWX8 | Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein | 0,670 |
| Q13952 | Nuclear transcription factor Y subunit gamma | 0,669 |
| Q92797 | Symplekin | 0,669 |
| Q9Y6I3 | Epsin-1 | 0,669 |
| Q9HAV0 | Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4 | 0,668 |
| Q9BVC5 | Ashwin | 0,666 |
| O94763 | Unconventional prefoldin RPB5 interactor | 0,666 |
| O60885 | Bromodomain-containing protein 4 | 0,663 |
| Q9Y240 | C-type lectin domain family 11 member A | 0,663 |
| P54886 | Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase | 0,663 |
| P30043 | Flavin reductase | 0,663 |
| P19387 | DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB3 | 0,661 |
| P04083 | Annexin A1 | 0,660 |
| P61599 | N-terminal acetyltransferase B complex catalytic subunit NAT5 | 0,659 |
| P30154 | Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A | 0,659 |
| Q8NBF6 | Late secretory pathway protein AVL9 homolog | 0,655 |
| Q00688 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3 | 0,655 |
| Q8WW33 | Gametocyte-specific factor 1 | 0,654 |
| Q9BVV7 | TIM21-like protein, mitochondrial | 0,654 |
| Q8N335 | Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein | 0,653 |
| Q9NXX6 | Non-structural maintenance of chromosomes element 4 homolog A | 0,653 |
| Q8ND56 | Protein LSM14 homolog A | 0,653 |
| Q53FT3 | Uncharacterized protein C11orf73 | 0,653 |
| Q96A72 | Protein mago nashi homolog 2 | 0,652 |
| Q9UMX5 | Neudesin | 0,651 |
| Q8TCG1 | Protein CIP2A | 0,650 |
| Q6PII5 | Hydroxyacylglutathione hydrolase-like protein | 0,649 |
| Q12792 | Twinfilin-1 | 0,648 |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| Q9UKF6 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3 | 0,647 |
| P16403 | Histone H1.2 | 0,646 |
| O75530 | Polycomb protein EED | 0,645 |
| Q96A49 | Synapse-associated protein 1 | 0,645 |
| O43156 | Uncharacterized protein KIAA0406 | 0,645 |
| O95983 | Methyl-CpG-binding domain protein 3 | 0,644 |
| O60287 | Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1 | 0,640 |
| O60711 | Leupaxin | 0,639 |
| P45974 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 | 0,638 |
| Q9Y4L1 | Hypoxia up-regulated protein 1 | 0,635 |
| P49336 | Cell division protein kinase 8 | 0,634 |
| Q14139 | Ubiquitin conjugation factor E4 A | 0,633 |
| Q8N488 | RING1 and YY1-binding protein | 0,632 |
| Q8WXG6 | MAP kinase-activating death domain protein | 0,631 |
| P51812 | Ribosomal protein S6 kinase alpha-3 | 0,631 |
| Q02556 | Interferon regulatory factor 8 | 0,629 |
| P53367 | Arfaptin-1 | 0,629 |
| O43852 | Calumenin | 0,628 |
| Q9NRN7 | L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase | 0,627 |
| Q10570 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1 | 0,624 |
| P07355 | Annexin A2 | 0,623 |
| Q09666 | Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK | 0,622 |
| Q9HD45 | Transmembrane 9 superfamily member 3 | 0,621 |
| Q7LG56 | Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B | 0,620 |
| P08567 | Pleckstrin | 0,620 |
| P30520 | Adenylosuccinate synthetase isozyme 2 | 0,619 |
| P20674 | Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial | 0,618 |
| Q9NPB8 | Putative glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 | 0,616 |
| Q9UBE0 | SUMO-activating enzyme subunit 1 | 0,615 |
| Q9NTG7 | NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial | 0,614 |
| Q8NBX0 | Probable saccharopine dehydrogenase | 0,613 |
| Q13404 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 | 0,612 |
| Q9UBB5 | Methyl-CpG-binding domain protein 2 | 0,612 |
| O00505 | Importin subunit alpha-3 | 0,608 |
| Q8IX90 | Spindle and kinetochore-associated protein 3 | 0,606 |
| P37837 | Transaldolase | 0,606 |
| P08107 | Heat shock 70 kDa protein 1A/1B | 0,605 |
| P06400 | Retinoblastoma-associated protein | 0,605 |
| Q15058 | Kinesin-like protein KIF14 | 0,605 |
| Q8IY67 | Ribonucleoprotein PTB-binding 1 | 0,604 |
| P13804 | Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial | 0,603 |
| Q13188 | Serine/threonine-protein kinase 3 | 0,602 |
| Q9UI08 | Ena/VASP-like protein | 0,600 |
| O75477 | Erlin-1 | 0,600 |
| Q8IV63 | Serine/threonine-protein kinase VRK3 | 0,598 |
| Q14919 | Dr1-associated corepressor | 0,597 |
| Q15800 | C-4 methylsterol oxidase | 0,595 |
| Q9UBB4 | Ataxin-10 | 0,594 |
| P10620 | Microsomal glutathione S-transferase 1 | 0,590 |
| O95999 | B-cell lymphoma/leukemia 10 | 0,590 |
| Q7Z5K2 | Wings apart-like protein homolog | 0,581 |
| Q9UBT2 | SUMO-activating enzyme subunit 2 | 0,578 |
| Q8N2K0 | Monoacylglycerol lipase ABHD12 | 0,575 |

| | | |
|---------------|---|--------------|
| Q8TEM1 | Nuclear pore membrane glycoprotein 210 | 0,574 |
| Q07065 | Cytoskeleton-associated protein 4 | 0,572 |
| P19174 | 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-1 | 0,571 |
| P33992 | DNA replication licensing factor MCM5 | 0,568 |
| Q9H4L4 | Sentrin-specific protease 3 | 0,567 |
| P17535 | Transcription factor jun-D | 0,564 |
| O43379 | WD repeat-containing protein 62 | 0,563 |
| O43929 | Origin recognition complex subunit 4 | 0,562 |
| Q9NP72 | Ras-related protein Rab-18 | 0,561 |
| P10599 | Thioredoxin | 0,559 |
| P15090 | Fatty acid-binding protein, adipocyte | 0,556 |
| O15126 | Secretory carrier-associated membrane protein 1 | 0,554 |
| P08670 | Vimentin | 0,554 |
| Q9NRL2 | Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A | 0,547 |
| Q96RE7 | Nucleus accumbens-associated protein 1 | 0,545 |
| P08648 | Integrin alpha-5 | 0,543 |
| P18858 | DNA ligase 1 | 0,541 |
| P11310 | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial | 0,540 |
| Q9BZF1 | Oxysterol-binding protein-related protein 8 | 0,538 |
| Q96C90 | Protein phosphatase 1 regulatory subunit 14B | 0,538 |
| Q9UKT5 | F-box only protein 4 | 0,536 |
| P49821 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial | 0,535 |
| P20936 | Ras GTPase-activating protein 1 | 0,535 |
| Q8TBC4 | NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit | 0,533 |
| Q6YHU6 | Thyroid adenoma-associated protein | 0,532 |
| P29401 | Transketolase | 0,531 |
| Q6ZSZ5 | Rho guanine nucleotide exchange factor 18 | 0,530 |
| O75391 | Sperm-associated antigen 7 | 0,526 |
| Q2M2I8 | AP2-associated protein kinase 1 | 0,522 |
| Q9BTE3 | UPF0557 protein C10orf119 | 0,521 |
| Q13526 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 | 0,520 |
| Q9BXX1 | Krueppel-like factor 16 | 0,519 |
| Q96G25 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 | 0,519 |
| Q92673 | Sortilin-related receptor | 0,517 |
| Q8IXW5 | Putative RNA polymerase II subunit B1 CTD phosphatase RPAP2 | 0,517 |
| P11498 | Pyruvate carboxylase, mitochondrial | 0,516 |
| Q9UNP9 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E | 0,515 |
| Q9P013 | Protein CWC15 homolog | 0,515 |
| O95433 | Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1 | 0,513 |
| P22681 | E3 ubiquitin-protein ligase CBL | 0,511 |
| P48426 | Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 alpha | 0,505 |
| P09960 | Leukotriene A-4 hydrolase | 0,490 |
| P07858 | Cathepsin B | 0,489 |
| Q96FX7 | tRNA (adenine-N(1)-)-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A | 0,480 |
| Q9H074 | Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 | 0,472 |
| O75449 | Katanin p60 ATPase-containing subunit A1 | 0,472 |
| Q13085 | Acetyl-CoA carboxylase 1 | 0,460 |

| | | |
|---------------|--|--------------|
| Q9NVV4 | Poly(A) RNA polymerase, mitochondrial | 0,446 |
| Q8ND24 | RING finger protein 214 | 0,437 |
| Q9Y4K1 | Absent in melanoma 1 protein | 0,436 |
| Q15059 | Bromodomain-containing protein 3 | 0,430 |
| Q86VI3 | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3 | 0,417 |
| P31949 | Protein S100-A11 | 0,416 |
| Q6PD62 | RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog | 0,408 |
| Q6P1N0 | Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A | 0,396 |
| O00194 | Ras-related protein Rab-27B | 0,381 |
| O75223 | Gamma-glutamylcyclotransferase | 0,340 |
| Q8TF42 | Ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein B | 0,313 |

RESUMEN EN INGLÉS

ROLE OF ENDOGLIN ISOFORMS IN THE MYELOID LINEAGE

1. INTRODUCTION

Endoglin (also known as CD105) is a type I homodimeric transmembrane glycoprotein that can act as an auxiliary receptor for members of the TGF- β superfamily (Cheifetz et al., 1992; Bellon et al., 1993). Structurally, endoglin belongs to the zona pellucida (ZP) family of proteins that share a ZP domain of ~260 amino acid residues at their yxtamembrane extracellular region (Llorca et al., 2007). Endoglin also contains at its N-terminal extracellular region an Orphan domain (OD), comprising ~325 amino acids, whose sequence shows no homology to any other protein, but it was recently identified as the minimal active endoglin domain needed for partner recognition (Llorca et al., 2007; Castonguay et al., 2011; Alt et al., 2012).

Endoglin expression and function has been widely described in the context of endothelial cells and vascular physiology (Bernabeu et al., 2007; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010), playing a key role in many pathological processes, including Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT), cancer angiogenesis, preeclampsia or hypertension (Bernabeu et al., 2009; Shovlin, 2010; Kapur et al., 2012; Rana et al., 2012; Valbuena-Diez et al., 2012). In addition, increased levels of membrane and soluble forms of endoglin have been linked to inflammatory processes such as wound healing, atherosclerosis, psoriasis or rheumatoid arthritis (Rulo et al., 1995; Conley et al., 2000; Torsney et al., 2002; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

There are two different isoforms of endoglin that share an identical extracellular domain, but differ from each other in the length and composition of their cytoplasmic tail (Cheifetz et al., 1992; Bellon et al., 1993). The endoglin gene (*ENG*) is predominantly expressed as a long isoform (L-endoglin), but its pre-mRNA can be alternatively spliced by a mechanism of intron retention, yielding a less abundant form, known as short endoglin (S-endoglin). This intron retention is driven by the SRSF1 splicing factor, that physically competes with the minor spliceosome for the elimination of the last intron between exons #13 and #14 (Blanco and Bernabeu, 2012). When transcribed, the last intron of *ENG* bears an early stop codon that affects the open reading frame and truncates the mature protein at the cytoplasmic region (Blanco et al., 2008). So far, most studies published about endoglin have focused on L-endoglin. The expression of the short variant (S-endoglin) was first described in humans (Bellon et al., 1993) and later in mice (Perez-Gomez et al., 2005). The cytoplasmic region of human L-endoglin is composed by 47 amino acids with a high

content of serine and threonine residues susceptible to be phosphorylated (Lastres et al., 1994). Also, the sequence Ser-Met-Ala (SMA) in the C-terminal end of L-endoglin is a docking site for proteins with a PDZ domain and is involved in cytoskeleton organization (Koleva et al., 2006). By contrast, the sequence of the S-endoglin cytoplasmic tail is only 14 amino acids long, the last 7 residues being specific for this isoform. These structural differences may account for the distinct functional effects of L-endoglin and S-endoglin (Blanco et al., 2008; Velasco et al., 2008). Up to date the tridimensional structure of the cytoplasmic domain of both long and short isoforms of endoglin has not been solved.

Interestingly, a role for S-endoglin during endothelial senescence has been described (Blanco et al., 2008). Thus, the S-endoglin/L-endoglin ratio is increased during senescence of human endothelial cells *in vitro*, as well as during aging of mice in vascularized tissues. The switch between L-endoglin and S-endoglin affects the TGF- β -mediated cell signaling promoting the ALK5/Smad3 pathway instead of the ALK1/Smad1 route. This is due to the preferential affinity of the short cytoplasmic domain for ALK5 that promotes the expression of target genes such as *SERPINE-1* (PAI-1) and *PTGS2* (COX-2), and inhibits *NOS3* (eNOS). Furthermore, transgenic mice overexpressing S-endoglin showed hypertension, decreased hypertensive response to NO inhibition, decreased vasodilatory response to TGF- β 1 administration, and decreased endothelial nitric oxide synthase expression in lungs and kidneys, supporting the involvement of S-endoglin in the NO-dependent vascular homeostasis (Blanco et al., 2008). Taken together, these results suggest that S-endoglin is induced during endothelial senescence and may contribute to age-dependent vascular pathology.

During aging, immune and inflammatory responses are impaired in a general immunosenescence process where macrophage functions are compromised (Cassado Ados et al., 2011; Mahbub et al., 2012). Aged macrophages show reduced functional activity, leading to accumulation of unphagocytosed cellular debris, chronic inflammation and exacerbation of tissue damage and aging (Shaw et al., 2010; Li, 2013). Macrophages participate in the immune response according to a preferential M1 or M2 polarization, which is involved not only in the response to pathogens, tumor progression or angiogenesis, but also in tissue homeostasis, autoimmunity or fibrosis (Sunderkotter et al., 1994; Werner and Alzheimer, 2006; Benoit et al., 2008). Although many studies on endoglin have focused on endothelial cells, endoglin expression has been also detected in some myeloid precursors and macrophages. Thus, endoglin acts as a critical regulator of the hematopoietic development, in part by modulating the signaling involving members of the TGF- β superfamily (Borges et al., 2012). Later in development, endoglin is present at low levels on monocytes, but it is markedly

upregulated during the monocyte-macrophage transition (Lastres et al., 1992; O'Connell et al., 1992). Moreover, in the human monocytic line U937, ectopic expression of endoglin counteracts TGF- β 1-dependent cellular responses (Lastres et al., 1996). Overall, the role of endoglin in the myeloid lineage is poorly understood, especially regarding the individual function of each isoform.

Matrix metalloproteinases are a family of metalloproteases that contain a zinc atom at their active site and are able to degrade matrix macromolecules including collagen, laminin, and elastin (Shapiro, et al. 1992; Shapiro, et al. 1993). In addition to their ability to degrade extracellular matrix components, some MMPs also cleave cytokines and antiproteolytic molecules. Up to date the only described protease able to cut membrane endoglin and release the soluble form of the protein is the membrane MMP14 (Hawinkels, et al. 2010; Valbuena-Diez, et al. 2012). Human macrophage elastase (MMP12) was first identified as an elastolytic metalloproteinase secreted by inflammatory macrophages (Banda and Werb 1981). Like other MMPs, MMP12 is a zinc-dependent neutral endopeptidase; it is secreted as a 54-kDa proform protein that undergoes self-activation through autolytic processing to produce several active forms of the enzyme (Shapiro, et al. 1993). In addition to elastolytic activity, MMP12 has been shown to be capable of degrading a broad spectrum of extracellular matrix components, including type IV collagen, fibronectin, laminin, vitronectin, proteoglycans, chondroitin sulfate, and myelin basic protein (Gronski, et al. 1997). One apparently important function of catalytic MMP12 *in vivo* is its ability to activate other MMPs such as MMP2 and MMP3, by which MMP12 exacerbates the cascade of proteolytic processes (Matsumoto, et al. 1998). Moreover, the role of MMP12 as an anti-angiogenic factor has been described (Houghton, et al. 2006; Nocito, et al. 2008). Interestingly, MMP12 is considered as an M1 phenotype pro-inflammatory macrophage marker and its expression is induced by the cytokine GM-CSF (de las Casas-Engel, et al. 2013). Additionally, MMP12 is reported as a pro-inflammatory protease and in extension is a marker of M1 phenotype effectors (de las Casas-Engel, et al. 2013; Nenan, et al. 2005). The presence of this protease has been already reported in inflammation-associated pathologies like atherosclerosis, rheumatoid arthritis, systemic sclerosis and others like psoriasis or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (Chaudhuri, et al. 2012; Johnson, et al. 2011; Liu, et al. 2004; Suomela, et al. 2001). Because the exacerbated basal inflammatory response is associated with increased plasma levels of both soluble endoglin and MMP12 in those pathologies, it is likely that the macrophage metalloelastase (MMP12) is involved in the shedding of membrane endoglin in inflammatory associated processes.

2. AIMS

- Study the tridimensional structure at high resolution of the cytoplasmic region of the two existing endoglin isoforms (Long endoglin and Short endoglin).
- Analyze the role of both endoglin isoforms in the context of the myeloid lineage and their possible implication in macrophage senescence.
- Examine the relationship between the soluble endoglin release and the macrophage polarization into M1 or M2 phenotypes.

3. RESULTS

The results obtained by RMN analysis of the peptide corresponding to the cytoplasmic tail of the short isoform of endoglin showed that, due to its small size, the peptide does not have a defined secondary structure. The experimental approaches to solve the structure of the cytoplasmic domain of the long isoform by X-Ray crystallography have not been successful. The crystallization assays performed with the synthesized recombinant proteins (cytoplasmic domain of EngL and LIM domain) did not yield crystals for the subsequent structural analysis.

Because S-endoglin is a marker of endothelial senescence, we first assessed the expression of both endoglin isoforms in a senescence-like stage of monocytes/macrophages subjected to oxidative stress. First, macrophages were obtained from the peritoneal cavity of 2 months old mice. Most of these cells correspond to the myeloid lineage, mainly to tissue resident large peritoneal macrophages (LPM) (Cassado Ados et al., 2011). A large proportion of these LPMs were positive for the senescence-associated β -Galactosidase staining and there was a marked increase in the percentage of senescent macrophages after hydrogen peroxide (H_2O_2) treatment. In addition, increased levels of S-endoglin (a marker of cellular senescence), were observed upon oxidative stress, as evidenced by semiquantitative RT-PCR analysis of endoglin transcripts. Besides, oxidative stress-induced senescence in human activated monocytes from four different donors demonstrated a clear increase in the transcript levels of the senescence markers S-endoglin and PAI-1, whereas L-endoglin levels underwent a much lower increase. To assess the effect of *in vivo* aging, LPMs and recruited small peritoneal macrophages (SPM) were analyzed upon zymosan treatment. S-endoglin levels were clearly increased in both LPM and SPM at 6 and 12 months of age mice (up to 16-fold), relative to 2 months old animals. Moreover, the senescent marker Pai-1 showed a statistically significant increase in

LPM (12 m), whereas L-endoglin transcript levels were augmented in LPM (6 m and 12 m) and SPM (12 m), although at lower levels than S-endoglin. Of note, the upregulation of S-endoglin preceded that of Pai-1 in LPM and no significant changes of Pai-1 levels in infiltrating SPM during aging were observed. Taken together, these results suggest that S-endoglin is a marker of macrophage senescence that is upregulated during *in vitro* oxidative stress-induced senescence and *in vivo* aging.

To investigate the effect of both endoglin isoforms on protein expression, a proteomic analysis using SILAC technology was applied to quantify differences in protein expression level among U937 endoglin transfected cells. In this manner, we were able to identify and quantify a set of 890 differentially expressed proteins in the three subcellular fractions from endoglin transfectants. The Venn diagram representation showed a common effect of both endoglin isoforms in some of the regulated proteins, suggesting that this effect was mediated by their shared extracellular domain. In fact, the same regulatory effect was observed for 166 proteins (26 upregulated and 140 downregulated). By contrast, six proteins showed an opposite regulation between L-endoglin and S-endoglin transfectants (upregulated in L-endoglin and downregulated in S-endoglin cells). Of note, a large number of proteins (546) with an independent behaviour in either L-endoglin (106 upregulated and 143 downregulated) or S-endoglin (36 upregulated and 261 downregulated) transfectants were identified, suggesting that this effect depends on the endoglin cytoplasmic region.

To confirm the results from the SILAC analysis, we decided to validate some of the differentially expressed proteins. For this purpose, proteins like Smad3, Calmodulin or CD13 were analysed by western blot or flow cytometry techniques. Next, we investigated the possible biological functions affected by endoglin overexpression. The SILAC protein list was subjected to the Bio-informatic Ingenuity Pathways Analysis (IPA) using the Ingenuity Knowledge Base (Genes Only) as a reference set. To assess whether these cellular functions were indeed affected in endoglin transfectants, specific functional assays were carried out. Both endoglin transfectants showed an altered "cell trafficking" profile in the bioinformatic analysis, most likely due to the marked reduction of integrin levels, including those of $\beta 1$, $\alpha 5$ and $\beta 2$ subunits. Accordingly, cell adhesion assays clearly demonstrated an impaired binding of both endoglin transfectants to fibronectin compared to mock controls. The IPA results also yielded that "cell cycle" was one of the compromised biological functions, although the statistical significance was much higher in S-endoglin (lowest p value, 4.76×10^{-6}) than L-endoglin (lowest p-value, 3.99×10^{-4}) transfectants. Indeed, the growth rate is significantly slower in S-endoglin transfectants compared to mock controls or L-endoglin transfectants. According to the IPA analysis, cell death and survival are affected in both endoglin transfectants, although in opposite ways regarding

apoptosis. To test this hypothesis, the GM-CSF-induced pro-apoptotic effect in U937 cells (Okuma et al., 2000) was assessed. S-endoglin transfectants showed a decreased survival rate in response to three different doses of the pro-apoptotic cytokine, whereas L-endoglin transfectants showed a slightly higher, but not significant, survival rate than control cells.

The SILAC analysis also suggested that the metabolism of reactive oxygen species (ROS) was affected in both endoglin transfectants. Thus, redox homeostasis maintaining protein AIFM1 and antioxidant protein PRDX6 are down-expressed, while the NADPH oxidase CYBB is upregulated in endoglin transfectants. Based on these data, it can be postulated that L-endoglin and S-endoglin transfectants might display an enhanced production of ROS levels. However, this production might be compensated in L-endoglin, but not in S-endoglin transfectants due to an increased protein levels of superoxide dismutase 2 (SOD2), which may contribute to free radical scavenging. This interpretation is compatible with the actual measurement of ROS production in U937 cells, showing that S-endoglin expressing cells display levels of ROS higher than those of L-endoglin or mock transfectants.

It is well known that aging impairs macrophage polarization into M1 and M2 subtypes (Mahbub et al., 2012). Because S-endoglin is upregulated upon macrophage senescence *in vitro* and during *in vivo* aging, we assessed the role of both endoglin isoforms in the phorbol myristate acetate (PMA)-induced macrophage differentiation of U937 cells (Cabanas et al., 1990). Thus, PMA-treated L-endoglin, S-endoglin and mock U937 transfectants were analyzed by quantitative PCR to assess the transcript levels of different M1 and M2 marker genes. The expression of classical M1 genes like *IL-6*, *IL23A* or *IL12A* was higher in mock and L-endoglin transfectants than in S-endoglin-transfected cells. By contrast, typical M2 genes like *MAFB*, *STAB1* or *SERPINB2* were more highly expressed in S-endoglin transfectants than in mock transfected or L-endoglin transfectants. Thus, at the transcriptomic level, the presence of S-endoglin skews myeloid cell polarization towards M2, whereas the expression of L-endoglin does not have an overt influence of the expression of polarization markers, further emphasizing the different signalling capabilities of both endoglin isoforms.

The PMA-dependent differentiation of U937 cells constitutes a well-established model for macrophage differentiation (Cabanas et al., 1990). Therefore, we decided to assess the potential influence of both endoglin isoforms on the functional polarization of myeloid cells using this experimental system. To that end, the responsiveness of endoglin transfectants to LPS, that favours the acquisition of an M1 phenotype, was evaluated. Analysis of the secreted cytokine profile showed the release of pro-inflammatory cytokines to the supernatant in mock, L-endoglin and S-endoglin populations. Overall, endoglin transfectants displayed lower levels of LPS-induced pro-

inflammatory cytokines than mock controls. However, S-endoglin transfectants showed the lowest inflammatory profile among the three cell types, in agreement with their M2-like phenotype. Next, we investigated the underlying molecular basis for the endoglin role in macrophage polarization. It is noteworthy that activin-A is a key regulator of macrophage polarization that promotes a pro-inflammatory phenotype and inhibits the acquisition of an anti-inflammatory status (Sierra-Filardi et al., 2011). Because gene expression experiments showed an altered regulation of activin-A in endoglin transfectants, we assessed the possible deregulated protein expression of this cytokine in U937 transfectants. The secretion of activin-A was markedly increased (more than two-fold) in L-endoglin transfectants compared to mock controls. By contrast, activin-A levels in culture supernatants of S-endoglin transfectants were clearly reduced relative to controls. Taken together, the polarization studies suggest that in monocytic cells L-endoglin promotes an M1-like phenotype, whereas S-endoglin favours the expression of M2 markers and functions.

We also analyzed the pattern of soluble endoglin release during M1-M2 macrophage polarization. Human monocytes obtained from healthy donors and polarized *in vitro* showed different endoglin levels in their culture supernatants at the final stage of differentiation. GM-CSF-polarized M1 macrophages presented levels of soluble endoglin up to 200 pg/mL, whereas M-CSF-polarized M2 macrophages did not show detectable levels of soluble endoglin. These differences between phenotypes regarding soluble endoglin did not reflect parallel differences in the transcript levels or protein expression levels of endoglin. Actually, there was a slight lower level of surface endoglin in M1 polarized macrophages *versus* M2 macrophages. This result is in agreement with an active release of soluble endoglin in the M1 population. Therefore, there might be a post-translational mechanism underlying the significant higher levels of the soluble form of endoglin in M1 macrophages. Surprisingly, no differences in the expression pattern of the only described metalloprotease (MMP14) capable of shedding membrane endoglin were observed. In contrast, a marked differential level of the macrophage metalloelastase MMP12 was detected, being clearly upregulated in the pro-inflammatory M1 macrophages. The MMP12 induction in cultured monocytes was directly related to the GM-CSF treatment used (0 and 48 hours) for the M1 polarization.

The "cell free" *in vitro* assay measuring the activity of recombinant MMP12 showed high peptidase activity against a fluorogenic specific peptide. The MMP12 specific inhibitor MMP408 displayed high efficiency with a decrease of almost 80% of the activity. It is also remarkable the significant inhibition obtained in the presence of endoglin specific peptides P583 and P452 (both of them contain the consensus GL target motif for MMPs), which had shown a similar inhibitory effect against MMP14.

Those data suggest that the cutting points for MMP12 could be the same as the ones described for MMP14. In addition, the MMP408 compound seems to be a good specific inhibitor for MMP12.

A significant increase in the level of soluble endoglin was observed when COS7 cells were transfected with endoglin and MMP12 expression vectors. The background of untreated COS7 cells does not include membrane endoglin, nor MMP12 or MMP14. Therefore, we confirmed the ability of MMP12 as an endoglin cutting protease, making stronger the relationship of both proteins as M1 phenotype markers. Supporting this hypothesis we were able to counteract the increase of soluble endoglin in M1-GM-CSF polarization just by adding the MMP408 inhibitor during GM-CSF differentiation.

The incubation of primary cultures from human endothelial cells (HUVECS) with the conditioned media of M1-M2 macrophages showed an increase of soluble endoglin levels in the resultant supernatant. Parallel experiments showed that the inhibitor MMP408 decreased the release of soluble endoglin in HUVECS cultured with the M1 conditioned media, similarly as we observed in macrophage cultures. The MMP12 activity in endothelial cells is an important issue due to the exponential increase of the membrane endoglin susceptible to be released in an inflammatory context. Finally, using an *in vivo* model, the injection of LPS in mice resulted in a significant increase of soluble endoglin levels in plasma after 48 hours of incubation. As controls, the gavage of the MMP408 or vehicle and the injection of PBS instead of LPS had no effect on the basal or induced levels of soluble endoglin. Moreover, the LPS-induced soluble endoglin levels were markedly decreased upon treatment with the MMP12 inhibitor (MMP408). Thus, the effect of the inhibitor in both macrophage and endothelial *in vitro* models can be reproduced in an *in vivo* inflammatory scenario.

4. CONCLUSIONS

- The cytoplasmic domain of the short isoform of endoglin does not have a defined secondary structure, as shown by the RMN analysis. Due to the methodological difficulties in the resolution of the cytoplasmic domain of the long isoform by X-Ray Crystallography, further studies are necessary using RMN with a previous isotopic labeling to increase the sensitivity and complete the comparative structural study of both endoglin isoforms.
- We have established the short isoform of endoglin (EngS) as a potential marker of senescence in the myeloid lineage. The disequilibrium between the EngL/EngS ratio, which is closely related to aging, can potentiate the inefficient innate immune response in the elderly.
- The proteomic analysis using SILAC has demonstrated that both endoglin isoforms modulate key biological processes in myeloid cells, such as the adhesion, proliferation, survival or ROS accumulation. In addition, EngS seems to promote an elderly-related phenotype in the previously mentioned processes.
- The over-expression of the short isoform of endoglin, favors the polarization of the macrophages into an anti-inflammatory phenotype (M2). The observed switch of expression from EngL to EngS can be included in the immunosenescence process.
- Membrane endoglin is a substrate for the macrophage elastase MMP12, a protein associated to a pro-inflammatory M1 response. The consequence of the interaction between endoglin and MMP12 is the release of the soluble form of endoglin.
- Soluble endoglin and MMP12 are both M1 polarization markers. Also, their close functional behavior indicates an additive effect of both soluble factors in pathologies associated with an inflammatory process.

