

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

LOS COMPLEJOS TRIPTASA•HEPARINA DE LOS MASTOCITOS HUMANOS Y
DE RATÓN IMPIDEN LA GENERACIÓN DE FIBRINA Y LA COAGULACIÓN
DEL PLASMA INDUCIDA POR LA TROMBINA MEDIANTE LA DESTRUCCIÓN
PROTEOLÍTICA DEL FIBRINÓGENO

Presentada por:

Alicia Prieto García

Co-dirigida por:

Richard L. Stevens

José Manuel Zubeldia Ortuño

Madrid, 2013

**LOS COMPLEJOS TRIPTASA•HEPARINA DE LOS MASTOCITOS
HUMANOS Y DE RATÓN IMPIDEN LA GENERACIÓN DE FIBRINA Y LA
COAGULACIÓN DEL PLASMA INDUCIDA POR LA TROMBINA
MEDIANTE LA DESTRUCCIÓN PROTEOLÍTICA DEL FIBRINÓGENO**

Tesis Doctoral realizada por D^a Alicia Prieto García para optar al Grado de Doctor en
Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid

Co-Directores:

Professor Richard L. Stevens, Ph.D.

Associate Professor, Department of Medicine

Harvard Medical School

Boston, MA, USA

Profesor José Manuel Zubeldia Ortuño, M.D., Ph.D.

Profesor Asociado, Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

A mis padres, en reconocimiento y agradecimiento por todo lo que me han dado.

A Jose y a mis hijas Ana y Marta, por su cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

To Richard L. Stevens, promoter and director of this project. He transmitted his enthusiasm for research to me, since “every single advance translates into a benefit for thousands of human beings”. I wish to thank him for his constant support, no matter the distance, and great generosity.

A Mariana Castells, admirable profesional e investigadora, por darme la oportunidad de tan inolvidable experiencia profesional y personal durante mi estancia en Boston. De ella he aprendido que uno puede conseguir todo lo que se proponga con esfuerzo, decisión y buen hacer.

A José Manuel Zubeldia Ortuño, co-director de este trabajo, quien me ha enseñado desde mis inicios en la Medicina, por su constante ayuda, sabios consejos y amable disponibilidad siempre que hace falta.

To Dominick Zheng, Roberto Adachi, Wei Xing, William S. Lane, Kyungmee Chung, Paul Anderson, Philip M. Hansbro for their contributions, that made this work possible.

A María Rubio Sotés, por su apoyo que hizo posible mi año de investigación en Boston y por tantos años de enseñanza.

To Dr. Albert Sheffer, outstanding physician and better human being. He is one of those unique persons that make life nicer.

To my bench colleagues in Boston, Shirley, Toko, Mathew and Mark: they patiently dedicated their time to teach me all the lab techniques I learnt; to all the staff

in the Rheumatology, Immunology and Allergy Division at the Brigham and Women's Hospital for their friendship, advice and support during my fellowship at BWH.

A Mentxu, Tito y María por su ayuda y tantos buenos ratos entre geles e incubaciones.

A mis compañeros del Servicio de Alergia del Hospital Gregorio Marañón, Maria Luisa, Manolo, Teresa, Pilar, Roberto, Alberto, Fran, Maribel, Lydia, Elena, Victoria y Sonsoles y a todos los residentes actuales y antiguos, con los que es un honor trabajar, aprender y compartir experiencias y momentos a lo largo de los años.

BECAS

This work was funded in part by NIH grants (AI065858 and AI059746), and by a research fellowship grant from the Harvard Club of Australia Foundation.

Quiero agradecer la ayuda recibida para mi estancia en el Hospital Brigham and Women de Boston (EEUU) mediante una Beca de Ampliación de Estudios del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, nº de expediente BA09/90074 (2 de julio de 2009), con una duración de 12 meses.

“Cuando no daba los resultados que presumía, pensaba haber cometido algún error. Pero cuando, una vez tras otra, a pesar de las comprobaciones adecuadas, obtuve estos curiosos resultados, tuve que admitir que estaba en presencia de algo completamente nuevo”.



Charles Robert Richet 1901

Descubridor de la anafilaxia

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCIÓN

1. Biología del mastocito. Componentes de sus gránulos secretores
2. Triptasas de los mastocitos. Características y genes que las codifican
 - 2.1. Triptasas de los mastocitos humanos
 - 2.2. Triptasas de los mastocitos de ratón
3. Proteoglicanos asociados a las proteasas de los gránulos de los mastocitos
4. Análisis estructural, bioactividad y preferencias de sustrato de las triptasas de los mastocitos
5. Papel de las triptasas en la inflamación y en las infecciones bacterianas
6. Papel de las triptasas en la anafilaxia
7. Papel de los complejos triptasa•proteoglicanos en la coagulación
 - 7.1. Estructura del fibrinógeno y mecanismo de formación de redes de fibrina dependiente de la acción de la trombina
 - 7.2. Mecanismo anticoagulante de la heparina
 - 7.3. Acción anticoagulante de los complejos triptasa•proteoglicano

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Materiales y reactivos
2. Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno humano por el complejo triptasa humana- β •heparina. Análisis mediante SDS-PAGE e Inmunoblot en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas presentes en el suero.
3. Identificación del sitio de ruptura preferente de la cadena α del fibrinógeno humano susceptible a los complejos triptasa humana- β •heparina, mediante espectrometría de masas en tándem y análisis de la secuencia C-terminal.
4. Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno de ratón por los complejos triptasa humana- β • y mMCP-6•heparina.
5. Actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina *in vitro*.
6. Reacción de anafilaxia cutánea pasiva en ratones mMCP-6+/mMCP-7- y ratones mMCP-6-/mMCP-7- B6 y estudio inmunohistoquímico de la formación de depósitos tisulares de fibrina.

RESULTADOS

1. Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno humano por los complejos triptasa humana- β •heparina. Análisis mediante SDS-PAGE e Inmunoblot en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas presentes en el suero.

2. Identificación del sitio de ruptura preferente de la cadena α del fibrinógeno humano susceptible a los complejos triptasa humana- β •heparina, mediante espectrometría de masas en tándem y análisis de la secuencia C-terminal.
3. Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno de ratón por los complejos triptasa humana- β • y mMCP-6•heparina.
4. Actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina *in vitro*.
5. Actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6•heparina *in vivo*: formación de depósitos tisulares de fibrina en la reacción de ACP en ratones B6.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES E INVESTIGACIONES FUTURAS

CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

RESUMEN DE TABLAS Y FIGURAS

REFERENCIAS

PUBLICACIONES Y OTRA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADAS



ABREVIATURAS



Ag: antígeno, antigen.

AA: aminoácido, aminoacid.

ACP/PCA: anafilaxia cutánea pasiva, passive cutaneous anaphylaxis.

B6 / C57BL/6: raza innata de ratón negro de laboratorio, inbred strain of laboratory black mice.

DNP: 2,4-dinitrofenol, 2,4-dinitrophenol.

EK: enteroquinasa, enterokinase.

FGA: fibrinógeno humano isoforma A, human fibrinogen isoform A.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, high performance liquid chromatography.

h-Tryptase: triptasa humana, human tryptase.

IL: interleuquina, interleukin.

Ig: inmunoglobulina, immunoglobulin.

Kda: kilodalton

mARN: ácido ribonucleico mensajero.

MS/MS: espectrometría de masas en tandem, tandem mass spectrometry.

MC: mastocito o célula cebada, mast cell.

mBMMC: mastocito de médula ósea de ratón, mouse bone marrow-derived mast cell.

mMCP: proteasa de mastocito de ratón, mouse mast cell protease.

6+/7+: mMCP-6+/mMCP-7+

PBS: tampón fosfato salino, phosphate buffered saline.

pNA: para-nitroanilida.

Prss: miembro de serín proteasas, protease serine member.

PVDF: polifluoruro de vinilideno, polyvinylidene fluoride.

SGPG: proteoglicano serina-glicina, serglycin proteoglycan.

TBST: tampón tris-salino suplementado con tween-20, tris-buffered saline and Tween 20.



RESUMEN



Los mastocitos son células del sistema inmune con una propiedad característica: la presencia en su citoplasma de un gran número de gránulos secretores electrodensos, que contienen mediadores preformados como la histamina y diversas peptidasas. Estas últimas se dividen funcionalmente en endopeptidasas (quimasas y triptasas) y exopeptidasas (principalmente carboxipeptidasa A3 y dipeptidilpeptidasa I), siendo las triptasas el componente mayoritario, en las que se centra la atención de este trabajo.

Los mastocitos son principalmente conocidos como las células efectoras de las reacciones alérgicas mediadas por la IgE y de la anafilaxia, a través de la liberación de multitud de mediadores pro-inflamatorios. Sin embargo, su persistencia a lo largo de más de 500 millones de años en la evolución, sugiere un papel crítico de estas células en la supervivencia. Así se ha demostrado su papel beneficioso en la defensa frente a bacterias, virus y parásitos. Además juegan un papel fundamental en la inmunidad innata, en la inmunidad adquirida y en la inflamación.

Las triptasas se utilizan clínica y experimentalmente como biomarcadores de anafilaxia, ya que son altamente específicas de mastocitos y basófilos y son liberadas en respuesta a estímulos activadores de estas células. Pero su función y su mecanismo de acción a nivel molecular no se conocen, debido a que no se ha identificado ninguna proteína que sea diana preferente de estas proteasas en humanos.

Los genes de humanos y ratones *TPSAB1* y *TPSB2* codifican las triptasas. En los ratones, estos genes codifican las proteasas de mastocitos de ratón mMCP -6 y mMCP-7. Los correspondientes genes humanos codifican una familia de proteasas de tipo serina, enzimáticamente activas, que colectivamente se denominan triptasa humana- β y que se encuentran elevadas en sangre periférica durante la anafilaxia y las reacciones de hipersensibilidad. La triptasa de tipo α , sin actividad enzimática, se almacena también

en los gránulos secretores y se libera de forma constitutiva en sangre periférica, reflejando la carga mastocitoria corporal. Su aumento es diagnóstico de mastocitosis sistémica, enfermedad rara en la que se produce una hiperplasia y un acúmulo anormal de mastocitos en diversos tejidos.

Las triptasas se encuentran almacenadas en los gránulos secretores de los mastocitos formando tetrámeros unidos iónicamente a proteoglicanos serina-glicina que contienen heparina. El sitio activo de cada monómero mira al interior, hacia el poro central de la estructura en forma de rosco, explicando así en términos estructurales por qué pocas proteínas son accesibles a la triptasa. La presencia de los proteoglicanos asociados da estabilidad a esta estructura y ayuda a restringir sus especificidades de sustrato. Esta estructura espacial también las hace inaccesibles a los inhibidores de proteasas presentes en la sangre, de manera que no se ha identificado ningún inhibidor de proteasas capaz de inactivarlas.

La capacidad para formar fibrina cuando la piel o una superficie mucosa se dañan, es esencial para evitar la pérdida de sangre y la entrada de patógenos en el organismo. Sin embargo, la formación de depósitos de fibrina y de coágulos de fibrina y plaquetas intravasculares y en los tejidos, puede tener consecuencias fatales. El fibrinógeno es un componente principal del fluido del edema que se acumula en los tejidos cuando los mastocitos degranulan. Sin embargo, en estos tejidos con edema no se observan depósitos de fibrina. Los mastocitos de la piel de ratones y humanos tienen en sus gránulos proteoglicanos serina-glicina que contienen cadenas de heparina. Por eso, se ha propuesto que el factor anticoagulante relevante liberado de los mastocitos activados es la heparina, que impediría la formación de fibrina evitando la generación de trombina

dependiente del Factor Xa, así como potenciando la inactivación de la trombina dependiente de la serpina C1.

Previamente se ha demostrado que la cadena α del fibrinógeno es un sustrato preferencial de la triptasa de ratón mMCP-7 *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo se muestra que el fibrinógeno humano y de ratón son también altamente susceptibles a ser degradados por los complejos recombinantes triptasa humana- β y mMCP-6•heparina, así como por los complejos naturales mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina, y que estos complejos rompen de forma preferente la proteína en la localización Lys575 del extremo C-terminal de la cadena α . Se muestra también el efecto anticoagulante *in vitro* de los complejos triptasa•heparina sobre muestras de plasma humano, prolongando el tiempo de coagulación dependiente de la trombina. Esta acción anticoagulante es muy superior a la mostrada por la heparina por sí sola. Como los mastocitos de la piel de los ratones acumulan cantidades importantes de complejos mMCP-6•heparina en sus gránulos secretorios, se indujo una reacción de anafilaxia cutánea pasiva (ACP) en la piel de ratones mMCP-6+/mMCP-7- C57BL/6 y de ratones manipulados genéticamente que no expresan triptasas mMCP-6-/mMCP-7- C57BL/6. De acuerdo con los datos previos obtenidos *in vitro*, se encontró un aumento marcado en los depósitos de fibrina en la piel de los ratones que no expresan triptasa mMCP-6, 1 y 6 horas después de administrar el antígeno relevante a los ratones previamente sensibilizados.

La triptasa mMCP-6 tiene por tanto un papel fundamental en prevenir la acumulación de depósitos de fibrina en los tejidos, cuando los mastocitos de la piel de los ratones B6 degranulan en la reacción de ACP. El hecho de que las cadenas α del fibrinógeno de ratón y del fibrinógeno humano se rompan de forma similar por los complejos recombinantes triptasa humana- β •heparina a pH neutro, sugiere que los datos

obtenidos *in vivo* en los ratones, reflejan lo que ocurre en humanos en los tejidos con edema tras la activación mastocitaria. El hallazgo de que la triptasa humana y de ratón destruyen el fibrinógeno antes de que esta proteína circulante pueda ser convertida en fibrina por acción de la trombina, cambia el paradigma de cómo los mastocitos impiden la coagulación y la formación de depósitos de fibrina en los tejidos.

Dadas las consecuencia adversas que tendría el depósito de fibrina en los tejidos, estos datos explican por qué los ratones y los humanos carecen de un inhibidor de proteasa circulante que inactive rápidamente las triptasas de los mastocitos, por qué los mamíferos poseen dos genes que codifican estas proteasas capaces de degradar el fibrinógeno y por qué no se ha identificado ningún humano carente de triptasa- β .



SUMMARY



Mast cells (MCs) are immune system cells with a characteristic morphologic feature: the presence in their cytoplasm of numerous electron-dense secretory granules, which contains inflammatory mediators as histamine and peptidases. These peptidases are divided functionally into endopeptidases (chymases and tryptases) and exopeptidases (mainly carboxypeptidase A3 and dipeptidylpeptidase I). The present study is focused on tryptases, the main component of MCs secretory granules.

MCs are mainly known as the effector cells in IgE-mediated allergic reactions and anaphylaxis, releasing multiple pro-inflammatory mediators. However, their persistence along more than 500 million years in evolution, suggests critical roles for these cells in our survival. Thus, it has been shown their beneficial function in host defense against bacteria, virus and parasites. They also play critical roles in innate immunity, acquired immunity and inflammation.

Tryptases are clinically and experimentally used as biomarkers of anaphylaxis, because they are highly specific of MCs and basophiles and they are released in response to activator stimuli of these cells. But their function and mechanisms of action at the molecular level remains largely unknown, due to the fact that no protein has been identified in humans as a preferred target of these proteases *in vivo*.

The mouse and human *TPSB2* and *TPSAB1* genes encode tryptases. In mice, these genes encode mouse MC protease (mMCP) -6 and mMCP-7. The corresponding human genes encode a family of serine proteases that collectively are called human tryptase- β . Alpha trypase has no enzymatic activity and is also stored on granules and is released constitutively, indicating the body mast cell mass. Alpha tryptase is elevated in systemic mastocytosis, a rare disease associated with mast cell proliferation due to c-kit D816V mutation. Tetramer-forming tryptases are stored in the secretory granules of

MCs ionically bound to heparin-containing serglycin proteoglycans. The active site of each monomer face inward toward the central pore in the donut shaped structure, thereby explaining in structural terms why few proteins are susceptible to tryptases. The presence of associated proteoglycans stabilizes this structure and helps to limit their substrate specificities. This spatial structure also makes them inaccessible to protease inhibitors present in blood, and no protease inhibitor able to inactivate them has been identified.

The ability to form fibrin when the skin or a mucosal surface is wounded is essential for preventing blood loss and the entry of pathogens into our body. Nevertheless, the formation of intravascular or tissue fibrin deposits and fibrin•platelet clots can have life-threatening consequences. Fibrinogen is a major constituent of the edema fluid that accumulates in tissues when MCs degranulate. But fibrin deposits are rarely seen in the edema sites that form when cutaneous MCs degranulate. The MCs in human and mouse skin have serglycin proteoglycans that contain heparin chains. It therefore has been proposed that the relevant anticoagulant factor released from activated MCs is heparin, which hinders the formation of fibrin by preventing the Factor Xa-dependent generation of thrombin and then by catalyzing the serpin C1-dependent inactivation of any thrombin that is able to accumulate in the edema site.

It was previously shown that the α chain of fibrinogen is a preferred substrate of mMCP-7 *in vitro* and *in vivo*. In this study, it is shown that mouse and human fibrinogen also are highly susceptible to degradation by recombinant human tryptase- β • and mMCP-6•heparin complexes, as well as by natural occurring mMCP-6•SGPG complexes and that Lys575 is a preferred cleavage site in the C-terminus of the protein's α chain. It is also shown the anticoagulant action of tryptase•heparin

complexes *in vitro* on human plasma samples, prolonging the thrombin-dependent clotting-time in these samples compared to basal plasma. This anticoagulant effect is shown to be more potent than that of heparin alone. Because cutaneous mouse MCs store substantial amounts of mMCP-6•heparin complexes in their secretory granules, the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction was induced in the skin of mMCP-6+/mMCP-7- and mMCP-6-/mMCP-7- C57BL/6 mice. In support of the *in vitro* data, fibrin deposits were markedly increased in the skin of the double-deficient mice, 1 and 6 hours after IgE-sensitized animals were given the relevant antigen.

Thus, mMCP-6 has a prominent role in preventing the internal accumulation of fibrin deposits when MCs in the skin of the B6 mouse degranulate in the PCA reaction. The findings that α chains of mouse and human fibrinogen are similarly cleaved by recombinant human tryptase- β 1• heparin complexes at neutral pH, suggest that the *in vivo* mouse data are relevant to what occurs in the edema sites of humans when their tissue MCs degranulate. The discovery that mouse and human tetramer-forming tryptases destroy fibrinogen before this circulating protein can be converted to fibrin changes the paradigm of how MCs hinder fibrin deposition and blood coagulation internally. Because of the adverse consequences of fibrin deposits in tissues, our data explain why mice and humans lack a circulating protease inhibitor that rapidly inactivates MC tryptases, why mammals have two genes that encode tetramer-forming serine proteases that preferentially degrade fibrinogen and why no hTryptase- β -null human has been identified.



INTRODUCCIÓN



1. *Biología del mastocito. Componentes de sus gránulos secretores—*

Los mastocitos fueron descritos por primera vez en 1878 por Paul Ehrlich, en su tesis doctoral (1), como una nueva clase de células a las que denominó “Mastzellen” (células cebadas) por una propiedad característica: la presencia en su citoplasma de un gran número de gránulos secretores electrodensos, que contienen proteoglicanos, lo que les confiere su avidez por tinciones catiónicas como el azul de toluidina (Fig.1).

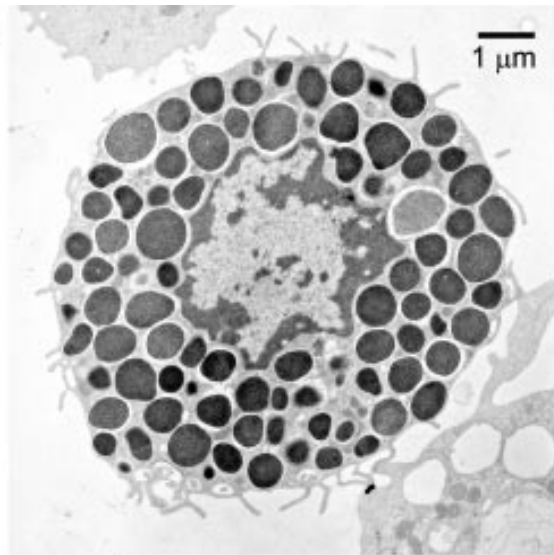


Figura 1. Mastocitos peritoneales de ratón con abundantes gránulos electrodensos en su citoplasma visualizados mediante microscopía de transmisión de electrones. Takurdas *et al* (2).

Los mastocitos derivan de células hematopoyéticas pluripotenciales de la médula ósea y pasan a la circulación en una forma inmadura. Cuando alcanzan los tejidos (tejido conectivo y mucosas) se produce su maduración, adquiriendo características específicas de cada tejido (3). Están presentes en la piel y en la mucosa de los pulmones, tracto digestivo, boca, nariz y ojos (4).

Los mastocitos son principalmente conocidos como las células efectoras de las reacciones alérgicas mediadas por la IgE y de la anafilaxia, a través de la liberación de multitud de mediadores pro-inflamatorios: mediadores preformados almacenados en sus gránulos (histamina, proteasas), sintetizados *de novo* (mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico) y múltiples citoquinas que se generan y se liberan horas después.

Sin embargo, la persistencia de los mastocitos a lo largo de más de 500 millones de años en la evolución, sugiere un papel crítico de estas células en la supervivencia. Así, se ha demostrado su papel beneficioso en la defensa frente a bacterias, virus y parásitos (2, 5).

Almacenadas en abundancia en sus gránulos secretores se encuentran las peptidasas de los mastocitos, unidas a proteoglicanos serina-glicina. Estas proteasas se utilizan clínica y experimentalmente como biomarcadores de anafilaxia, ya que son altamente específicas de mastocitos y basófilos y son liberadas en respuesta a estímulos activadores de estas células. Pueden detectarse en algunos casos mediante ELISA y pueden tener cinéticas de aparición/desaparición en el torrente circulatorio que ofrecen una ventana de detección más amplia que la que proporcionan otros productos liberados más lábiles, como la histamina o los metabolitos del ácido araquidónico. Las principales proteasas de los gránulos de mastocitos y basófilos se dividen funcionalmente en endopeptidasas (quimasas y triptasas) y exopeptidasas (principalmente carboxipeptidasa A3 y dipeptidilpeptidasa I) (6-8), siendo las triptasas el componente mayoritario de los gránulos, en las que se centra la atención del presente trabajo.

2. *Triptasas de los mastocitos. Características y genes que las codifican*—

2.1. *Triptasas de los mastocitos humanos*—

La presencia de triptasas en los mastocitos humanos se sospechó hace más de 50 años, en base a la actividad enzimática detectada en estudios histoquímicos de tejidos ricos en mastocitos (9). Al principio de los años 80, la triptasa de mastocitos humanos fue extraída, purificada y caracterizada como una enzima mastocitaria secretable (10-12). La triptasa purificada de mastocitos o tejidos humanos es una mezcla de triptasas de tipo β , producto de dos genes *TPSAB1* y *TPSB2* que residen en el cromosoma 16p13.3.

Los cADN iniciales derivados de los genes humanos *TPSAB1* y *TPSB2* aislados por Vanderslice, Miller y sus colaboradores (13, 14), codificaban enzimas que fueron designadas como triptasa humana- β 1 y - β 2, respectivamente. Estas proteasas tenían las mismas especificidades de sustrato (15-17) y secuencias de aminoácidos a excepción del residuo 132 (15, 16). El cromosoma 16p13.3 es un “punto caliente” de recombinación (18) y se han identificado en los últimos años numerosas mutaciones puntuales en los genes humanos *TPSAB1* y *TPSB2*. A esto se añade una variabilidad adicional, de potencial significado funcional, por ensamblaje alternativo del mRNA y por el procesamiento post-translacional de estas proteínas, especialmente por N-glicosilación, que pueden variar entre tejidos e individuos (19). Todo esto resulta en la expresión de más de 25 isoformas diferentes de esta enzima tetramérica de los mastocitos (20). Debido a que el significado funcional de estas isoformas alélicas no se conoce, los investigadores generalmente se refieren a los productos enzimáticamente activos de los genes humanos *TPSAB1* y *TPSB2* de forma colectiva como triptasa humana- β (10).

La triptasa- α , que recibió este nombre por ser traducida a partir del primer mRNA de triptasa humana secuenciado, es anómala, ya que posee una mutación en el pro-enzima que impide su activación proteolítica (14) y una mutación en el dominio catalítico que disminuye de forma importante su actividad enzimática (16, 21, 22). La triptasa- α , es secretada de forma constitutiva por los mastocitos humanos, en lugar de almacenarse en sus gránulos secretorios (23). La triptasa- α , no existe en roedores ni en primates. Aunque originariamente se asumió que las triptasas- α y β son producto de locus separados, esto es correcto sólo en parte, ya que el alelo α , se encuentra en un sitio que también acepta alelos $\beta 1$ funcionales (24, 25). Por este motivo, muchos humanos que heredan 2 alelos $\beta 1$, carecen por completo de triptasa- α (26, 27). Un individuo puede heredar entre 2 y 4 genes activos de triptasas β . Los 2 locus en los que se encuentran los alelos beta (*TPSAB1* y *TPSB2*) están separados sólo unas pocas kilobases. Los alelos deficientes (como alfa) están siempre emparejados en el mismo cromosoma con un alelo que codifica una triptasa activa $\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$ (27). De esta manera, el individuo está protegido de una deficiencia completa de triptasa catalíticamente activa, lo que sugiere que estas triptasas activas juegan un papel crítico en los humanos, presumiblemente en sus funciones de defensa. Sin embargo, si la herencia de 2 triptasas activas es el mínimo para mantener un equilibrio funcional, posiblemente la herencia de 4 triptasas activas sea excesiva, produciendo un coste como el aumento de reacciones alérgicas u otras reacciones inflamatorias, incluido la anafilaxia. Así, la mayoría de los individuos de las poblaciones estudiadas heredan 3 triptasas activas, no 2 ni 4, lo que sugiere que puede suponer el equilibrio óptimo (6).

Además de *TPSAB1* y *TPSB2*, existen otros dos locus de triptasas de mastocitos en humanos: *TPSG1* y *TPSD1*, que codifican las triptasas gamma (γ) y delta (δ),

respectivamente. Las triptasas humanas- γ son peptidasas transmembrana, como su equivalente murino (25). Son catalíticamente activas, con preferencias en cuanto a substratos diferentes de las triptasas- β (28, 29). Su función se desconoce. Por otra parte, en humanos la expresión de triptasas- δ es muy limitada y el dominio catalítico está muy alterado, con mínima actividad catalítica (30).

En resumen, las triptasas de los mastocitos humanos son producto de cuatro locus y existen en forma soluble (triptasas- α , β y δ) o anclada a la membrana (triptasa- γ). De las formas solubles, sólo las triptasas - β tienen las propiedades de tener actividad catalítica, almacenarse en concentraciones altas en los gránulos secretores y liberarse con la degranulación mastocitaria. Así, a pesar de la variedad de genes, alelos y productos de las triptasas humanas, las triptasas- β deben considerarse los principales “implicados” en la patogénesis de la anafilaxia (31).

2.2. *Triptasas de los mastocitos de ratón—*

Los mastocitos de ratón albergan varias triptasas bien caracterizadas: una forma anclada a la membrana de los gránulos secretores, la triptasa- γ /triptasa transmembrana o Prss31 (de “protease serine member” S31), de función desconocida, producida por el gen *TPSG1*, y dos o tres formas solubles, dependiendo de la raza de ratón. Las dos triptasas solubles de ratón más similares a las clásicas triptasas- β humanas solubles, son las triptasas conocidas como proteasa de mastocito de ratón (mMCP de “mouse mast cell protease”) -6 (32, 33) y mMCP-7 (34) cuyos respectivos genes de ~2-kb *TPSB2* y *TPSAB1* residen uno junto al otro en el cromosoma 17A3.3 (20). Las secuencias de aminoácidos de mMCP-6 y mMCP-7 de ratones BALB/c son idénticas en un 75%.

Estas triptasas estrechamente relacionadas forman tetrámeros homotípicos y heterotípicos (35) que se almacenan en los gránulos secretores de los mastocitos, unidos iónicamente a proteoglicanos serina-glicina que contienen heparina (36, 37). mMCP-6 es mas abundante en mastocitos del tejido conectivo. Los ratones de la raza C57BL/6 (B6) carecen constitutivamente de mMCP-7 debido a una mutación en el sitio de ensamblaje exon-2/intron-2 en el gen *TPSAB1* (38, 39). En contraste, los mastocitos de los tejidos conectivos de todas las demás razas de ratones examinadas contienen cantidades apreciables de mMCP-6 enzimáticamente activa.

Los mastocitos de ratones también parecen expresar cantidades pequeñas de mMCP-11/Prss34, ortólogo de la mastina, una enzima que se expresa abundantemente en perros y cerdos. Sin embargo, no tiene un ortólogo que se exprese en humanos.

Se puede concluir que los mastocitos y basófilos de ratones expresan y liberan varias triptasas asociadas a sus gránulos. Sin embargo, en comparación con las correspondientes células en humanos, los mastocitos y basófilos de roedores expresan cantidades mucho menores de triptasas solubles en comparación con las triptasas- β humanas y cantidades mayores de mMCP-11, la cuál no se expresa en humanos. Por tanto, el papel y la importancia relativa de las triptasas en la anafilaxia derivada de estudios en roedores, no es directamente trasladable a los humanos.

| | PEPTIDASA | LOCUS | CARACTERÍSTICAS |
|---------|---|---------------|--|
| Humanos | Triptasa- α (alfa) | <i>TPSAB1</i> | Sin actividad catalítica; se secreta de forma constitutiva; no se almacena; puede estar genéticamente ausente en poblaciones caucásicas. |
| | Triptasa- β (beta)1 | <i>TPSAB1</i> | Forma clásica soluble, almacenada en los gránulos de mastocitos y secretada; forma tetrámeros resistentes a inhibidores de proteasas; diglicosilada. |
| | Triptasa- β (beta)2 | <i>TPSB2</i> | Almacenada en los gránulos de mastocitos y secretada; forma tetrámeros resistentes a inhibidores de proteasas; monoglicosilada. |
| | Triptasa- β (beta)3 | <i>TPSB2</i> | Probablemente activa, almacenada y secretada; diglicosilada. |
| | Triptasa- β (beta)3 ^{FS} | <i>TPSB2</i> | Variante inactiva de β (beta)3; común en algunas poblaciones no asiáticas. |
| | Triptasa- γ (gamma) | <i>TPSG1</i> | Activa, con preferencias de sustrato distintas de las triptasas beta; anclada a la membrana de gránulos secretores; expresión limitada a los mastocitos. |
| | Triptasa- δ (delta) | <i>TPSD1</i> | Prácticamente inactiva; expresión limitada a los mastocitos. |
| Ratón | mMCP-6 | <i>Mcpt6</i> | Tripsina-like, soluble, tetramérica, unida a heparina; funcionalmente equivalente a la triptasa humana- β (beta)1 |
| | mMCP-7 | <i>Mcpt7</i> | Tripsina-like, soluble, tetramérica; no se expresa en algunas razas de ratón; puede liberarse de forma sistémica durante la anafilaxia. |
| | mMCP-11 | <i>Prss34</i> | Activa, tripsina-like; expresada primariamente en basófilos; ortólogo de la mastina; no se expresa en humanos. |
| | Triptasa- γ (gamma)/Prss31 | <i>Tpsg1</i> | Anclada en la membrana de los gránulos secretores; expresión limitada a los matocitos. |

Tabla 1: Peptidasas triptasas de humanos y ratones. Adaptada de G.H. Caughey (6).

3. Proteoglicanos asociados a las proteasas de los gránulos de los mastocitos—

Los gránulos secretores electrodensos de los mastocitos contienen proteoglicanos serina-glicina, que portan heparina y condroitín sulfatos (40-44) a los que se unen las peptidasas de los mastocitos. La heparina es la molécula con mayor carga negativa en el cuerpo. Cada mastocito peritoneal de ratón contiene ~25 pg de este glicosaminoglicano, explicando la característica avidez de los mastocitos por la safranina y otras tinciones catiónicas (45). La secuencia repetida serina-glicina en la que se unen los glicosaminoglicanos, no se puede romper por ninguna proteasa conocida. Esta característica de resistencia a proteasas es biológicamente relevante porque la principal función de los proteoglicanos serina-glicina en los mastocitos es proporcionar un soporte para la formación de complejos macromoleculares con las diferentes peptidasas de los gránulos celulares. Al plegarse adecuadamente, se forma una cara cargada positivamente en la superficie de cada peptidasa que le permite unirse estrechamente a los glicosaminoglicanos con carga negativa de los proteoglicanos (46-48). Los proteoglicanos serina-glicina son esenciales para el procesamiento post-translacional y la acumulación de las peptidasas en los gránulos secretorios de los mastocitos.

4. Análisis estructural, bioactividad y preferencias de sustrato de las triptasas de los mastocitos—

Las triptasas de ratón mMCP-6 y mMCP-7 son idénticas en un ~ 75%, mientras que las triptasas humanas α , β 1, β 2 y β 3 son idénticas en un 93-99%. Las triptasas humanas α y β 1 difieren en 18 de sus 245 aminoácidos y 9 de estos residuos variables se

encuentran en la hendidura de unión al sustrato. La triptasa ~~humana~~ funcionalmente de las triptasas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en gran parte debido a una mutación Gly→Asp en el residuo 215 en el bolsillo S1 del enzima (16, 21, 22). Es un ejemplo de cómo un cambio en un único aminoácido en el lugar de unión al sustrato de una triptasa puede tener consecuencias determinantes en la regulación de su actividad enzimática o en la preferencia de sustrato. Las triptasas γ humana y de ratón son idénticas en un ~75% entre sí pero poseen una identidad inferior al 50% con las triptasas de ratón mMCP-6 y mMCP-7 y con la triptasa humana $\beta 1$.

Los residuos conservados que forman la triada catalítica de aminoácidos de la tripsina pancreática y de otras serín proteasas, están presentes en todas las triptasas de los mastocitos. Sin embargo, las triptasas de ratón y de humanos tienen preferencias de sustrato que son más restringidas que las de la tripsina pancreática (15,17, 49, 50). La estructura cristalina de la triptasa humana β -2 (Fig. 2) deducida por Bode y cols (51) reveló que esta serín proteasa existe como un tetrámero debido a interacciones entre residuos conservados tirosina y prolina que residen en seis segmentos en forma de bucle, lo que restringe su sitio activo incluso en estado de monómero (46, 48, 51). El sitio activo de cada monómero mira al interior hacia el poro central de la estructura en forma de rosco, explicando así en términos estructurales por qué pocas proteínas son accesibles a la triptasa humana β -2. La presencia de los proteoglicanos asociados da estabilidad a esta estructura y ayuda a restringir sus especificidades de sustrato (50, 51).

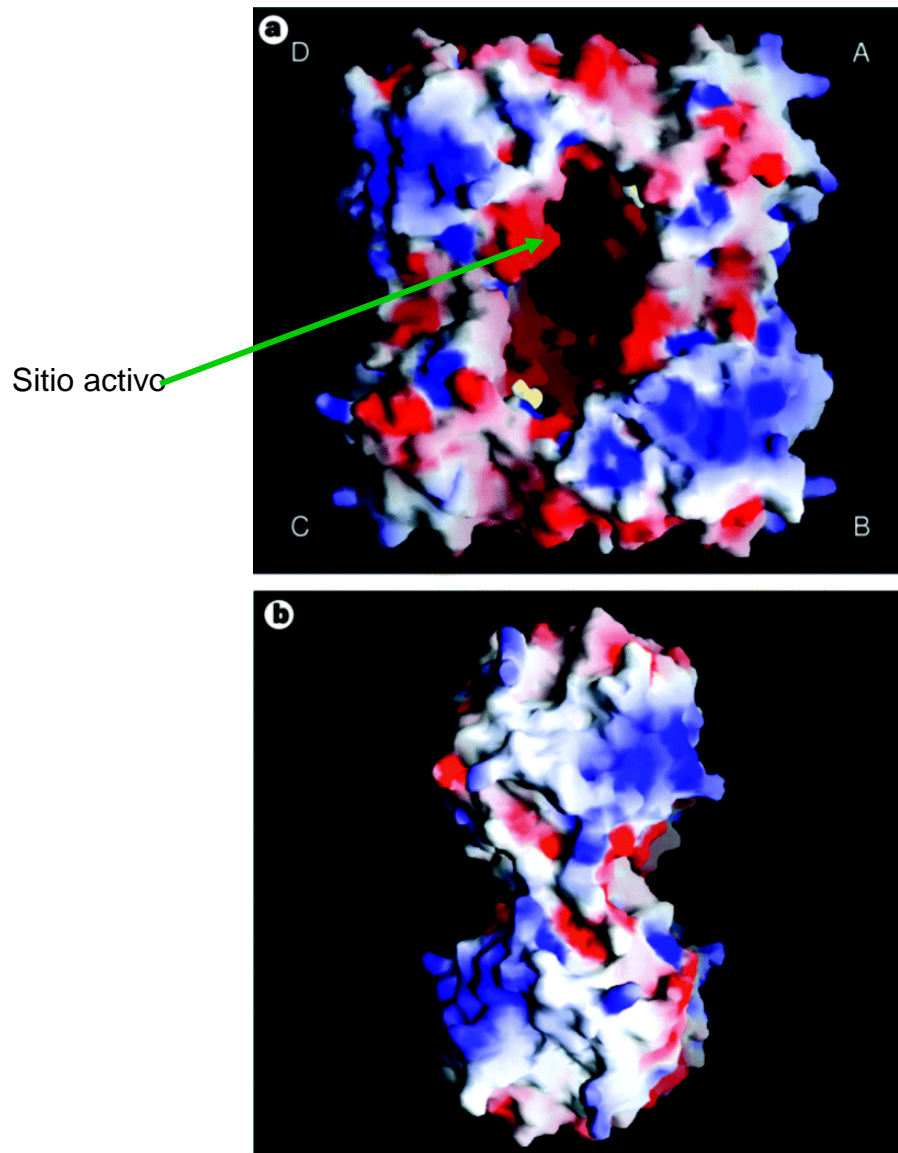


Figura 2. Estructura cristalina de la triptasa humana β 2. Pereira *et al* (51). a: vista frontal, b: plano sagital.

Estudios de activación llevados a cabo con pro-mMCP-6 (50), pro-mMCP7 (49) y pro-triptasa humana- β 1 (17), revelan que estos pro-enzimas forman tetrámeros espontáneamente cuando pierden sus pro-péptidos. La heparina es necesaria para mantener las actividades enzimáticas de las triptasas- β humanas. Sin embargo, se han detectado en la circulación de ratones con mastocitosis V3, homotetrámeros mMCP-7 enzimáticamente activos libres de proteoglicanos serina-glicina (52). También se puede generar mMCP-6 y mMCP-7 enzimáticamente activas *in vitro* en ausencia de heparina (49, 50). Por tanto, mMCP-6 y mMCP-7 son menos dependientes de los proteoglicanos serina-glicina que las triptasas humanas β 1, β 2 y β 3.

Aunque todas las triptasas murinas y humanas son inicialmente traducidas como zimógenos o proenzimas inactivos, se almacenan en los gránulos secretores en su forma madura enzimáticamente activa. El pH bajo (~5.5) de los gránulos secretores, hace que la actividad proteolítica de las triptasas sea baja, presumiblemente para minimizar su autólisis (45). Las triptasas de los mastocitos aumentan su actividad proteolítica al ser exocitadas en un entorno con pH neutro.

A pesar de la presencia de diversos tipos de inhibidores de proteasas en la sangre humana y de ratón, las triptasas de los mastocitos no son inhibidas eficazmente por ningún inhibidor de proteasa circulante conocido, incluyendo el inhibidor de α 1-antitripsina y la α 2-macroglobulina (52, 53). Esta propiedad puede deberse a la estructura mencionada previamente que las hace inaccesibles a los inhibidores de proteasas circulantes. Estos datos sugieren que las triptasas liberadas no son rápidamente inactivadas durante la inflamación porque posiblemente su misión sea degradar proteínas perjudiciales, algunas de las cuales están presentes en el plasma.

Estudios realizados en ratones BALB/c y en ratones del modelo murino de mastocitosis V3 (estos últimos contienen grandes cantidades de mastocitos mMCP-6+/mMCP-7+ (6+/7+) en su bazo e hígado) sometidos a anafilaxia pasiva, revelan que mMCP-6 y mMCP-7 se encuentran ambas empaquetadas en los gránulos de los mastocitos tisulares unidas a proteoglicanos serina-glicina. Sin embargo, al inducir la anafilaxia, gran parte de la triptasa mMCP-7 exocitada se disocia rápidamente de su proteoglicano después de la degranulación (52) y no se encuentra en la matriz extracelular. Por el contrario, casi la totalidad de los complejos mMCP-6•proteoglicanos exocitados permanecen intactos en la matriz extracelular cerca de los mastocitos degranulados (Fig. 3). La razón por la que los tetrámeros de mMCP-7 se disocian rápidamente de sus complejos macromoleculares exocitados a pH neutro, es porque su dominio de unión al proteoglicano es rico en residuos His (histidina) (48), en lugar de ser rico en residuos Arg/Lys (aminoácidos con carga positiva a pH 7) como ocurre en la mMCP-6 y en las triptasas humanas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (52). La histidina, tiene carga positiva a pH 5.5, por lo que mMCP-7 se mantiene unida a los proteoglicanos en el interior de los gránulos de los mastocitos. Sin embargo, no tiene carga positiva a pH neutro, por lo que al ser exocitada, disminuye la fuerza iónica que mantiene unida la triptasa mMCP-7 al proteoglicano con carga negativa (Fig. 4). Esta característica permite a los homotetrámeros de mMCP-7 abandonar los sitios de inflamación, encontrándose en la circulación sanguínea 15 minutos después de inducir una anafilaxia sistémica en los ratones con mastocitosis V3 (Fig. 5). El hecho de que estos tetrámeros circulantes de mMCP-7 tengan actividad enzimática (52), muestra su resistencia a los inhibidores de proteasas circulantes, incluso después de disociarse de sus proteoglicanos serina-glicina. La retención de la triptasa mMCP-6 exocitada en la matriz extracelular cerca de los

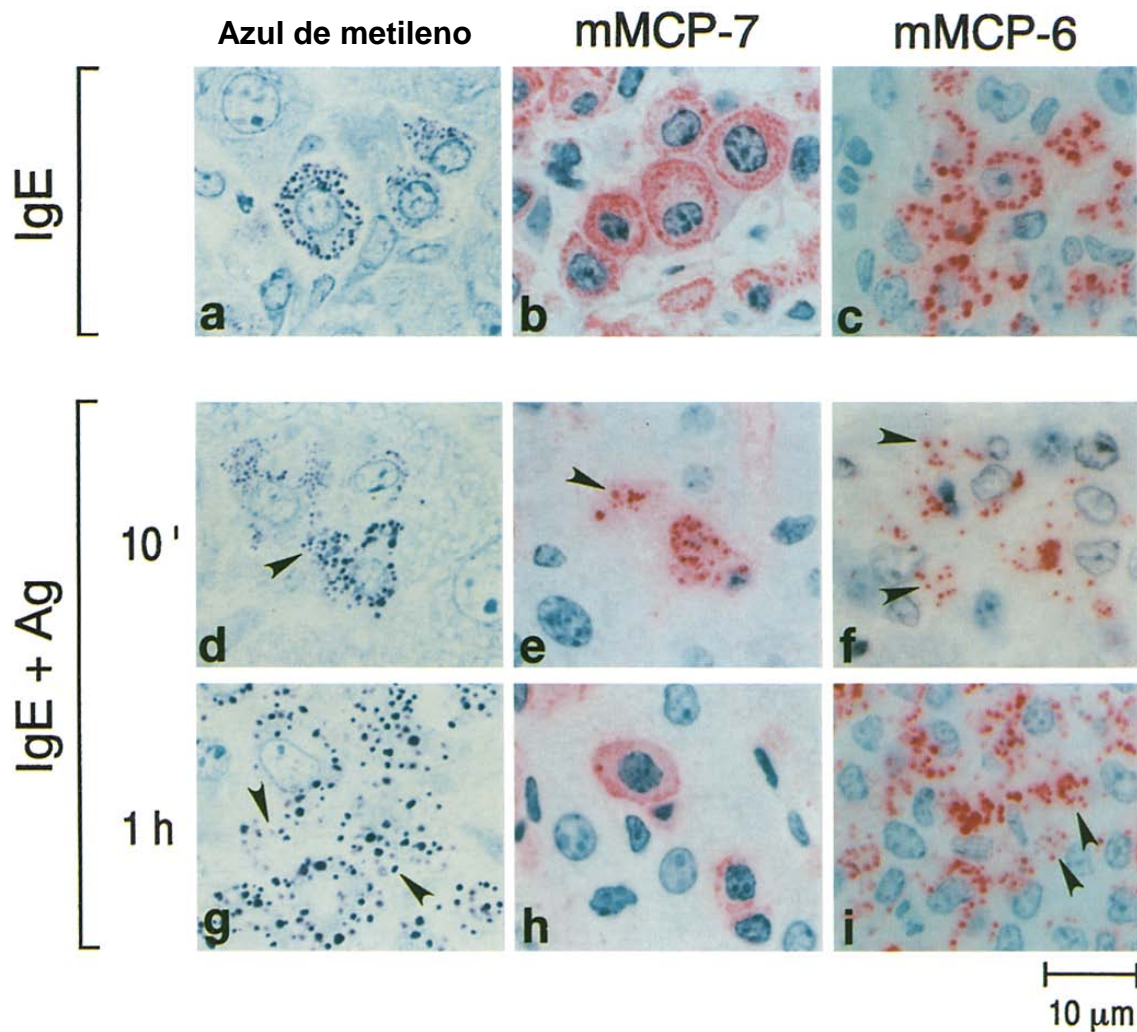


Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de mastocitos de hígado de ratones del modelo de mastocitosis V3 sometidos a una anafilaxia pasiva, con tinciones con azul de metileno y anticuerpos anti-mMCP-6 y anti-mMCP-7. Ghildyal *et al* (52). Se analizaron hígado y bazo de ratones con mastocitosis V3. Cuando a estos ratones sensibilizados con IgE se les administra intraperitonealmente sólo buffer, no se encuentra el contenido de los gránulos en la matriz extracelular del hígado (figura) o del bazo con ninguna de las tinciones utilizadas (a, b y c). Sin embargo, el contenido de los gránulos exocitados presente en la matriz extracelular 10 minutos después de la anafilaxia sistémica inducida tras la administración intraperitoneal del antígeno, se tiñen intensamente con azul de metileno (d) y con el anticuerpo anti-mMCP-6 (f). Aunque los gránulos no exocitados de estos mastocitos activados se tiñen claramente con el anticuerpo anti-mMCP-7, el contenido de los gránulos exocitado se tiñe muy débilmente por este anticuerpo (e). Una hora después de la provocación con el antígeno, gran cantidad del contenido exocitado de los gránulos permanece en la matriz extracelular teñido con azul de metileno (g) y anti-mMCP-6 (i) pero no con anti-mMCP-7 (h).

mastocitos tisulares activados sugiere una acción local, mientras que la rápida disipación de mMCP-7 hacia el torrente circulatorio y su resistencia a los inhibidores de proteasas circulantes, sugiere que esta triptasa rompe proteínas localizadas a mayor distancia. También pueden encontrarse tetrámeros de triptasa- β humana en sangre tras la activación mastocitaria en la anafilaxia sistémica (54), que son más resistentes a la inactivación por inhibidores de proteasas circulantes que sus monómeros (55).

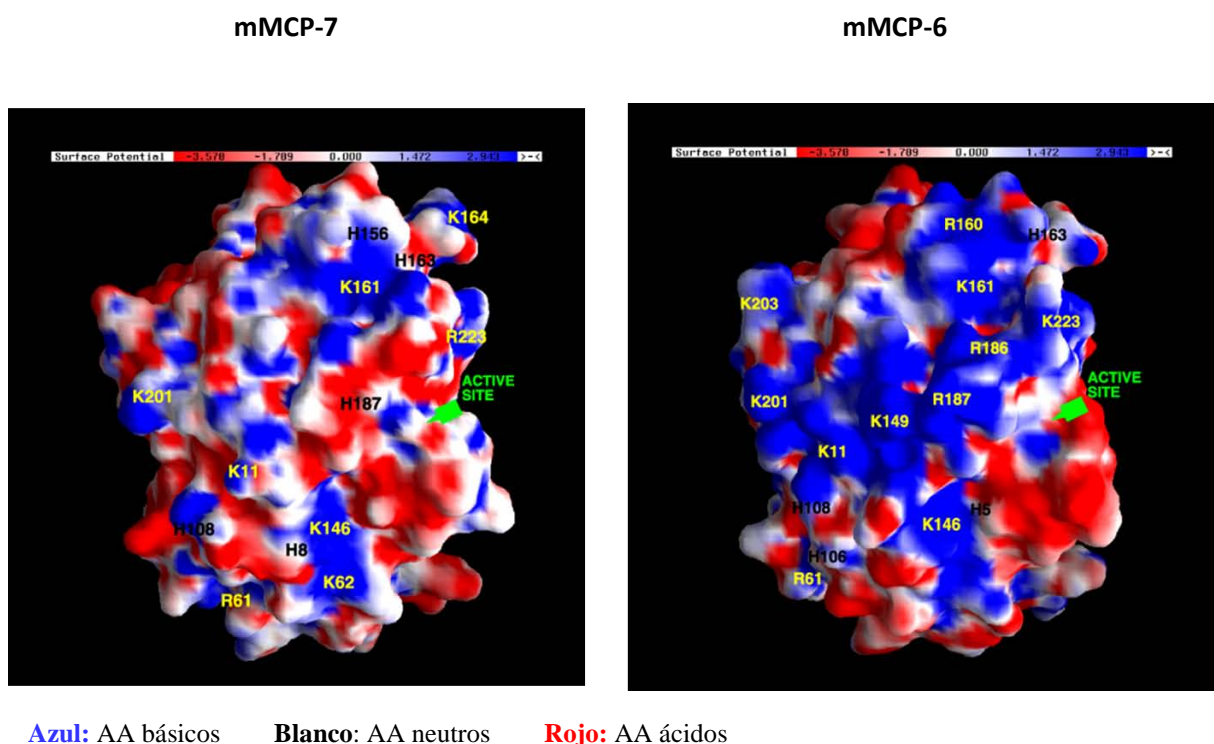


Figura 4. Potencial electrostático de mMCP-7 (izquierda) y mMCP-6 (derecha) a pH 7.0. Ghildyal et al (52). AA: aminoácidos. Mientras que mMCP-6 muestra una superficie rica en residuos Lys (K) y Arg (R) con fuerte carga positiva, la superficie de mMCP-7 contiene residuos His (H) con carga neutra. Esta distribución electrostática explica la mayor unión de mMCP-6 a los proteoglicanos con carga negativa, mientras que mMCP-7 se disocia de dichos proteoglicanos cuando es excitada en un entorno a pH neutro.

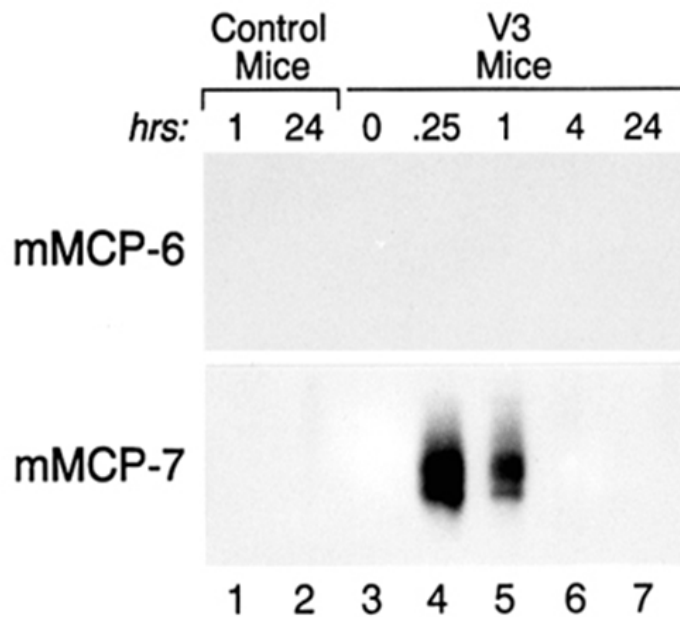


Figura 5. Detección mediante inmunoblot de cantidades importantes de mMCP-7 en sangre, 15 minutos después de inducir una anafilaxia sistémica en los ratones del modelo de mastocitosis V3. Ghildyal et al (52). Se tomaron muestras de plasma de ratones normales BALB/c (calles 1 y 2) y ratones V3 (calles 3-7) sensibilizados, en diferentes intervalos de tiempo tras la administración del Ag. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE/inmunoblot con anticuerpos anti-mMCP-6 y anti-mMCP-7.

En la triptasa γ , los aminoácidos que forman la hendidura de unión al sustrato son únicos y no es capaz de romper algunos sustratos peptídicos específicos de la tripsina y de la triptasa $\beta 1$. Al contrario que las demás triptasas de ratón y humanas, es inactivada rápidamente por el inhibidor de proteasas α -1 antitripsina. La triptasa γ también difiere de las demás triptasas en que se mantiene en forma de monómero tras su activación porque carece de dominios ricos en tirosina y prolina que son necesarios para la formación de la estructura tetramérica (28). La triptasa γ posee también un dominio en su parte C-terminal, por el que se ancla a la lámina externa de la membrana plasmática cuando degranula el mastocito. También tiene un puente disulfuro adicional

que une el propéptido con el dominio maduro del enzima, siendo por lo tanto una proteasa de 2 cadenas cuando se activa.

Las triptasas recombinantes de ratones BALB/c mMCP-6 y mMCP-7 no tienen preferencias de sustrato idénticas (49, 50). A pesar de estas diferencias ambas son triptasas que requieren para su acción enzimática un residuo Lys o Arg. Además, tienen bioactividades superponibles en algunos modelos de enfermedad (56). Las especificidades de sustrato de las dos isoformas de triptasa humana- β (denominadas $\beta 1$ y $\beta 2$) son más parecidas a las de la triptasa de ratón recombinante mMCP-6 que a la triptasa de ratón mMCP-7 (15, 17,49, 50).

Estudios realizados utilizando bibliotecas de péptidos expresados en fagos, muestran que la proteasa recombinante mMCP-7 rompe de forma preferente péptidos después de Arg en la secuencia [Ser-Leu-Ser-Ser-Arg-Gln-Ser](#) (Tabla 2) (49).

La cadena α del fibrinógeno es una de las muchas proteínas que contienen una secuencia similar a esta en su extremo C-terminal: Ser-Gly-Thr-Thr-Arg-Arg-Ser. Sin embargo, debido a la disposición espacial del sitio activo en la estructura tetramérica de mMCP-7, muy pocas proteínas candidatas tienen acceso a esta hendidura de unión al sustrato de la triptasa.

El análisis de péptidos susceptibles a mMCP-6 obtenidos de una biblioteca de péptidos expresados en fagos, muestra que mMCP-6 prefiere sustratos que tengan numerosos residuos Lys y/o Arg en su secuencia (50). En este caso no se obtuvo una sola secuencia preferida susceptible a mMCP-6 como en el caso de mMCP-7 (Tabla 3).

| Nº. de clones | Secuencia de aminoácidos del péptido |
|---|--------------------------------------|
| A. Dos vueltas de tratamiento | |
| 8 | Ser-Leu-Ser-Ser-Arg-Gln-Ser-Pro |
| 1 | Cys-Thr-Ser-Ser-Arg-Pro-Ser-Gly |
| 1 | Ser-Gly-Phe-Gly-Arg-Leu-Ser-Asp |
| 1 | Arg-Ser-Gln-Thr-Arg-Lys-Ser-Lys |
| 1 | Lys-Lys-Gln-Gly-Arg-Asp-Ser-Thr |
| 1 | Arg-Lys-Gln-Lys-Arg-Arg-Thr-Glu |
| 1 | Pro-Pro-Ser-Phe-Arg-Arg-Ser-Ser |
| 1 | Leu-Pro-Tyr-Gly-Arg-Ala-Thr-Thr |
| 1 | Asn-Thr-Pro-Thr-Lys-Leu-Ser-Pro |
| 1 | Arg-Arg-Pro-Thr-Lys-Lys-Asn-Thr |
| 1 | Arg-Gly-Glu-Lys-Arg-Ser-Lys-Ser |
| 1 | Met-Leu-Leu-Ile-Arg-Thr-Trp-Glu |
| 1 | Val-Thr-Tyr-Ala-Arg-Leu-Cys-Try |
| 1 | Leu-Ser-Tyr-Arg-Lys-Leu-Arg-Phe |
| 1 | Gly-Thr-Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-His |
| 1 | Asp-Arg-Lys-Gly-Arg-Gln-Gln-Gln |
| 1 | Arg-Tyr-Pro-Cys-Arg-Tyr-Gly-Leu |
| 1 | Lys-Glu-Glu-Asn-Arg-Lys-Asn-Asn |
| 1 | Phe-His-Pro-Ser-Arg-His-Pro-Pro |
| 1 | Ile-Ala-Arg-Glu-Lys-Gly-Gln-Gln |
| 1 | Ile-Cys-Pro-Pro-Arg-Leu-Leu-Gln |
| B. Cuatro vueltas de tratamiento | |
| 12 | Ser-Leu-Ser-Ser-Arg-Gln-Ser-Pro |

Tabla 2. Péptidos susceptibles a mMCP-7. La biblioteca de péptidos expresados en fagos específica para triptasa se incubó 2 o 4 veces con mMCP-7 recombinante. Se aislaron los clones susceptibles y se determinó la secuencia de aminoácidos de los péptidos correspondientes. Adaptada de Huang et al (49).

A diferencia de mMCP-7, mMCP-6 y su ortólogo humano triptasa- β 1 permanecen unidos iónicamente a los proteoglicanos serina-glicina durante horas tras ser excitados de mastocitos cutáneos (52). Esto sugiere la posibilidad de que los proteoglicanos puedan tener un papel regulador en la determinación de la especificidad del sustrato. Cuando se analizó una biblioteca de péptidos expresados en fagos con complejos mMCP-6•heparina (50) y triptasa humana β 1•heparina y β 2•heparina (15, 17), se obtuvo que estos complejos prefieren sustratos con la secuencia **Lys/Arg-Pro-X-Lys/Arg**, donde X pueden ser 0-3 aminoácidos sin carga. El segundo residuo Lys/Arg

| Nº de clones | Secuencia de aminoácidos del péptido |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| Dos vueltas de tratamiento | |
| 1 | Pro-Phe-Thr-His-Lys-Ser-Leu-Ser |
| 1 | Ser-Val-Leu-Pro-Lys-Leu-Arg-Ile |
| 1 | Pro-Lys-Glu-Thr-Lys-Gln-Thr-Asn |
| 3 | Ser-Leu-Ser-Ser-Arg-Gln-Ser-Pro |
| 5 | Thr-Pro-Leu-Leu-Lys-Ser-Trp-Leu |
| 11 | Arg-Asn-Arg-Gln-Lys-Thr-Asn-Asn |
| Cuatro vueltas de tratamiento | |
| 1 | Pro-Lys-Glu-Thr-Lys-Gln-Thr-Asn |
| 1 | Ser-Val-Leu-Pro-Lys-Leu-Arg-Ile |
| 2 | Ser-Leu-Ser-Ser-Arg-Gln-Ser-Pro |
| 4 | Arg-Asn-Arg-Gln-Lys-Thr-Asn-Asn |
| 7 | Thr-Pro-Leu-Leu-Lys-Ser-Trp-Leu |

Tabla 3. Péptidos susceptibles a mMCP-6 obtenidos en presencia de heparina. La biblioteca de péptidos expresados en fagos específica para triptasa se incubó 2 o 4 veces con mMCP-6 recombinante en presencia de una cantidad igual en peso de heparina. Se aislaron los clones susceptibles y se determinó la secuencia de aminoácidos de los péptidos correspondientes. Adaptada de Huang et al (50).

en esta secuencia, es el residuo P1 donde tiene lugar la ruptura del péptido susceptible. Dada la capacidad de los residuos Pro de aumentar la rigidez del péptido, es posible que se necesite un residuo Pro anterior para facilitar la inserción del sustrato en el poro central de los tetrámeros de MMCP-6 y triptasa humana- β cuando están unidos a heparina (57).

Se han realizado numerosos estudios *in vitro* que intentan identificar aquellas proteínas endógenas o exógenas sobre las que actúan de forma preferencial las triptasas de mastocitos de ratón y humanos, en presencia o ausencia de heparina, a pH neutro. Aunque se han identificado muchos candidatos, los estudios realizados en los años ochenta y noventa son difíciles de interpretar hoy debido a las variaciones alélicas de los genes humanos TSPAB1 y TPSB2, a la identificación de variantes de ensamblaje

que codifican isoformas de triptasa humana- β funcionalmente diferentes (58), y a la pureza cuestionable de algunas de las preparaciones de triptasa derivada de pulmón utilizadas en estos estudios. En relación con este último aspecto, ahora se sabe que el cromosoma de ratón 17A3.3 contiene 13 genes que codifican serin-proteasas de tripsina-“like”, muchas de las cuáles se expresan en el pulmón (20). Dicho esto, los substratos fisiológicos de las triptasas están por determinar, pero estudios *in vitro* han identificado varios substratos susceptibles incluyendo kininógeno de alto peso molecular, péptido intestinal vasoactivo, pro-metaloproteinasa, pro-urokinasa, fibronectina, fibrinógeno y el factor del complemento C3 (52).

5. *Papel de las triptasas en la inflamación y en las infecciones bacterianas—*

Diversos estudios muestran cómo las triptasas tienen actividad pro-inflamatoria. Estudios en ratones muestran como mMCP-7 provoca inflamación eosinofílica (17), mientras que mMCP-6 y la triptasa humana- β 1 provocan inflamación neutrofílica, cuando se inyectan en el peritoneo (17, 50). Estas últimas inducen en cultivos de células endoteliales la producción de cantidades importantes de quimioquinas de la familia de la IL-8, que regulan la quimiotaxis de los neutrófilos (17, 59, 60). La observación de que ciertos fragmentos proteolíticos del fibrinógeno pueden inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias por los monocitos (61) sugiere la posibilidad de que mMCP-7 genere factores biológicamente activos a partir de proteínas endógenas (fragmentos del fibrinógeno) capaces de exacerbar la inflamación *in vivo* (Fig. 6).

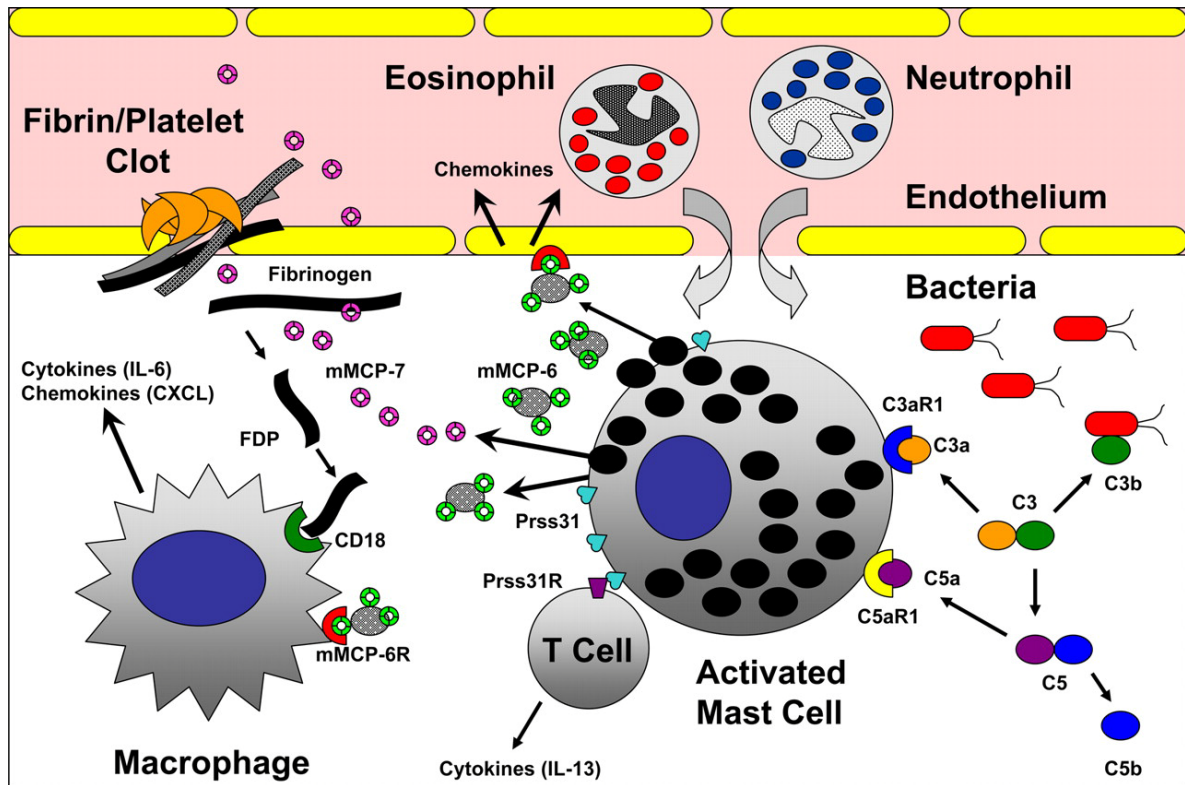


Figura 6. Modelo de triptasas de ratón en la inflamación tisular y en la defensa frente a bacterias.

McNeil HP et al. (45). La infección bacteriana resulta en la activación de la vía alternativa del complemento y en la generación de anafilotoxinas C3a y C5a. Estas se unen a diferentes receptores de la superficie del mastocito, provocando su activación y degranulación. La triptasa mMCP-7 excitada, se libera rápidamente de su proteoglicano serina-glicina, difundiendo al espacio vascular, donde rompe el fibrinógeno, impidiendo la coagulación. Es probable que algunos de los productos de degradación del fibrinógeno se unan al receptor CD18 de macrófagos circundantes, aumentando su expresión de citoquinas y quimioquinas, que conduzcan a la extravasación de eosinófilos en el sitio de la inflamación. Sin embargo, mMCP-6 permanece unida a sus proteoglicanos serina-glicina, actuando localmente a través de mecanismos que implican quimioquinas de la familia IL-8 para el reclutamiento de neutrófilos. Se desconocen las proteínas susceptibles sobre las que actúa mMCP-6. La triptasa γ (Prss31) pasa de la membrana de los gránulos a la membrana celular tras la degranulación, induciendo a las células T circundantes a aumentar la expresión de IL-13, por un mecanismo desconocido. Esto resulta en un aumento en la producción de moco que atrapa las bacterias facilitando su eliminación del pulmón.

Estudios realizados en ratones carentes de mMCP-6 o de ambas triptasas mMCP-6 y mMCP-7, sugieren que estas proteasas ayudan en la defensa frente a ciertas bacterias y parásitos (2) y contribuyen a la patología inflamatoria en ciertos modelos de enfermedad, como la artritis (56, 62). Los ratones transgénicos B6 que carecen de triptasa mMCP-6 no pueden combatir de forma eficiente infecciones por *Klebsiella pneumoniae* (2), *Pseudomonas aeruginosa* (Adachi, Stevens, datos no publicados), *Trichinella spiralis* (63), y pneumovirus (Ptaschinski, Rosenberg, Adachi, Stevens, Foster, datos no publicados). A pesar de su papel beneficioso en la inmunidad innata, los complejos mMCP-6•heparina tienen papeles pro-inflamatorios importantes en modelos experimentales de artritis (56, 62), colitis (64-66), aneurismas de aorta abdominal (67) y en la inflamación de la vía aérea dependiente de antígeno-IgE (68). Sigue sin conocerse a nivel molecular el mecanismo por el que las triptasas de mastocitos de ratón y humanos controlan la respuesta inmune y el daño del tejido conectivo *in vivo*, pero estas enzimas regulan el acúmulo de granulocitos en los tejidos, en parte, induciendo un marcado incremento en la expresión de quimioquinas en las células circundantes (50, 62, 60, 69).

6. Papel de las triptasas en la anafilaxia—

La medición de triptasa- β madura en sangre tiene valor clínico y se utiliza para el diagnóstico de degranulación mastocitaria sistémica en casos de anafilaxia (54). También es útil para detectar activación mastocitaria local en diversas muestras biológicas como secreción nasal, lágrimas, lavado broncoalveolar o fluido de lesiones ampollas en la piel o esputo.

Más allá de su utilidad como marcadores de degranulación mastocitaria, las triptasas pueden afectar el curso clínico de la anafilaxia, como sugieren múltiples estudios. Por ejemplo, las triptasas- β rompen e inactivan péptidos broncodilatadores como el péptido intestinal vasoactivo, con la posible consecuencia de un empeoramiento del broncoespasmo (70). Fragmentando el fibrinógeno, proteína pro-coagulante, y activando el activador del plasminógeno pro-urokinasa, impedirían tanto la formación como la persistencia de coágulos de fibrina en los sitios de activación mastocitaria (71, 72). En el contexto de la anafilaxia, esto podría tener el efecto de permitir la extravasación de fluido a los tejidos, favorecida por el aumento de la permeabilidad vascular secundario a la histamina, antes de que sea impedido por la formación de coágulos de fibrina (6). Las triptasas pueden promover la extensión de señales de degranulación a otros mastocitos, por mecanismos desconocidos, tal como sugieren estudios animales que utilizan inhibidores de triptasa y triptasa exógena (73, 74). La mayoría de estos efectos probablemente se deban a la liberación local de triptasa en los tejidos, más que al efecto sistémico a distancia a través del torrente sanguíneo, ya que el tiempo de aparición de la triptasa en sangre tras una anafilaxia no se correlaciona con la cinética de los síntomas y signos clínicos (75).

7. Papel de los complejos triptasa•proteoglicanos en la coagulación—

7.1. Estructura del fibrinógeno y mecanismo de formación de redes de fibrina dependiente de la acción de la trombina—

El fibrinógeno es una glicoproteína de 340 kDa sintetizada en el hígado. Es un componente principal del plasma, en el que se encuentra normalmente a una concentración de 1.5-4.0 mg/ml. Es la proteína principal del sistema de la coagulación.

Es además una proteína de fase aguda por lo que sus niveles en sangre se elevan en numerosos procesos inflamatorios.

El fibrinógeno circula en la sangre en forma de dímero, con dos dominios D exteriores conectados cada uno a un dominio E central por un segmento en espiral. Cada unidad del dímero está formada por 3 cadenas polipeptídicas (denominadas cadena α de 63.5 kDa, cadena β de 56 kDa y cadena γ de 47 kDa) que se encuentran unidas en el dominio E por cinco puentes disulfuro (77-81). El extremo N-terminal de las 3 cadenas reside en el dominio E, mientras que el extremo C-terminal de las cadenas reside en el dominio D. La secuencia de 16 aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena α (fibrinopéptido A) impide que el fibrinógeno forme polímeros de fibrina de forma espontánea.

La conversión del fibrinógeno en redes de fibrina durante el daño vascular es un proceso en varios pasos (76). Inicialmente, la trombina rompe el extremo N-terminal de la cadena α del fibrinógeno, liberándose el fibrinopéptido A (aminoácidos 1-16). Después la trombina rompe el extremo N-terminal de la cadena β , resultando en la pérdida del fibrinopéptido B (aminoácidos 1-17) (82-89). Los nuevos extremos N-terminales expuestos de las cadenas α y β (denominados dominio Ea) interaccionan con una secuencia complementaria de unión en el dominio D en la cadena γ , que se encuentra en los residuos 337-339 (denominada dominio Da) de moléculas vecinas (89-91). Estas uniones Ea:Da producen la alineación de moléculas de fibrina con una superposición escalonada de los dominios terminales e intermedios para formar fibras espirales de doble cadena (92-95). Las fibras también establecen asociaciones laterales para crear fibras de múltiples cadenas (96-97). La formación de una red de fibrina firme e insoluble depende de enlaces entrecruzados en el polímero mediante la actividad transglutaminasa del factor XIIIa (activado) (98-100) (Figura 7). La coagulación por la

formación de estas redes de fibrina no es posible si la concentración de fibrinógeno en el plasma es <1 mg/ml, si sus dominios E o D se destruyen antes de que pueda actuar la trombina o si los niveles de trombina enzimáticamente activa son bajos.

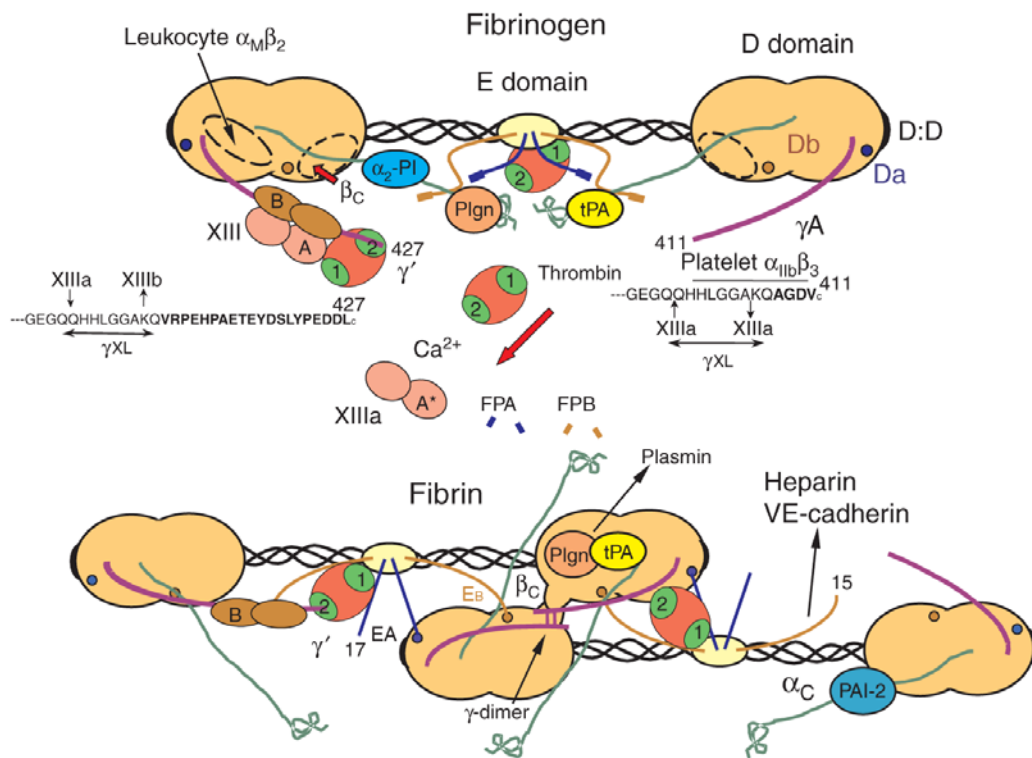


Figura 7. Esquema de la estructura del fibrinógeno y su conversión en fibrina por acción de la trombina. Mosesson MW (76).

```

1 mfsmrivclv lsvvgtawta dsgegdflae gggvrgprvv erhqsackds dwpfcsdedw
61 nykcpsgcrm kglidevnqd ftnrinklkn slfeyqknnk dshslttnim eilrgdfssa
121 nnrdntynrv sedlrsriev lkrkviekvq hiqllqknvr aqlvdmkrle vdidikirsc
181 rgscsralar evdlkdyedq qkqleqviak dllpsrdrqh lplikmkpvp dlvpgnfksq
241 lqkvppewka ltdmpqmrme lerpggneit rggstsytg setesprnps sagswnsgss
301 gpgstgnrnp gssgtggtat wkpgssgpgs tgswnsgssg tgstgnqnpg sprpgstgtw
361 npgssergsa ghwtsessvs gstgqwhses gsfrpdspgs gnarpnnpdw gtfeevsgnv
421 spgtrreyht eklvtskgdk elrtgkekvt sgsttttrrs csktvtktvi gpdghkevtk
481 evvtsedgsd cpeamdlgtl sgigtldgfr hrhpdeaaff dtastgktfp gffspmlgef
541 vsetesrgse sgiftntkes sshhpgiaef psrgksssys kqftsstsyn rgdstfesks
601 ykmadeagse adhegthstk rghaksrpvr gihtsplgkp slsp

```

Figura 8. Esquema de la secuencia de aminoácidos de la cadena del fibrinógeno humano (FGA-isoforma A, número de acceso de “GenBank”NP_068657).

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena del fibrinógeno humano. El péptido señal marcado en rojo, corresponde a los residuos 1-19. Por tanto, la proteína precursora que existe en el retículo endoplásmico en las células que expresan fibrinógeno consiste en los residuos 20-646. La trombina rompe el enlace R16G17 para generar el fibrinopéptido A, marcado en amarillo, iniciándose así la formación de coágulos de fibrina.

7.2. Mecanismo anticoagulante de la heparina—

La heparina presente en los gránulos de los mastocitos es un potente anticoagulante *in vivo*. Este glicosaminoglicano actúa impidiendo la acción de la trombina mediante la activación de la antitrombina/serpina-C1. Produce un cambio conformacional en la

antitrombina, causando la eliminación de los residuos P14 (Gly) y P15 (Ser) en la región bisagra redondeada (Figura 9 B), en la base del bucle de su sitio activo señalado en rojo. Este cambio en la estructura terciaria de la serpina permite a la antitrombina acelerar la inactivación de la trombina 2000-4000 veces, resultando en la producción de menos fibrina (101-102).

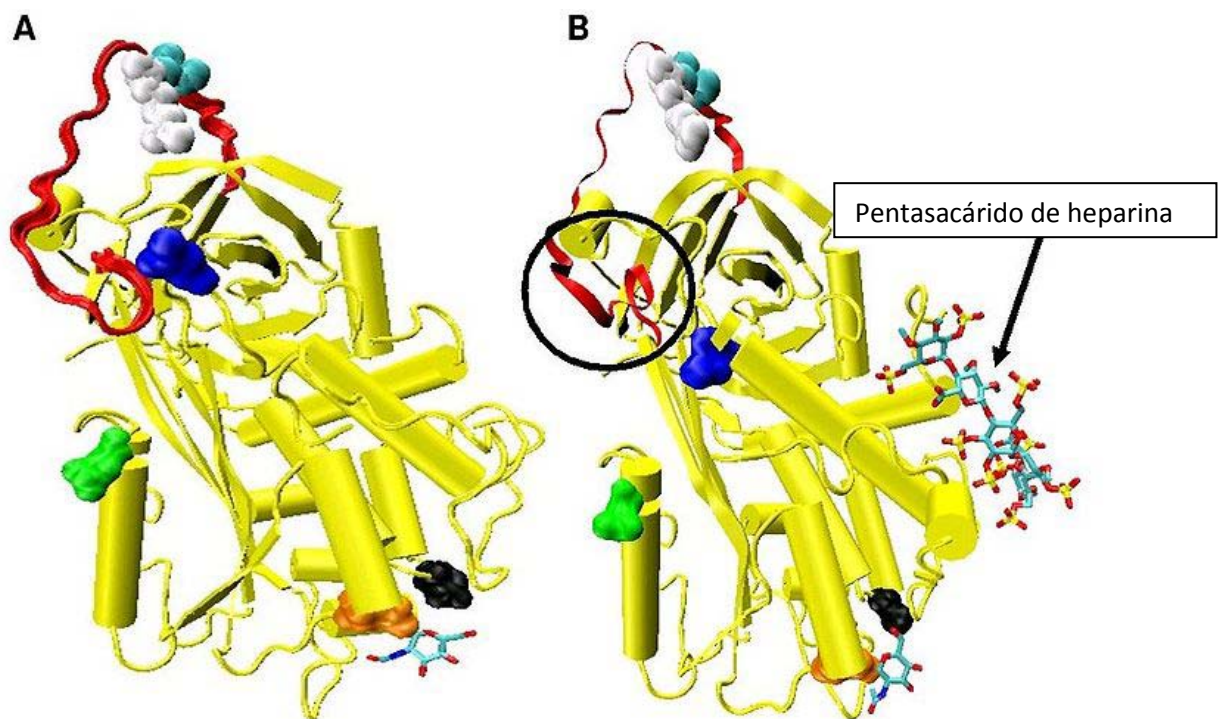


Figura 9. Cambio conformacional inducido por la heparina sobre la antitrombina/Serpina- C1 que potencia su acción antitrombina, explicando su efecto anticoagulante. La figura muestra la estructura de la antitrombina/Serpina-C1 antes (A) y después (B) de unirse a la heparina.

7.3. Acción anticoagulante de los complejos triptasa•proteoglicano—

El cromoglicato sódico previene la degranulación de los mastocitos. Samoszuk y Corwin (103) mostraron que ratones BALB/c portadores de tumores a los que se les dió cromoglicato sódico intraperitoneal contenían sangre coagulada en y alrededor de sus tumores. Estos datos sugerían la presencia de uno o más factores anticoagulantes en los gránulos secretores de los mastocitos.

El modelo murino de mastocitosis V3 BALB/c contiene grandes cantidades de mastocitos mMCP-6+/mMCP-7+ (6+/7+) en su bazo e hígado (104). Cuando se induce una anafilaxia sistémica en estos animales, se encontraron cantidades detectables de mMCP-7 enzimáticamente activa en la sangre 15 minutos después de la activación de los mastocitos (52) (Fig. 5). El análisis por SDS-PAGE del plasma de estos ratones tratados con antígeno/IgE reveló la presencia de péptidos derivados de la cadena α del fibrinógeno de ratón (Fig. 10). Entonces se mostró que la triptasa recombinante de ratón mMCP-7 podía romper rápidamente la cadena α de la proteína *in vitro* (Fig. 11), incluso si la reacción se llevaba a cabo en presencia de los inhibidores de proteasas del plasma o suero de ratón (49). Estos datos eran inesperados debido al gran tamaño de la molécula de fibrinógeno circulante de 340-KDa. Era inexplicable cómo las cadenas α del dímero de fibrinógeno podían encajar dentro del pequeño bolsillo del sitio activo situado en el centro del tetrámero de la triptasa con forma de rosco. Además, el significado biológico de los datos no era claro debido al hecho de que los ratones B6 carecen constitutivamente de triptasa mMCP-7 (38, 39), sin tener ningún defecto aparente en el metabolismo del fibrinógeno en los tejidos durante una reacción de anafilaxia dependiente de mastocitos.

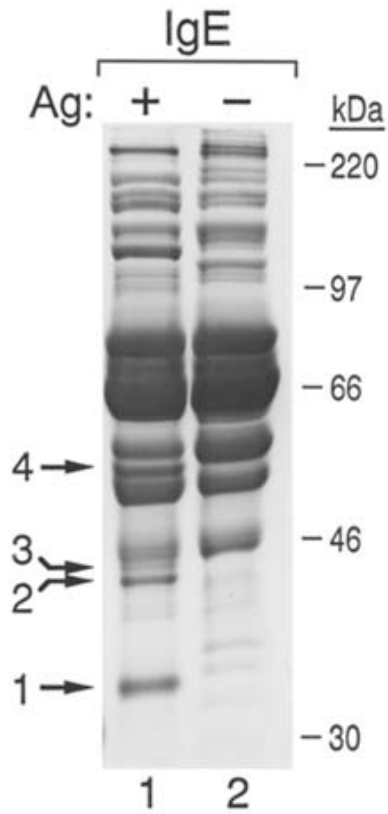


Figura 10. Análisis por SDS-PAGE del plasma de ratones del modelo de mastocitosis V3 sensibilizados con IgE antes (Ag-, carril 2) y después (Ag+, carril 1) de inducir una anafilaxia sistémica mediante provocación con el antígeno (Ag). A los 20 minutos de inducir la anafilaxia, aparecen en el plasma los 4 péptidos indicados de ~34, 40, 42 y 55 kDa. Los marcadores de peso molecular se indican a la derecha. En base a la secuencia de aminoácidos N-terminal, tres de estos péptidos derivan de la cadena α del fibrinógeno. El cuarto deriva de la cadena γ del fibrinógeno. Huang et al. (49).

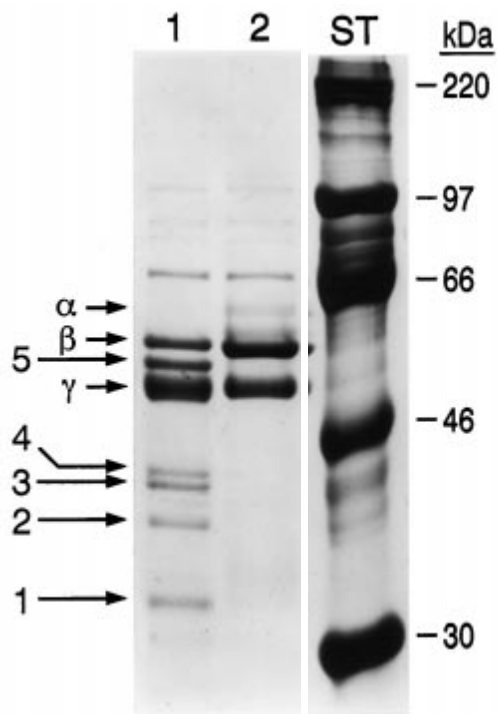


Figura 11. Fibrinógeno de ratón antes (carril 2) y después (carril 1) de su incubación con mMCP-7.

Los estándares de pesos moleculares (ST) se muestran a la derecha. Las flechas de la izquierda muestran los péptidos que aparecen tras la digestión del sustrato. Huang et al (49).

Por su parte, Samoszuk y colaboradores (105) concluyeron que la actividad anticoagulante de los complejos triptasa humana- β -heparina utilizados en su estudio *in vitro* era más dependiente del glicosaminoglicano heparina del complejo que de la propia triptasa, ya que dicha actividad anticoagulante era inhibida por completo por protamina o por heparinasa.

Sin embargo, en apoyo a los datos mencionados previamente en relación con la triptasa mMCP-7, Thomas y colaboradores (106) publicaron que la cadena α del fibrinógeno humano era susceptible a un complejo no definido triptasa humana- β -heparina obtenido de biopsias de pulmón humano. Los autores concluyeron que su

preparación enzimática rompía de forma preferencial la cadena α del fibrinógeno humano en la posición Arg591, pero este residuo reside en una secuencia de 14 aminoácidos que está ausente en el fibrinógeno de muchas especies, incluido el ratón. Otra deficiencia de este estudio y otro estudio previo que también usó un complejo triptasa humana- β -heparina no definido purificado de pulmón humano (107), es que no se llevó a cabo ningún experimento *in vivo* para determinar la relevancia fisiológica de los datos *in vitro*. Si el fibrinógeno de ratón es o no susceptible a mMCP-6 *in vivo* tampoco pudo ser evaluado en ese momento debido a la falta de un modelo murino carente de mMCP-6.

En este trabajo se muestra ahora que la cadena α del fibrinógeno humano y de ratón es altamente susceptible a los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β -heparina a pH neutro, rompiendo la proteína plasmática en una posición anterior diferente a la descrita previamente. Se muestra además el efecto anticoagulante de estas triptasas *in vitro* e *in vivo*. Estos hallazgos cambian el paradigma de cómo los mastocitos impiden la coagulación sanguínea y el depósito de fibrina en los tejidos cuando se activan y liberan el contenido de sus gránulos: no depende de la acción de la heparina contenida en sus gránulos sino de la acción proteolítica sobre el fibrinógeno de la propia triptasa.



OBJETIVOS



El objetivo principal del siguiente trabajo de investigación es determinar el efecto de la triptasa humana- β y la triptasa de ratón mMCP-6 sobre el fibrinógeno y la trascendencia de esta acción sobre la coagulación *in vitro* e *in vivo*. Los objetivos concretos planteados son:

1. Analizar el efecto proteolítico de los complejos recombinantes triptasa humana- β -heparina y mMCP-6-heparina, así como de los complejos naturales mMCP-6-proteoglicanos serina-glicina, sobre el fibrinógeno.
2. Analizar la resistencia de los complejos triptasa humana- β -heparina a los inhibidores de proteasas presentes en el suero.
3. Determinar el sitio de ruptura preferencial en la molécula del fibrinógeno donde actúan los complejos triptasa humana- β -heparina.
4. Determinar la actividad anticoagulante de los complejos triptasa-heparina *in vitro*.
5. Demostrar el efecto anticoagulante de la triptasa de ratón mMCP-6 *in vivo* tras la degranulación mastocitaria.



MATERIAL Y MÉTODOS



1. *Materiales y reactivos*—

Se utilizaron mMCP-6 y triptasa humana- β recombinantes generadas en células de insectos High Five™ y purificadas del medio acondicionado libre de suero, tal como se ha descrito previamente (16, 17, 50). Para obtener el enzima activo, cada proenzima purificado por bioingeniería se expuso a enterokinasa (laboratorios Biozyme, San Diego, CA) a un ratio pro-EK-triptasa:enteroquinasa >100:1, en presencia del glicosaminoglicano heparina, purificado por gradiente de densidad de CsCl, en una cantidad aproximadamente igual a la de triptasa recombinante.

Se utilizó un complejo recombinante triptasa humana- β •heparina, enzimáticamente activo, de Promega (Madison, WI), clonado y expresado en *Pichia pastoris* y purificado por cromatografía de afinidad (108).

El fibrinógeno humano y el fibrinógeno de ratón se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), igual que la tripsina pancreática y el sustrato espectrofométrico tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA (para-nitroanilida).

Se utilizó el anticuerpo anti-fibrinógeno ab83477 de Abcam (Cambridge, MA). Este anticuerpo de conejo se generó frente a un péptido sintético de 50 aminoácidos correspondiente a los residuos 576-625 del dominio C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano. Este anticuerpo reconoce el fibrinógeno humano y el de ratón.

Se utilizó un abordaje de recombinación homóloga para crear la raza de ratón 6-/- B6 (2), carente de triptasa mMCP-6, que se utilizó para la reacción de anafilaxia cutánea pasiva (ACP). Estos ratones, y sus controles de la misma camada 6+/- B6, los cuáles si expresan mMCP-6, se alojaron en las mismas instalaciones para animales en la Universidad de Texas M. D. Anderson Cancer Center.

2. *Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno humano por el complejo triptasa humana- β -heparina. Análisis mediante SDS-PAGE e Inmunoblot en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas presentes en el suero—*

Para analizar la proteólisis del fibrinógeno humano, se incubó la proteína plasmática purificada (15-100 μ g) con 0.1-0.4 μ g del complejo recombinante triptasa humana- β -heparina, a 37°C, durante diferentes periodos de tiempo, desde 10 segundos hasta 3 horas. Al final de cada digestión, se añadió un volumen igual de tampón SDS-PAGE 2x (SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, Tris-HCl 63 mM, pH 6,8, con o sin β -mercaptoetanol al 5%). Se añadió β -mercaptoetanol en el tampón de muestra de SDS-PAGE para romper los enlaces disulfuro intracatenarios e intercatenarios en el fibrinógeno. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, y se cargaron en geles preformados de poliacrilamida Tris-HCl al 12% (Bio-Rad, Hercules, CA). Después de la electroforesis a ~105 V, un gel en cada experimento se tiñó con azul de Coomassie para visualizar los productos de esta digestión. Un segundo gel se utilizó para el inmunoblot. Este gel se empapó en tampón de transferencia (metanol 15%, Tris-HCl 25 mM, y glicina 200 mM, pH 8,5) y las proteínas separadas por la electroforesis se transfirieron a 4°C a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (Bio-Rad) durante ~2 h a ~110 V. La membrana resultante se bloqueó durante 2 horas en tampón tris-salino suplementado con tween-20 al 0,05% (TBST), conteniendo adicionalmente leche desnatada al 5%. Después se lavó con TBST, seguido de una incubación durante la noche a 4°C con una dilución 1:1000 del anticuerpo de conejo anti-fibrinógeno ab83477 en TBST con leche desnatada al 1%. Después de 3 lavados en TBST, cada membrana se incubó durante 1 h con un conjugado IgG de cabra anti-conejo•HRP (“horseradish peroxidase”) (Bio-Rad). Después se lavó 3 veces con TBST y se incubó 1

minuto con los reactivos de detección de quimioluminiscencia ECL (“Enhanced Chemiluminescence”) de Amersham (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). Se utilizó una película de ECL de Amersham para el revelado del inmunoblot.

Para evaluar las posibles consecuencias de los inhibidores de proteasas circulantes en la sangre, se incubó fibrinógeno humano (15 μg) con tripsina (0,05 μg) o con el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (0,4 μg) durante 15 min a 37°C, antes y después de exponer estas enzimas a suero humano al 0,2%. Se añadieron volúmenes iguales de tampón SDS-PAGE 2x, y se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE e inmunoblot.

Las cantidades de tripsina y triptasa humana- β utilizadas en estos experimentos eran equivalentes en su actividad enzimática. Para determinar su actividad enzimática se utilizó el método espectrofotométrico de Svendsen y colaboradores (109), basado en su capacidad para romper el substrato cromogénico tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA (p-nitroanilida). Para ello, utilizando una placa de ELISA, se mezcla en cada pocillo 1 μL del enzima cuya actividad se va a medir, en un tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5) que contenía el substrato tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA 0,5 mM. Inmediatamente se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en diferentes tiempos hasta 15 minutos, obteniéndose una curva para cada enzima, que permite comparar su actividad enzimática en base al incremento de la absorbancia entre dos tiempos determinados.

También se evaluó la capacidad de los inhibidores de proteasas endógenos presentes en el suero humano para inactivar un complejo recombinante mMCP-6•heparina.

3. *Identificación del sitio de ruptura preferente de la cadena α del fibrinógeno humano susceptible a los complejos triptasa humana- β -heparina, mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y análisis de la secuencia C-terminal—*

Se incubó fibrinógeno humano (30 μ g) con el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (0,4 μ g) durante diferentes tiempos de 1 a 15 minutos, a 37°C. El producto de la digestión se sometió a SDS-PAGE. Se llevó a cabo la electroforesis en geles preparados de poliacrilamida al 12,5%, de mayor tamaño, para una resolución óptima de las 3 cadenas de la proteína y de los productos de la digestión enzimática. Se utilizó el soporte para electroforesis Protean II xi cell de 16 cm (Bio-Rad, Hercules, CA). Los geles obtenidos se tiñeron débilmente con azul de Coomassie. A continuación se destiñeron para eliminar el exceso de tinte de fondo, manteniendo la visualización de las bandas. El principal fragmento de gran tamaño de la cadena α del fibrinógeno humano generado en cada caso fue escindido del gel, así como un fragmento del fondo del mismo gel como control. Los fragmentos escindidos se lavaron dos veces con acetonitrilo diluido al 50% en agua. Después de desechar el sobrenadante, las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior utilización. Durante todo el proceso todas las superficies que contactaban con el gel (guantes, bandejas, cuchillas etc) se lavaron con abundante agua previamente, para reducir la contaminación de las muestras con queratina. Las muestras se sometieron posteriormente a la determinación de su secuencia de aminoácidos C-terminal mediante proteólisis exhaustiva con 3 enzimas separadas y mapeo ortogonal de las secuencias resultantes. El análisis de la secuencia peptídica de cada digestión se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa de microcapilaridad, combinada con espectrometría de masas en

tándem con fuente nanoelectrospray (LC-MS/MS) en un espectrofotómetro de masa LTQ-Orbitrap (110) (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). El Orbitrap repetidamente informaba de un rango de masa-carga (m/z) de 395 a 1600, mientras que el espectro MS/MS de los 20 iones mayoritarios en cada barrido fue adquirido en el captador de iones lineal. Los espectros MS/MS fueron adquiridos con una energía relativa de colisión del 30%, 2.5 Da de banda de separación y los iones recurrentes excluidos dinámicamente por 60 s. La secuencia preliminar de los péptidos se facilitó con el algoritmo SEQUEST con una tolerancia de masa de 30 ppm en comparación con el subconjunto humano (MGI) de la base de datos Uniprot (<http://www.informatics.jax.org>). Esto fue repetido usando una base de datos en la cual las secuencias fueron invertidas o aleatoriamente mezcladas para evitar falsos positivos. Se aceptaron péptidos con errores de masa <2.5 ppm y el umbral de aceptación estimado para falsos positivos se fijó en $\sim 1\%$. Los datos obtenidos de las digestiones fueron combinados, previa eliminación de contaminantes de queratina o espectros de péptidos auto lisados, y evaluados nuevamente con SEQUEST, usando como referencia la secuencia de fibrinógeno humano en “GenBank” sin tener en cuenta la especificidad enzimática. El mapeo de los péptidos de la región C-terminal del fibrinógeno humano y la posterior confirmación manual de sus secuencias fue facilitado con una versión de Proteomics Browser Suite (ThermoFisher Scientific). Este análisis de secuencia se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Harvard “Harvard Microchemistry and Proteomics Analysis Facility”.

Ocasionalmente se vio un péptido de 7-kDa en la digestión del fibrinógeno humano. Para purificar e identificar este fragmento, se realizó una reacción de digestión a gran escala en la que se incubaron 300 μg de fibrinógeno humano con 8 μg del

complejo recombinante triptasa humana- β -heparina, durante 15 minutos a 37°C. El producto de digestión resultante se sometió a un paso de filtración en una columna de centrifugación (4°C, 20 minutos, 4.000 g) con una membrana de 10-kDa de punto de corte Centricon (Millipore, Billerica, MA). Los péptidos de bajo peso molecular filtrados mediante este procedimiento, se concentraron posteriormente por precipitación en ácido tricloroacético al 20%, a 4°C, durante una noche. El precipitado se lavó dos veces con acetona, se reconstituyó en PBS y tampón SDS 2x y se sometió a SDS-PAGE. El péptido de 7-kDa resultante purificado fue caracterizado mediante análisis MS/MS, siguiendo los mismos pasos para la preparación de la muestra que los seguidos para el análisis MS/MS del fragmento mayor de la cadena α del fibrinógeno indicados previamente.

4. Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno de ratón por los complejos triptasa humana- β y mMCP-6-heparina—

La capacidad de los complejos recombinantes triptasa humana- β y mMCP-6-heparina para romper el fibrinógeno de ratón, fue evaluada tal como se ha descrito antes para la evaluación de la susceptibilidad proteolítica del fibrinógeno humano, mediante SDS-PAGE e inmunoblot. Se incubó para ello fibrinógeno de ratón con el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina durante diferentes intervalos de tiempo entre 1-180 minutos y el resultado de esta digestión se analizó mediante SDS-PAGE e inmunoblot utilizando el anticuerpo de conejo anti-fibrinógeno ab83477, dirigido frente al extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno . Así mismo, se incubó fibrinógeno de ratón con los complejos recombinantes triptasa humana- β y

mMCP-6•heparina generados en células de insectos, analizándose el producto de digestión mediante SDS-PAGE.

Se obtuvieron datos confirmatorios, analizando la capacidad de complejos naturales mMCP-6•heparina de romper el fibrinógeno de ratón, utilizando mastocitos derivados de la médula ósea de ratones 6+/7- B6, que expresan mMCP-6. Para estos últimos experimentos, se generaron mastocitos de médula ósea de ratones 6+/7- B6, cultivando sus progenitores hematopoyéticos durante 4 semanas en un medio de cultivo celular acondicionado enriquecido con IL-3, como se ha descrito previamente (111). Los mastocitos inmaduros resultantes se cultivaron 2 semanas mas en presencia de IL-33 recombinante de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN), ya que esta citoquina induce en esta población de mastocitos un marcado aumento de la acumulación en sus gránulos de complejos mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina (112). Se sonicaron en hielo aproximadamente 10 millones de los mastocitos resultantes en 200 μ l de PBS. Las muestras de fibrinógeno de ratón se incubaron durante 5 minutos a 37°C con diferentes cantidades del lisado celular de mastocitos de médula ósea de ratones 6+/7-, hervido y sin hervir.

Se utilizó el método espectrofotométrico de Svendsen y colaboradores (109) para cuantificar los niveles de mMCP-6 enzimáticamente activa en cada lisado celular. Para estos experimentos, las muestras de lisados de mastocitos de médula ósea de ratones 6+/7- se pusieron en un tampón del ensayo (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5) que contenía tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA 0.5 mM. Tras 5-15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se determinó el cambio en la densidad óptica a 405 nm. La cantidad de mMCP-6 enzimáticamente activa en cada lisado celular se calculó utilizando una curva estándar basada en cantidades conocidas de tripsina pancreática.

Las muestras de fibrinógeno de ratón tratadas con el lisado celular resultantes se pusieron en un volumen igual de tampón de SDS-PAGE 2x con β -mercaptoetanol y se sometieron a SDS-PAGE. La visualización de los fragmentos del fibrinógeno de ratón creados por los complejos mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina en los lisados celulares se consiguió mediante tinción con azul de Coomassie.

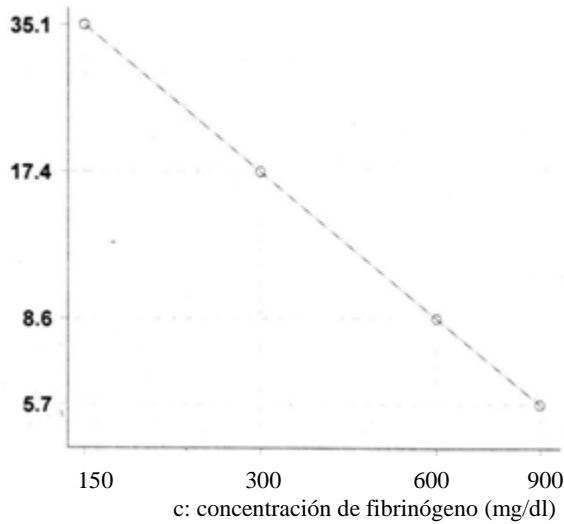
5. *Actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina in vitro—*

Para evaluar la actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina, así como de la misma preparación de heparina utilizada para crear estos complejos, se utilizó un ensayo estándar de fibrinogenólisis (113).

Este ensayo se basa en el principio de que, en presencia de un exceso de trombina, el tiempo de coagulación de una muestra de plasma es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno en dicha muestra. El aparato se calibra midiendo el tiempo de coagulación de muestras con concentraciones conocidas de fibrinógeno, creando así una curva estándar tiempo de coagulación/concentración de fibrinógeno. De esta curva es posible extrapolar la concentración de fibrinógeno a medir de una muestra de plasma, a partir del tiempo de coagulación medido por el fibrómetro (Fig. 12). El coágulo es medido por el aparato STA-R Evolution, que es un instrumento automatizado que utiliza un sistema de detección de viscosidad electromagnético. El aparato monitoriza la oscilación de una bola de acero dentro de una cubeta con la trombina y la muestra de plasma. Al aumentar la viscosidad como resultado de la

coagulación, la amplitud de la oscilación de bola disminuye. Un algoritmo utiliza estas variaciones en la amplitud de la oscilación para determinar el tiempo de coagulación.

t: tiempo de coagulación (sg)



$$\text{Log}(c) = (- 0.9839 \cdot \text{Log}(t)) + 3.6967$$

| Concetración de fibrinógeno | Tiempo de coagulación |
|-----------------------------|-----------------------|
| 150 mg/dl | 35,1 sg |
| 300 mg/dl | 17,4 sg |
| 600 mg/dl | 8,6 sg |
| 900 mg/dl | 5,7 sg |

Figura 12. Curva estándar de un ensayo de fibrinogenólisis. Se obtiene la concentración de fibrinógeno de una muestra de plasma a partir del tiempo de coagulación medido por el fibrómetro. El valor se extrapola de una curva estándar obtenida de los tiempos de coagulación medidos para muestras con concentraciones conocidas de fibrinógeno.

Para estos ensayos, se incubó plasma humano extraído en tubos de citrato sódico (100 μ l por ensayo), durante 30-60 minutos, a 37°C, con heparina sola (100 μ g) o con complejos recombinantes triptasa humana- β • (3.3 and 6.6 μ g) o mMCP-6•heparina (10 μ g). Se determinó entonces mediante el fibrómetro, el tiempo requerido por la trombina para coagular las muestras en relación con el de las muestras de plasma no tratadas.

6. *Reacción de Anafilaxia Cutánea Pasiva (ACP) en ratones mMCP-6+/mMCP-7- y ratones mMCP-6-/mMCP-7- B6 y estudio inmunohistoquímico de la formación de depósitos tisulares de fibrina—*

La reacción de ACP se realizó en 12 ratones 6+/7- y 6-/7- raza B6, según se ha descrito (2), previa aprobación por “The Dana-Farber Animal Care and Use Committee” del protocolo para animales 10-054, "Mast Cell-dependent Passive Cutaneous Anaphylaxis". Se realizó una inyección intradérmica, en una de las orejas de cada ratón, de 100 ng de IgE anti-2,4-dinitrofenol (DNP) (Sigma-Aldrich) disueltos en 20 μ l de PBS. En la otra oreja se inyectó PBS como control negativo. Dos días después, se inyectó en la vena de la cola de cada ratón sensibilizado previamente, 20 o 100 μ g del antígeno DNP-albúmina sérica humana (Sigma-Aldrich) diluidos en 200 μ l de PBS. Los animales fueron sacrificados 1 o 6 horas después. Se recogieron las orejas y se pusieron en compuesto para corte a temperatura óptima Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA), que proporciona una matriz adecuada para secciones criostáticas, y se congelaron en isopentano mezclado con hielo seco. Se conservaron a -70°C hasta que se realizó el análisis. Para el estudio inmunohistoquímico, se tomaron secciones congeladas de 5- μ m que se secaron con aire durante 30 minutos a temperatura ambiente, se rehidrataron con PBS, y se incubaron durante 1 hora a 37°C con tres tinciones diferentes: una solución

que contenía Rojo Texas conjugado con avidina (Invitrogen) para marcar la heparina, un anticuerpo IgG de cabra anti-fibrinógeno/fibrina de ratón marcado con fluoresceína (Nordic Immunology, Eindhoven, The Netherlands) para evaluar depósitos de fibrina, y Hoechst 33342 (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA) para marcar el núcleo celular. Las secciones, que fueron analizadas sin conocer a qué ratón pertenecían cada una, se vieron con un microscopio Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY). Se hicieron fotografías con una cámara digital Hamamatsu C10800 y con el software HC Image 1.1.3.1 (Hamamatsu Corp., Bridgewater, NJ).



RESULTADOS



1. *Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno humano por los complejos triptasa humana- β -heparina. Análisis mediante SDS-PAGE e Inmunoblot en presencia y ausencia de los inhibidores de proteasas presentes en el suero—*

Previamente se ha demostrado que la cadena α del fibrinógeno humano y de ratón es altamente susceptible a la triptasa mMCP-7 natural y recombinante, *in vitro* e *in vivo* (49). En este estudio, se descubre que la cadena α del fibrinógeno humano también se rompe de forma preferencial cuando esta proteína plasmática se expone *in vitro*, a pH neutro, al complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (Fig. 13), tanto con diferentes ratio substrato: enzima, como cuando se expone al complejo durante diferentes periodos de tiempo (Figs. 14, 15).

Los productos de digestión del fibrinógeno humano resultantes fueron evaluados por SDS-PAGE en presencia (Figs. 13-15) y ausencia (Fig. 16) de β -mercaptoetanol. El fragmento generado de la cadena α de tamaño ligeramente menor que la cadena nativa (Fig. 13, 14, 16A), indica que la ruptura preferencial ocurre cerca de uno de los extremos N y/o C-terminal de la cadena. El anticuerpo de conejo ab83477 reconoce un péptido sintético de 50 aminoácidos en el dominio C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano de 644 aminoácidos (Fig. 17). Como era de esperar, el fibrinógeno humano no tratado era reconocido por este anticuerpo y la pérdida de inmunoreactividad que ocurre tras la exposición del fibrinógeno humano al complejo triptasa humana- β -heparina, indica que la ruptura se produce en algún sitio en la porción C-terminal de la cadena α de la proteína (Fig.16B). Paralelamente aparece una banda de 7-kDa inmunoreactiva que se corresponde con el péptido liberado de la cadena α . Sin embargo, su cantidad varía de un experimento a otro, posiblemente porque la triptasa humana- β

también rompe en al menos otro sitio en este péptido, destruyendo así el antígeno reconocido por el anticuerpo.

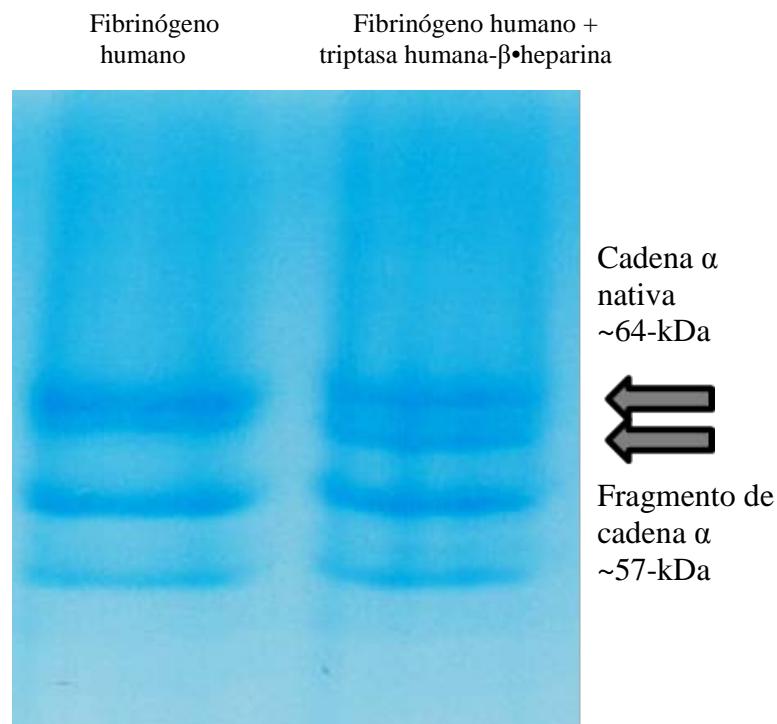


Figura 13. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana-β-heparina en presencia de β-mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE. Se incubó fibrinógeno humano con un complejo recombinante triptasa humana-β-heparina (ratio substrato:enzima ~500:1, a 37°C, 1 minuto), y el producto de esta digestión se analizó mediante SDS-PAGE en presencia de β-mercaptoetanol, para romper los puentes disulfuro intra e intercatenarios de la proteína. Se destaca la posición de la cadena α de la proteína nativa y su fragmento generado de un tamaño ligeramente menor.

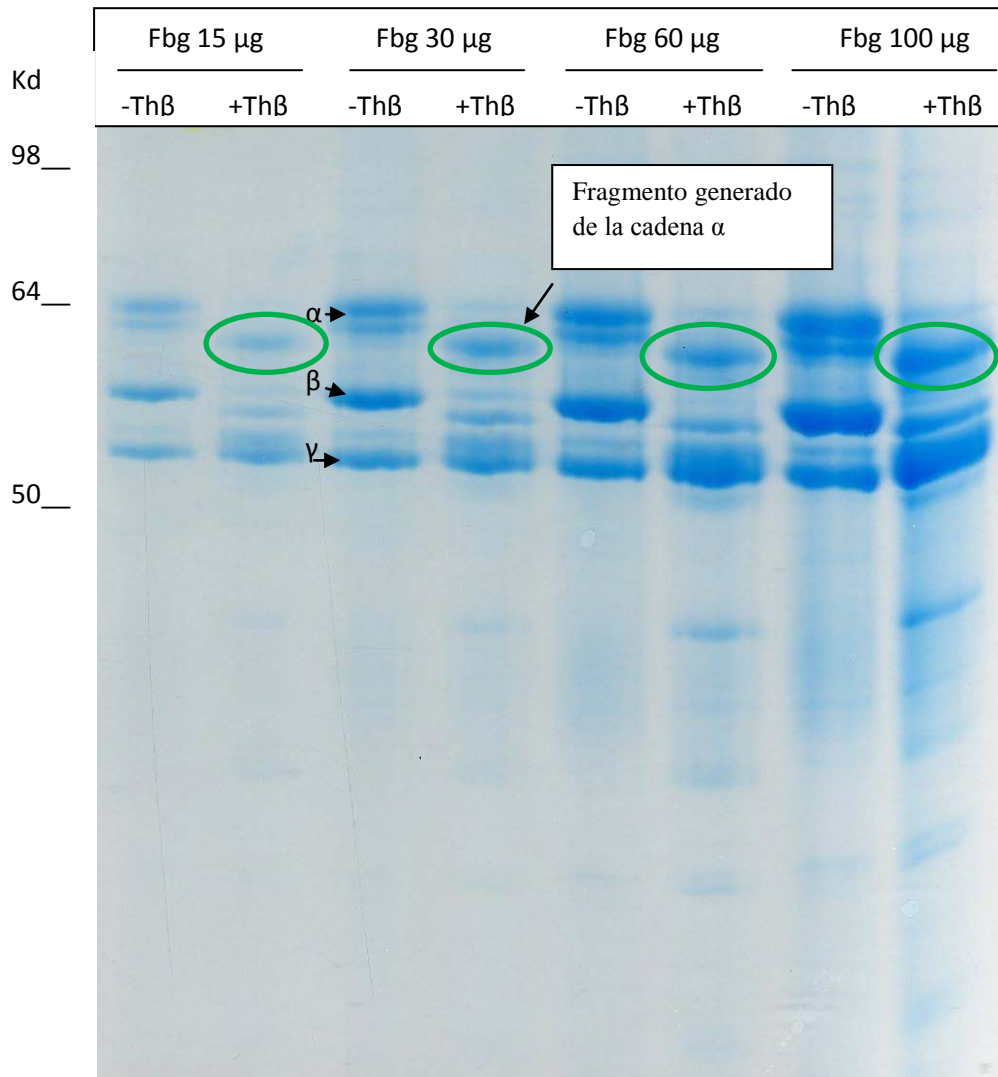


Figura 14. Proteólisis de diferentes cantidades de fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (Th β) en presencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE. Se muestra el fibrinógeno (Fbg) antes (-Th β) y después (+Th β) de su incubación con el enzima (0,4 μ g) para cada cantidad diferente de la proteína. Se destaca señalado con el círculo verde el fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno.

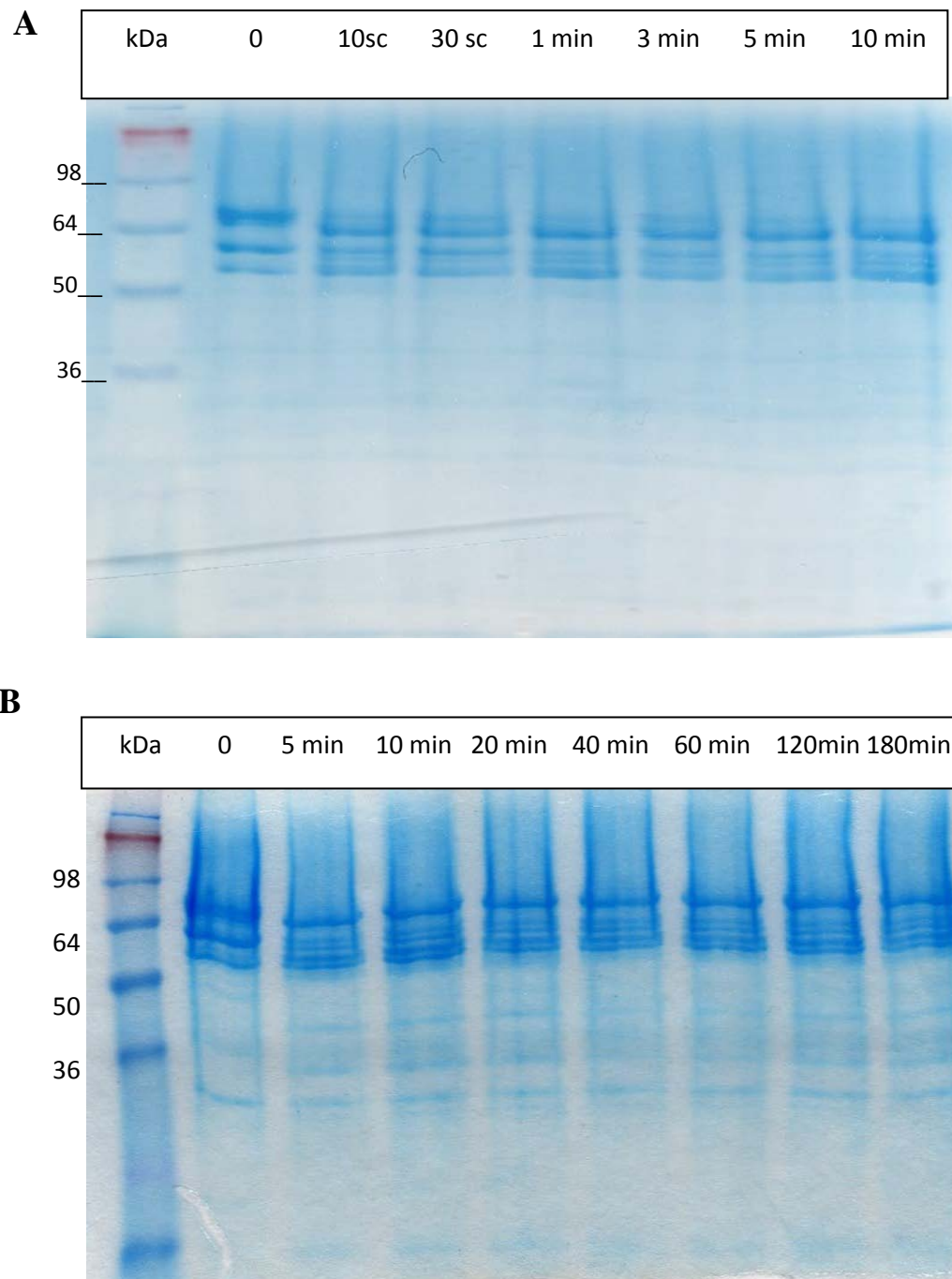


Figura 15. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en diferentes periodos de tiempo en presencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE. Se incubó fibrinógeno humano con el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en diferentes periodos de tiempo. Ratio substrato: enzima 250:1 (A) y 34:1 (B).

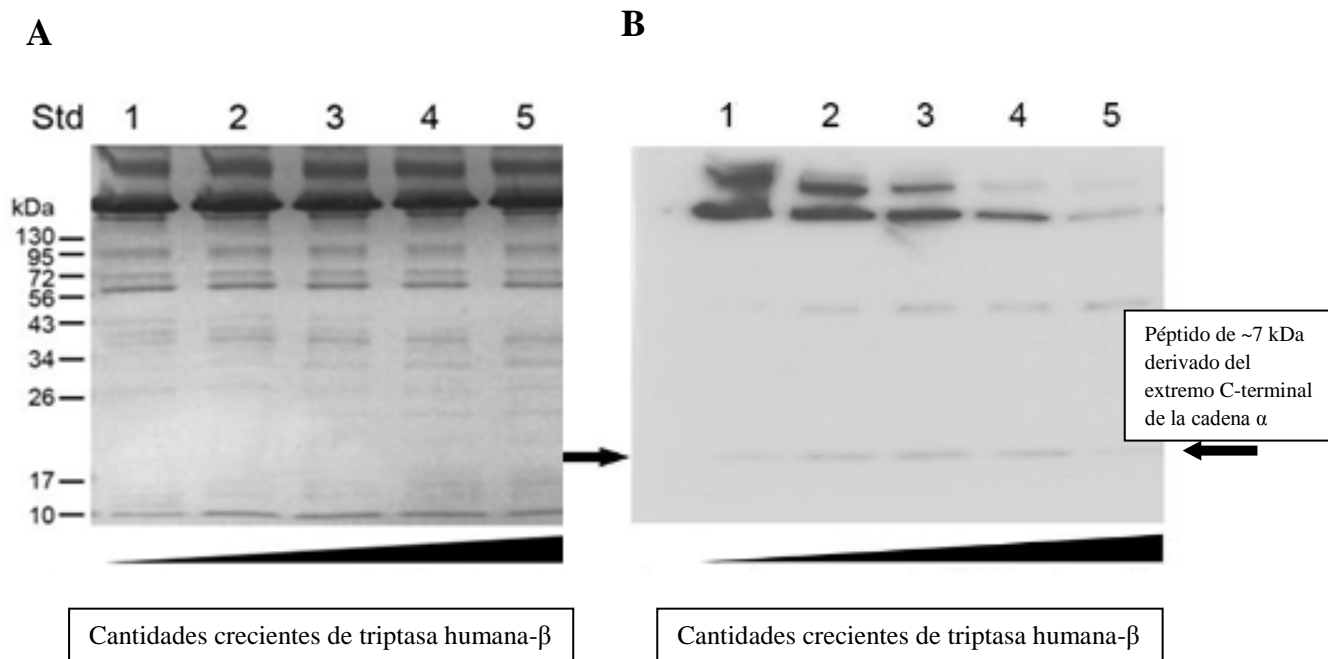


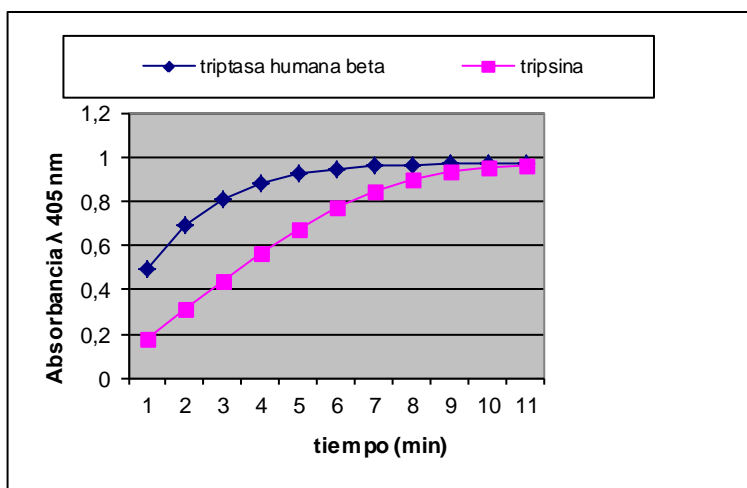
Figura 16. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en ausencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE e Inmunoblot. Se incubó fibrinógeno humano con cantidades crecientes del complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (con un ratio substrato:enzima 3.500:1 a 250:1, a 37°C, 10 min). A: SDS-PAGE. B: inmunoblot, utilizando el anticuerpo de conejo anti-fibrinógeno ab83477, que reconoce los residuos 576-625 del dominio C-terminal de la cadena α de la proteína. Como puede verse en A, el tamaño global del fibrinógeno humano apenas cambia cuando se incuba con el complejo triptasa humana- β -heparina porque la proteólisis se limita al extremo C-terminal de la cadena α . En concordancia con esta conclusión, la secuencia C-terminal de la cadena α reconocida por el anticuerpo se pierde rápidamente en la proteína tratada (B). Paralelamente aparece una banda de 7-kDa inmunoreactiva que se corresponde con el péptido liberado de la cadena α . Se observan dos bandas inmunoreactivas en la proteína no tratada (B, carril 1) que presumiblemente corresponden al monómero y el dímero del fibrinógeno humano.

1 mfsmrvclv lsvvgtawta dsgegdfiae gggvrgprvv erhqsackds dwpfcsdedw
61 nykpcsgcrm kglidevnqd ftnrinklkn slfeyqknnk dshslttnim eilrgdfssa
121 nnrtdntynrv sedlrsiev lkrkviekvq hiqlqknvr aqlvdmkrle vdidikirsc
181 rgscsralar evdlkdyedq qkqleqvial dllpsrdqrh lplikmkpvp dlvpgnfksq
241 lqkvpewka ltdmpqmrme lerpggneit rggstsytg setesprnps sagswngss
301 gpgstgnrnp gssgtgtat wkpqssgpgs tgswnsgssg tgstgnqnpq sprpgstgtw
361 npgssergsa ghwtseessvs gstgqwhses gsfrpdspps gnarpnnpdw gtfceevsgnv
421 spgtreyht eklvtskgdk elrtgkekvt sgstttrrs cskvtktvi gpdghkevtk
481 evvtsedgsd cpeamdlgtl sgigtldgr hrhpdeaaff dtastgkftp gffspmlgef
541 vsetesrgse sgiftntkes sshhpgiaef psrgkssys **kqftsstsyn rgdstfesks**
601 ykmadeagse adhegthstk rghaksrpvr gihtsplgkp slsp

Figura 17. Secuencia de 50 aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano reconocida por el anticuerpo anti-fibrinógeno ab83477 (Abcam). Se muestra la secuencia de la cadena α del fibrinógeno humano (FGA-isoforma A, número de acceso de “GenBank” NP_068657), en la que se destaca en color naranja la secuencia correspondiente a los residuos 576-625 de su extremo C-terminal, reconocida por el anticuerpo anti-fibrinógeno.

Para evaluar las posibles consecuencias de los inhibidores de proteasas circulantes en la sangre, se incubó fibrinógeno humano (15 μg) con tripsina (0.05 μg) o con el complejo recombinante triptasa humana- β •heparina (0.4 μg), antes y después de exponer estas enzimas a suero humano al 0,2 %.

Las cantidades de tripsina y triptasa humana- β utilizadas en estos experimentos eran equivalentes en su actividad enzimática, utilizando el método colorimétrico de Svendsen (109) en base a su capacidad para romper el sustrato tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA (Fig. 18).



| Tiempo (min) | Absorbancia Triptasa-β | Absorbancia Tripsina |
|--------------|------------------------|----------------------|
| 0 | 0,491 | 0,175 |
| 1 | 0,69 | 0,312 |
| 2 | 0,81 | 0,443 |
| 3 | 0,886 | 0,566 |
| 4 | 0,93 | 0,676 |
| 5 | 0,949 | 0,773 |
| 6 | 0,96 | 0,848 |
| 7 | 0,964 | 0,897 |
| 8 | 0,974 | 0,94 |
| 9 | 0,972 | 0,953 |
| 10 | 0,976 | 0,963 |

Triptasa humana-β: 2,2 μg/μL

Tripsina: 0,2 μg/μL

Δ_A triptasa: 0.886-0.69=0.196

Δ_A tripsina: 0.566-0.312=0.254

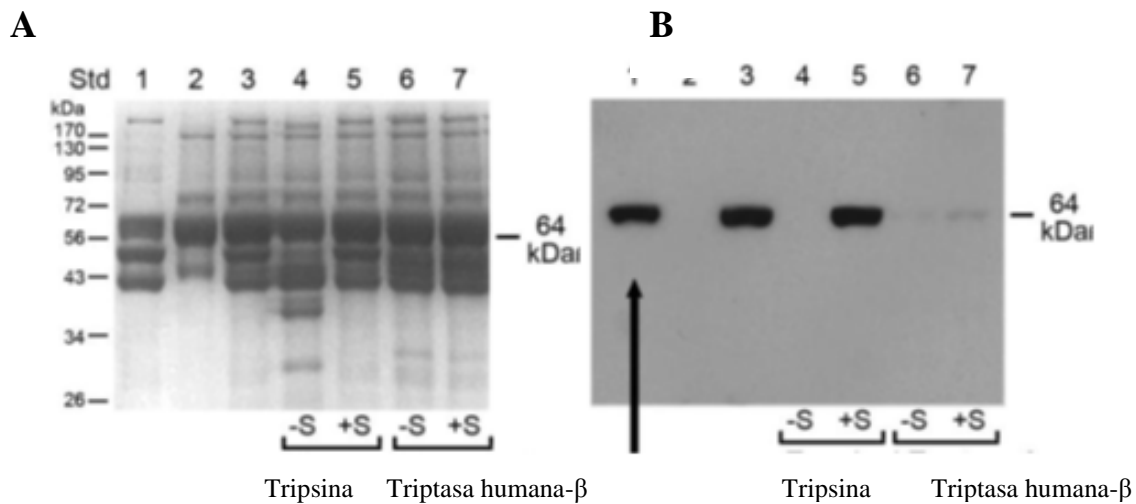
ΔA tripsina/ Δ_A triptasa: 0.254/0.196=1.3

1 μL triptasa humana-β ~ 1.3 μL tripsina

(actividad enzimática)

0,44 μg triptasa humana-β ~ 0,05 μg tripsina

Figura 18. Comparación de la actividad enzimática de las preparaciones utilizadas de tripsina y triptasa humana-β. Se utilizó un método colorimétrico basado en la capacidad para romper el sustrato cromogénico tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA. Se obtiene una curva de absorbancia medida a una λ de 405 nm para cada enzima, que permite comparar su actividad enzimática en base al incremento de la absorbancia entre dos tiempos determinados (109).



El extremo inmunoreactivo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano se pierde cuando se incubó con el complejo triptasa humana β -heparina en presencia o ausencia de suero (carriles 6 y 7)

Figura 19. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en presencia de los inhibidores de proteasas del suero humano. Se incubó fibrinógeno humano con tripsina (4 y 5) o con el complejo triptasa humana- β -heparina (6 y 7) en presencia (5 y 7) o ausencia (4 y 6) de suero humano al 0,2%. Los carriles 1, 2 y 3 contienen fibrinógeno humano, suero y ambos, respectivamente. Las muestras se sometieron a electroforesis en presencia de β -mercaptoetanol. Un gel (A) se tiñó con azul de Coomassie. En el duplicado (B), se realizó inmunoblot utilizando el anticuerpo anti-fibrinógeno ab83477.

La tripsina no puede digerir el fibrinógeno humano en presencia de suero debido a los inhibidores de proteasas que afectan negativamente a la actividad de esta serina proteína. En contraste, el fibrinógeno humano se mantiene susceptible a la triptasa- β cuando la reacción de digestión se lleva a cabo en presencia de suero porque no hay inhibidores de proteasas en el suero que inactiven rápidamente a esta proteasa del mastocito (Figura 19).

1. *Identificación del sitio de ruptura preferente de la cadena α de 1 fibrinógeno humano susceptible a los complejos triptasa humana- β -heparina, mediante espectrometría de masas en tándem y análisis de la secuencia C-terminal—*

El fragmento grande que se genera de la cadena α del fibrinógeno (Fig.20), después de 15 minutos o 1 minuto de incubación con el complejo triptasa humana- β -heparina, se purificó por SDS-PAGE y se analizó por MS/MS y análisis de la secuencia de aminoácidos C-terminal (Figs. 21 y 22 respectivamente).

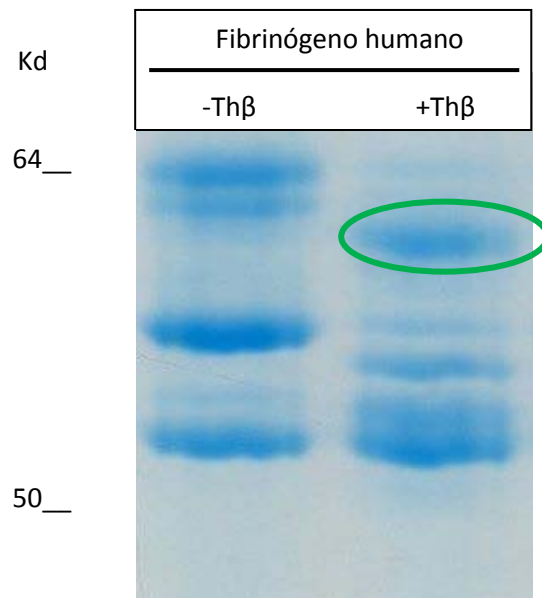


Figura 20. Purificación del fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno humano mediante SDS-PAGE. El círculo verde señala el fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno por acción del complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (ratio sustrato:enzima 75:1), que fue escindido para análisis por MS/MS y de la secuencia C-terminal.

A ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)

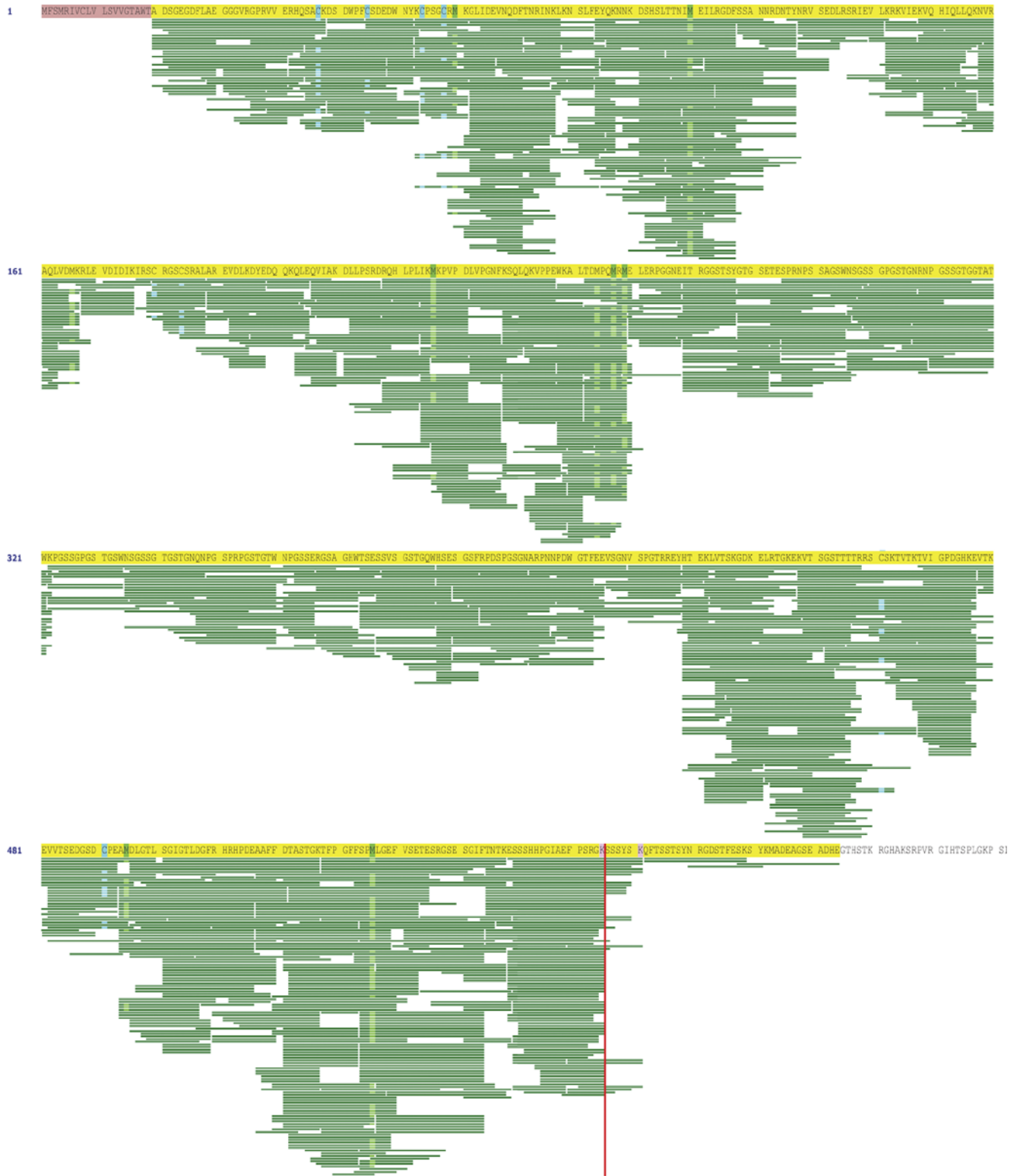
Sp|P02671|FIBA_HUMAN MS/MS Spectra: 242 Sum TIC: 6.9e7 Avg TIC: 2.9e5 Cov: 45.4% Uniq: 90
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
(P1) Sequence (count) Reference (+addnl) Σ TIC S_fmax Scans

(A) AFFDTASTGK (3) sp|p02671|fiba_human +2 3.2e5 0.92 6406-6456
(K) ALTDMPQM (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.3e4 0.14 5750
(K) ALTDMPQMR (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.4e4 0.43 2923
(K) ALTDMPQMRM (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.0e5 0.75 4533
(K) ALTDMPQMRM* (1) sp|p02671|fiba_human +2 3.2e4 0.83 4419
(K) ALTDMPQMRM (2) sp|p02671|fiba_human +2 3.2e4 0.42 8082-8149
(K) ALTDMPQMR (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.5e4 0.28 6534
(K) ALTDMPQMRM (2) sp|p02671|fiba_human +2 6.1e4 0.90 8415-8429
(K) ALTDMPQMRM* (1) sp|p02671|fiba_human +2 4.4e4 0.86 6443
(K) ALTDMPQMRMEL (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.0e4 0.87 10135
(K) CPSSGCRM*K (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.9e4 0.59 1440
(K) CPSSGCRM (2) sp|p02671|fiba_human +6 3.8e5 0.68 821-1840
(I) DEVNQDFTNRINK (1) sp|p02671|fiba_human +6 2.1e5 0.94 9173
(K) DLLPSRDRQHPLLIK (9) sp|p02671|fiba_human +2 2.5e6 0.53 6810-14877
(K) DSDWPF (1) sp|p02671|fiba_human +5 9.9e3 0.18 11027
(K) DSDWPFCSDEDWNYK (6) sp|p02671|fiba_human +4 1.1e6 0.98 10437-11491
(K) DSDWPFCSDEDWNYKCPSSGCRM (1) sp|p02671|fiba_human +4 2.8e4 0.59 8969
(K) DSHSLTTNIM*EILRGD (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.7e4 0.62 10742
(K) DSHSLTTNIM*EILRGDFS (2) sp|p02671|fiba_human +6 4.9e4 0.97 12316-12318
(K) DSHSLTTNIM*EILRGDFSSAN (2) sp|p02671|fiba_human +6 5.4e4 0.97 12041-12054
(K) DSHSLTTNIMEIL (1) sp|p02671|fiba_human +6 2.4e4 0.46 12278
(K) DSHSLTTNIMEILRG (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.1e4 0.94 11980
(K) DSHSLTTNIMEILRGDFS (2) sp|p02671|fiba_human +6 5.8e4 0.98 13469-13470
(K) DSHSLTTNIMEILRGDFSS (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.7e4 0.98 13310
(K) DSHSLTTNIMEILRGDFSSA (3) sp|p02671|fiba_human +6 5.0e4 0.96 13484-13486
(K) DSHSLTTNIMEILRGDFSSAN (2) sp|p02671|fiba_human +6 5.1e4 0.77 13172-13200
(K) DSHSLTTNIMEILRGDFSSANN (1) sp|p02671|fiba_human +5 6.3e3 0.95 13044
(K) DYEDQQK (2) sp|p02671|fiba_human +4 1.9e4 0.38 896-2018
(G) EGVSETESRGSSEGIFTNTK (2) sp|p02671|fiba_human +2 6.1e4 0.94 6738-6758
(K) ESSSHHPGIAEFPS (2) sp|p02671|fiba_human +2 7.1e4 0.67 5824-5826
(K) ESSSHHPGIAEFPSR (3) sp|p02671|fiba_human +2 2.9e5 0.89 4789-4813
(K) ESSSHHPGIAEFPSRG (2) sp|p02671|fiba_human +2 2.6e5 0.76 4788-4902
(K) ESSSHHPGIAEFPSRGK (14) sp|p02671|fiba_human +2 3.0e7 0.96 3705-5188
(K) ESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.3e4 0.58 3675
(K) EVVTSEDGSD (2) sp|p02671|fiba_human +2 9.8e3 0.51 2213-2572
(K) EVVTSEDGSDCPEAM (1) sp|p02671|fiba_human +2 6.0e4 0.95 5589
(K) EVVTSEDGSDCPEAMDLGTL (1) sp|p02671|fiba_human +2 7.8e3 0.89 8789
(F) FDTASTGK (1) sp|p02671|fiba_human +2 9.1e4 0.44 6447
(F) FSPM*LGEFVSETESRGSSEGIFTNTK (2) sp|p02671|fiba_human +2 9.2e4 0.73 10004-10053
(K) GLIDEVNQDFTN (2) sp|p02671|fiba_human +6 1.9e4 0.88 9112-9142
(K) GLIDEVNQDFTNR (2) sp|p02671|fiba_human +6 2.8e4 0.96 8993-9066
(K) GLIDEVNQDFTNRIN (4) sp|p02671|fiba_human +6 5.7e4 0.91 9707-10168
(K) GLIDEVNQDFTNRINK (14) sp|p02671|fiba_human +6 6.0e6 0.93 7837-14923
(K) GLIDEVNQDFTNRINKLK (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.7e4 0.27 10081
(R) GPRVVERHQSACK (2) sp|p02671|fiba_human +5 1.3e5 0.68 792-793
(R) GSESGIFTNTK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.9e5 0.85 5384
(A) GSWNSGSSGPGSTGNRNPSSGTTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.5e4 0.89 5148
(R) HPDEAAFFDTASTGK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.2e4 0.62 6857
(R) HRHPDEAAFFDTASTGK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.0e5 0.85 5577
(L) IDEVNQDFTNRINK (2) sp|p02671|fiba_human +6 3.7e5 0.93 9166-9174
(V) IGPDGHK (2) sp|p02671|fiba_human +2 8.0e5 0.33 1119-2518
(K) IRSCRGSCSR (1) sp|p02671|fiba_human +3 2.7e4 0.37 625
(M) KPVPDLVPGNFK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.4e4 0.79 7159
(M) LGEFVSETESRGSSEGIFTNTK (3) sp|p02671|fiba_human +2 2.5e5 0.98 7811-7873

(K) LKNSLFYQK (1) sp|p02671|fiba_human +6 1.4e4 0.91 6408
 (K) M*KPVPDLVPGNFK (8) sp|p02671|fiba_human +2 6.3e5 0.96 6737-8068
 (K) MADEAGSEADHEGTHSTK (1) sp|p02671|fiba_human +2 9.6e3 0.20 2321
 (K) MKPVPDLVPGN (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.2e4 0.66 7186
 (K) MKPVPDLVPGNFK (7) sp|p02671|fiba_human +2 5.5e5 0.85 7650-10035
 (K) MKPVPDLVPGNFKSQLQK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.7e4 0.38 7555
 (G) NRNPGSSGTGGTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 5.4e3 0.90 3195
 (W) NSGSSGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.1e4 0.35 3641
 (K) NSLFYQK (8) sp|p02671|fiba_human +6 1.9e5 0.88 6638-9985
 (K) NVRAQLVDM*K (5) sp|p02671|fiba_human +4 1.2e6 0.84 3456-5250
 (K) NVRAQLVDMK (8) sp|p02671|fiba_human +4 3.9e6 0.87 4890-6085
 (H) PDEAAFFDTASTGK (1) sp|p02671|fiba_human +2 5.3e4 0.91 7683
 (H) PGIAEFPSRGK (2) sp|p02671|fiba_human +2 7.9e4 0.93 3783-5216
 (K) PGSSGPGSTGSVNSGSSGTGGTGNQN (1) sp|p02671|fiba_human +1 3.9e3 0.95 4305
 (N) PGSSGTGGTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 3.3e4 0.90 3574
 (K) PVPDLVPGNFK (4) sp|p02671|fiba_human +2 1.3e5 0.86 8022-8665
 (K) QFTSSTSYNRGDSTFESK (2) sp|p02671|fiba_human +2 6.0e4 0.70 4984-5001
 (K) QLEQVIAK (4) sp|p02671|fiba_human +4 1.2e7 0.55 4733-6134
 (V) RAQLVDM*K (1) sp|p02671|fiba_human +4 1.4e5 0.61 3480
 (K) RLEVDIDIK (9) sp|p02671|fiba_human +4 6.0e5 0.76 7184-14872
 (N) RNPSSGTGGTATWK (2) sp|p02671|fiba_human +2 1.9e4 0.84 3133-3161
 (D) SDWPFCSDEDWNYK (1) sp|p02671|fiba_human +4 5.4e3 0.90 10246
 (V) SETESRGSESGIFTNTK (1) sp|p02671|fiba_human +2 4.5e3 0.35 13428
 (S) SGPSTGNRNPGSSGTGGTATWK (3) sp|p02671|fiba_human +2 6.9e4 0.97 3586-3609
 (N) SGSSGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.4e4 0.94 3618
 (S) SHHPGIAEFPSRGK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.4e4 0.75 3628
 (N) SLFEYQK (2) sp|p02671|fiba_human +6 1.0e5 0.81 6652-6653
 (E) SRGSESGIFTNTK (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.8e4 0.89 4369
 (G) SSGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWK (1) sp|p02671|fiba_human +2 3.1e3 0.66 3667
 (S) SSHHPGIAEFPSRGK (3) sp|p02671|fiba_human +2 1.1e5 0.92 3636-3653
 (K) TFPGFFSPM (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.6e5 0.10 12482
 (K) TFPGFFSPM*LGFEVSETESRGSESGIFTNTK (4) sp|p02671|fiba_human +2 3.1e5 0.19 12520-12932
 (K) TFPGFFSPMLGEFVSETESR (1) sp|p02671|fiba_human +2 3.0e5 0.97 13557
 (K) TFPGFFSPMLGEFVSETESRGSES (1) sp|p02671|fiba_human +2 8.4e4 0.95 13535
 (K) TFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESG (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.8e4 0.66 13524
 (K) TFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIFTN (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.1e4 0.41 13570
 (K) TFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIFTNTK (4) sp|p02671|fiba_human +2 8.5e4 0.92 12862-14857
 (S) TGNRNPGSSGTGGTATWK (2) sp|p02671|fiba_human +2 8.9e3 0.70 3270-3276
 (K) TVIGPDGHK (5) sp|p02671|fiba_human +2 2.5e6 0.54 1115-2532
 (K) TVIGPDGHKEVTK (2) sp|p02671|fiba_human +2 1.7e4 0.94 2679-2681
 (K) TVTKTVIGPDGHK (3) sp|p02671|fiba_human +2 4.8e4 0.94 2668-2703
 (K) TVTKTVIGPDGHKEVTK (2) sp|p02671|fiba_human +2 8.8e3 0.94 2860-2863
 (K) VIEKVQHIOQLLQK (2) sp|p02671|fiba_human +4 4.8e4 0.84 6006-6031
 (T) VIGPDGHK (2) sp|p02671|fiba_human +2 3.3e4 0.60 2364-2500
 (E) VNQDFTNRINK (2) sp|p02671|fiba_human +6 5.9e4 0.81 4256-9215
 (K) VPPEWK (2) sp|p02671|fiba_human +2 6.5e5 0.63 5132-5211
 (K) VQHIOQLLQK (2) sp|p02671|fiba_human +4 7.6e4 0.89 5874-6262

B

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA C-TERMINAL



Sequencia de la proteína

Espectro de péptidos identificados

A ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)

Sp|P02671|FIBA_HUMAN MS/MS Spectra: 94 Sum TIC: 3.3e6 Avg TIC: 3.6e4 Cov: 29.8% Uniq: 39
Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
(P1) Sequence (count) Reference (+addnl) Σ TIC S_{fmax} Scans

(T) ADSGEGDFLAEGGGVR (1) sp|p02671|fiba_human 1.6e4 0.92 7490
(A) AFFDTASTGK (1) sp|p02671|fiba_human 5.7e4 0.84 7003
(K) ALTDM*PQM*RM*E (1) sp|p02671|fiba_human 6.3e3 0.46 3766
(K) ALTDM*PQM*RME (1) sp|p02671|fiba_human 1.3e4 0.50 4880
(K) ALTDM*PQMRME (1) sp|p02671|fiba_human 3.7e4 0.86 6608
(K) ALTDMPQMRME (2) sp|p02671|fiba_human 4.5e4 0.88 8410-8442
(R) AQLVDMK (1) sp|p02671|fiba_human 1.9e4 0.42 5550
(K) CPSGCRM* (1) sp|p02671|fiba_human +2 5.9e3 0.71 623
(K) DSDWPFCSEDEDWNYK (1) sp|p02671|fiba_human 3.9e4 0.97 10701
(K) DSHSLTTN (1) sp|p02671|fiba_human 2.3e3 0.45 2706
(K) DYEDQOK (4) sp|p02671|fiba_human 5.0e4 0.71 2221-2723
(K) ESSSHHPGIA (1) sp|p02671|fiba_human 7.8e4 0.12 2736
(K) ESSSHHPGIAEFPSR (1) sp|p02671|fiba_human 1.6e4 0.44 5279
(K) ESSSHHPGIAEFPSRG (3) sp|p02671|fiba_human 2.5e5 0.87 5239-5359
(K) ESSSHHPGIAEFPSRGK (7) sp|p02671|fiba_human 3.3e5 0.85 4370-4963
(K) EVVTSED (1) sp|p02671|fiba_human 7.1e3 0.40 3297
(K) EVVTSEDG (1) sp|p02671|fiba_human 8.1e3 0.68 3364
(K) EVVTSEDGSDCPEAM*DL (2) sp|p02671|fiba_human 2.3e4 0.98 6890-6932
(K) EVVTSEDGSDCPEAM*DLGTL (2) sp|p02671|fiba_human 3.3e4 0.98 8573-8595
(K) EVVTSEDGSDCPEAM*DLGTLS (2) sp|p02671|fiba_human 4.9e4 0.97 7839-7857
(K) EVVTSEDGSDCPEAMD (1) sp|p02671|fiba_human 6.9e3 0.77 8485
(K) EVVTSEDGSDCPEAMD LGTL (3) sp|p02671|fiba_human 1.4e4 0.97 9837-9912
(K) EVVTSEDGSDCPEAMD LGTLS (1) sp|p02671|fiba_human 1.5e4 0.78 9157
(K) GLIDEVNQDFTN (1) sp|p02671|fiba_human 7.6e3 0.42 9469
(K) GLIDEVNQDFTNRIN (3) sp|p02671|fiba_human 1.1e4 0.81 9959-10345
(K) GLIDEVNQDFTNRINK (3) sp|p02671|fiba_human 1.8e5 0.92 8225-9567
(K) LVTSKGDK (2) sp|p02671|fiba_human +1 3.9e5 0.52 735-738
(K) M*ADEAGSEADHEGTHSTK (5) sp|p02671|fiba_human 1.7e5 0.87 765-2381
(K) M*KPVPDLVPGN (2) sp|p02671|fiba_human 7.3e4 0.41 6732-6841
(K) M*KPVPDLVPGNFK (4) sp|p02671|fiba_human 9.5e4 0.79 7137-7918
(K) MADEAGSEADHEGTHSTK (3) sp|p02671|fiba_human 4.9e4 0.86 2523-2732
(K) MKPVPDLVPGN (1) sp|p02671|fiba_human 5.1e4 0.30 7690
(K) MKPVPDLVPGNFK (3) sp|p02671|fiba_human 9.5e4 0.88 8076-8582
(K) NSLFEYQK (2) sp|p02671|fiba_human 3.7e4 0.61 7173-7189
(K) NVRAQLVDM*K (2) sp|p02671|fiba_human 3.3e4 0.63 4023-4350
(K) NVRAQLVDMK (2) sp|p02671|fiba_human 2.5e5 0.88 5761-5787
(V) PDLVPGNFK (4) sp|p02671|fiba_human 7.7e4 0.44 7758-9099
(K) PVPDLVPGNFK (4) sp|p02671|fiba_human 6.3e4 0.69 7691-9059
(K) QFTSSTS YNRGDSTFES (1) sp|p02671|fiba_human 1.5e4 0.94 6247
(K) QFTSSTS YNRGDSTFESK (1) sp|p02671|fiba_human 2.0e4 0.84 5424
(K) QLEQVIAK (1) sp|p02671|fiba_human +1 2.3e4 0.17 5254
(K) RLEVDIDIK (1) sp|p02671|fiba_human +3 3.7e4 0.54 7983
(N) SLFEYQK (1) sp|p02671|fiba_human 2.0e5 0.69 7210
(K) TFPGFFSPM* (1) sp|p02671|fiba_human 4.4e3 0.11 10772
(K) TFPGFFSPM*LG (1) sp|p02671|fiba_human 2.1e3 0.34 11547
(K) TFPGFFSPM*LGEF (2) sp|p02671|fiba_human 3.1e4 0.94 12184-12186
(K) VPPEWK (1) sp|p02671|fiba_human +5 2.3e5 0.39 5930
(K) VOHIQLLQK (1) sp|p02671|fiba_human 3.5e4 0.41 6009
(R) VVERHQSAK (2) sp|p02671|fiba_human 3.8e4 0.89 657-658

B ANÁLISIS DE LA SECUENCIA C-TERMINAL



Secuencia de la proteína

Espectro de péptidos identificados

C Fibrinógeno humano α (FGA-isoforma A, número de acceso de “GenBank” NP_068657)

```

      *           *           *           *
mfsmrivclvlsvvgtawtadsgegdflaeggvrpprvverhqsackdsdwpfcsdedwnykc
      *           **          *
psgcrmkglidevnqdftrinklknslfeyqknkdshslttnimeilrgdfssannrdntyn
      *           *           *           *
rvsedlrsrievlkrkviekvghiqlqknvraqldvdkrlevdidikirscrgscsralarev
      *           *           * * *           *           *
dlkdyedqqkqlleqviakdllpsrdrqhlplikmkpvpdlvpgnfksqlqkvppewkaldmpq

mrmelerpggneitrggstsygtgsetesprnpssagswngsgsgpgstggnrnpssgtggtat

wkpgssgpgstgswngsgsgtgstgnqnpgsprpgstgtwnpgssergsaghwtseessvsgstg
      *
qwhsesgsfrpdsppsgnarpnnpdwgtfeevsgnvspgtrreyhteklvtskgdkelrtgkek
      *
vtsgstttrrrscsktvtktvigpdghkevtkevvtsegdscpeamdlgtlsgigtldgfrhr
      *           *           *
hpdeaaffdtastgktfpgffspmlgefvssetesrgsesgiftntkessshhpgiaefpsrgKs
      *           *
Ssyskqftsstsynrgdstfesksykmadeagseadhegthstkrghaksrpvrgihtsplgkp

```

Lys575 

Figura 22. Análisis MS/MS y de la secuencia de aminoácidos C-terminal del fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno humano tras su incubación con el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina durante 1 minuto. Se muestran todos los péptidos obtenidos en el análisis por MS/MS (A). En el análisis de la secuencia C-terminal (B), aunque se mapeó el fragmento completo, se muestra sólo la región C terminal hasta el residuo 481 para mayor claridad. La línea vertical roja señala el residuo **Lys575**, que es el sitio de ruptura preferente por el complejo triptasa humana- β -heparina. En C se representan los resultados del análisis MS/MS sobre la secuencia de aminoácidos de la cadena del fibrinógeno. En **rosa** se muestra el péptido señal y en **amarillo**, la secuencia del fibrinopéptido A. El extremo N terminal de cada péptido obtenido del análisis MS/MS se indica con un asterisco, en **verde (*)** los situados en posición proximal a **K575**, sitio de ruptura preferente, y en **rojo (*)** los situados en posición C-terminal con respecto a este residuo. La secuencia C-terminal ausente en el análisis de MS/MS se señala en **rosa**.

Como muestra la figura 21, en el análisis por MS/MS del fragmento de la cadena α , obtenido tras 15 minutos de incubación del fibrinógeno humano con el complejo triptasa humana- β •heparina, la mayoría de los péptidos obtenidos residen en posición N-terminal con respecto al residuo K575, y sólo se detectan dos péptidos en posición C-terminal con respecto a este residuo. Muchos de los péptidos se aislaron más de una vez. Por ejemplo, el péptido GLIDEVNQDFTN en posición N-terminal a K575 se aisló 23 veces, mientras que los péptidos QFTSSTSYNRGDSTFESK y MADEAGSEADHEGTHSTK, localizados en situación C-terminal a K575, se aislaron 2 y 1 vez, respectivamente. Los datos del análisis de la secuencia C-terminal revelan que el sitio preferente de ruptura de la triptasa humana- β en la cadena α del fibrinógeno humano es Lys575, un aminoácido que concuerda con la especificidad de sustrato de la triptasa humana- β .

La figura 22 muestra el análisis por MS/MS y de la secuencia C-terminal del fragmento de la cadena α , obtenido tras 1 minuto de incubación del fibrinógeno humano con el complejo triptasa humana- β •heparina. En este caso se obtienen 22 péptidos cuyas secuencias C-terminales terminan en K575. De nuevo se obtienen muchos menos péptidos en posición C-terminal a K575, aunque más que en el análisis anterior del fragmento obtenido tras 15 minutos de incubación del sustrato con el enzima. La presencia de estos péptidos podría deberse a una ruptura incompleta del fibrinógeno por el complejo triptasa humana- β •heparina, de manera que derivasen de fibrinógeno no digerido presente en la muestra. Sin embargo, en el análisis no se identifica ningún péptido que contenga la secuencia C-terminal de la cadena **rghaksrpvrgihtsplgkp**. Este péptido debería haberse aislado si parte del fibrinógeno en el ensayo no hubiera sido digerido por la triptasa tras un periodo de incubación de 1 minuto. Es posible que la

presencia de estos péptidos en posición C-terminal a K575, se deba a que el complejo triptasa humana- β -heparina pueda romper el extremo C-terminal en algún otro sitio mas.

El péptido de ~7-kDa producto de la digestión del fibrinógeno humano con el complejo triptasa humana- β -heparina, visualizado en el análisis por SDS-PAGE e inmunoblot del producto de esta digestión, que es reconocido por el anticuerpo ab83477 (Fig. 16B), fue analizado también mediante MS/MS. Para ello, los péptidos resultantes de la digestión se sometieron a filtración en una columna de filtración por centrifugación, seguido de concentración mediante precipitación en ácido tricloroacético, y análisis por SDS-PAGE. El péptido de 7 kDa purificado se sometió a digestión enzimática exhaustiva y los péptidos resultantes al análisis MS/MS. El análisis MS/MS de este péptido purificado confirma que deriva del extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano (Fig. 23).

A ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)

Ssp|P02671|FIBA_HUMAN MS/MS Spectra: 10 Sum TIC: 1.1e6 Avg TIC: 1.1e5 Cov: 6.4% Uniq: 7
 Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA PE=1 SV=2
 (P1) Sequence (count) Reference (+addnl) Σ TIC Sf_{max} Scans
 (R) GDSTFESK (2) sp|p02671|fiba_human +2 9.0e5 0.81 1356-3190
 (R) GDSTFESKSYK (1) sp|p02671|fiba_human +2 2.4e3 0.50 3489
 (R) GGSTSYGTGETESPR (1) sp|p02671|fiba_human +2 1.3e5 0.97 1358
 (K) M*ADEAGSEADHEGTHSTK (2) sp|p02671|fiba_human +2 2.0e4 0.93 1268-2884
 (K) QFTSSTSYNRGDSTFESK (2) sp|p02671|fiba_human +2 1.2e4 0.63 4475-4477
 (N) RGDSTFESK (1) sp|p02671|fiba_human +2 7.8e3 0.68 1323
 (K) SYKM*ADEAGSEADHEGTHSTK (1) sp|p02671|fiba_human +2 7.4e3 0.57 3099

B Fibrinógeno humano α (FGA-isoforma A, número de acceso de “GenBank” NP_068657)

mfsmrivclvlsvvgtaawtadsggegdfleaeggvrgprvverhqsackdsdwpfcscdedwnykc
 psgcrmkglidevnqdftrinklknslfeyqknkdshsltnimeilrgdfssannrdntyn
 rvsedlrsrievlkrkviekvqhiqllqknvraqvlvdmkrlevdidikirsrgscsralarev
 dlkdyedqqkqleqviakdllpsrdrqhlplikmkpvpdlvpgnfksqlqkvppewkaldmpq
 (1) *
 mrmelerpggnei|trggstsygtgsetesprnpssagswnsgssgpgstggnrnpngssgtggtat

 wkpgssgpgstgswngsgsgtgstgnqnpgsprpgstgtwnpgssergsaghwtseessvsgstg
 qwhsesgsfrpdspgsgnarpnnpdwgtfeevsgnvspgtrreyhteklvtskgdkelrtgkek
 vtsgstttrrscsktvtktvigpdghkevvtkevvtse^{K⁵⁷⁵}gdscpeamdltlsgigtldgfrhr
 hpdeaaffdtastgktfpgffspmlgefvssetesrgsesgiftntkessshhpgiaefpsrgKs
 (2) * (1) ** (3) (1) * * (2)
 ssyskqftsstsynrgdstfesksykmadeagseadhegthstkrghaksrpvrgihtsplgkp
 slsp

Figura 23. Análisis por MS/MS del péptido de ~7-kDa producto de la digestión del fibrinógeno humano por el complejo triptasa humana-β-heparina. Se muestran todos los péptidos obtenidos en el análisis por MS/MS (A). En el esquema se identifican los péptidos obtenidos sobre la secuencia de la cadena α del fibrinógeno humano (B). Nueve de los diez péptidos obtenidos residen en la secuencia de 69 aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena α de la proteína, en posición distal a K575.

Los datos obtenidos revelan que el extremo N-terminal de la cadena α del fibrinógeno no es susceptible a la triptasa. En contraste, la ruptura ocurre de forma preferente en el residuo Lys575 que reside a 69 amino ácidos del extremo C-terminal de la cadena α . Este hallazgo está apoyado por el hecho de que se vea un péptido de ~7 - kDa en el análisis por SDS-PAGE e inmunoblot del producto de esta digestión, que es reconocido por el anticuerpo ab83477 (Fig. 16B). El análisis por MS/MS de este péptido purificado confirma que deriva del extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano (Fig. 23). A pesar de estos hallazgos, se encontraron más péptidos que corresponden a los residuos 576-625 de la cadena α en el producto de la digestión de la muestra de fibrinógeno humano incubada con el complejo triptasa humana- β -heparina durante 1 minuto (Fig. 22) que en la muestra incubada durante 15 minutos (Fig. 21). Además, la mayor parte de la inmunoreactividad vista en la proteína intacta se pierde rápidamente cuando el fibrinógeno humano se incuba con el complejo triptasa humana- β -heparina durante 15 minutos o más (Figs. 16B y 19B). Todos estos datos, indican que el extremo C-terminal de 69 aminoácidos de la cadena α del fibrinógeno se rompe rápidamente en la posición Lys575 y en al menos otro sitio más.

2. *Proteólisis preferencial de la cadena α del fibrinógeno de ratón por los complejos triptasa humana- β y mMCP-6•heparina—*

Cuando Thomas y colaboradores (106) publicaron que la cadena α del fibrinógeno humano era altamente susceptible a un complejo no definido triptasa humana- β -heparina, purificado de biopsias de pulmón humano en su estudio *in vitro*, estos investigadores concluyeron que la proteólisis ocurría de forma preferente en el residuo Arg591. Como puede verse en la figura 24, Arg591 reside en una secuencia de

14 aminoácidos que no está presente en la cadena α del fibrinógeno de ratón. Es posible que la preparación de pulmón humano utilizada en el estudio de Thomas *et al.* de 1998 contuviera una isoforma alélica o una variante de ensamblaje de triptasa humana- β que tuviera una especificidad de sustrato nueva. Sin embargo, si la proteólisis ocurriera en la mayoría de los humanos en esta secuencia de aminoácidos no conservada, la cadena α del fibrinógeno de ratón no se rompería de forma eficiente por la triptasa humana- β o su ortólogo murino mMCP-6 unidas iónicamente a heparina. Sin embargo, tal como muestra el análisis por SDS-PAGE e inmunoblot, el fibrinógeno de ratón no solo se rompe rápidamente por la triptasa humana- β recombinante generada en levaduras (Fig. 25 y 26), sino también por la triptasa humana- β y la triptasa mMCP-6 recombinantes generadas en células de insectos (Fig. 27). Los complejos recombinantes mMCP-6•heparina también rompieron el fibrinógeno en presencia de los inhibidores de proteasas de suero humano al 0,2%.


```

1   MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADS-GEGLFLAEGGGVVRGPRVVERHQSACKDSWPFCSDED 59
    M S+R+ CL+LSV T WT D+ +G+FL+EGGGVVRGPRVVERHQS CKDSWPFCSD+D
1   MLSLRVTCLILSVASTVWTTDTEDKGEFLSEGGGVVRGPRVVERHQSQCCKDSWPFCSDDD 60

60  WNYKCPSGCRMKGLIDEVNDQFTNRINKLKNLSLFEYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDFSS 119
    WN+KCPSGCRMKGLIDE NQDFTNRINKLKNLSL++Q+NNKDS+SLT NIME LRGDF++
61  WNHKCPSGCRMKGLIDEANQDFTNRINKLKNLSLDFQQRNNKDSNSLTRNIMEYLRGDFAN 120

120 ANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVKIEKVQHIQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKIRS 179
    ANN DNTY +VSEDLR RIE+L+RKVIEK Q IQ LQ NVRAQL+DMKRLEVDIDIKIRS
121 ANNFDNTYGVQVSEDLRRRIEILRRKVKIEKAQQIQALQSNVRAQLIDMKRLEVDIDIKIRS 180

180 CRGSCSRALAREVDLKDYEDQKQLEQVIKADLLPSRDRQHPLIKMKPVPDLVPGNFKS 239
    C+GSCSRA+ RE++L+DYE QKQL+QVIK+LLP++DRQ+LP +KM PVPDLVPG+FKS
181 CKGSCSRAVNREINLQDYEGHQKQLQQVIKELLPTKDRQYLPALKMSPVPDLVPGSFKS 240

240 QLQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTSYGTGSETESPRNPSSAGSWNSGS 299
    QLQ+ PPEWKALT+M QMRMELERPG + +RG +SP + + +
241 QLQEAPPEWKALTEMRQMRMELERPGKDGGSRG-----DSPGDSRGDSRGDFAT 289

300 SGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWKPGSSGPGSTGWSNSGSSGTGSGTGNQNPSPRGSTGT 359
    GPGS P + GPG +G W G+SG+GS GN+N PG+TG
290 RGPGSKAE-----NPTNPGPGSGYWRPNSGSGSDGNRN-----PGTTG- 329

360 WNPSSSERGSAGHWTSESSVSGSTGQWHSESGSFRPDSPGSGNARPNNPDWGTFFEEVSGN 419
    S TG W +GS RP S SGN RP NP+WG F E +
330 -----SDGTGDWG--TGSPRPGSD-SGNFRPANPNWGVFSEFGDS 366

420 VSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEKVTSGSTTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVT 479
    SP TR+EYHT K VTSKGDKEL GKEKVT S T+TT RSCSKT+TKTV GPDG +EV
367 SSPATRKEYHTGKAVTSKGDKELLIGKEKVTSSGTSTTHRSCSKTITKTVTGPDGRREV 426

480 KEVVTSEDCSDCPEAMD LG-TLSGIGTLDFRHRHPDEAAFFDTASTGKTFPGFFSPMLG 538
    KEV+TS+DGSDC +A +L + S G+LD RHPD + FFD G SP
427 KEVITSDDGSDCGDATELDISHSFGSLDELSEHPDLGFFDNHF-----GLISPNFK 480
    *Lys575 *Arg591

539 EFVSETESRGSSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSPRGKSSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFES 598
    EF S+T S+S I TN ++ SSH P EF S K+S+ KQ T
481 EFGSKTH---SDSDILTNIEDPSSHVP---EFSSSSKtstVKKQVT----- 520

599 KSYKMADEAGSEADHEG-THSTKRGHAKSRPVR 630
    K+YKMADEAGSEA EG T +TKRG A++RP R
521 KTYKMADEAGSEAHREGETRNTKRGRARARPTR 553

```

Figura 24. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la cadena α del fibrinógeno humano (en rojo) (“GenBank”, número de acceso NP_068657) y el de ratón (en verde) (“GenBank” número de acceso NP_034326). En negro se muestran los aminoácidos de la secuencia comunes a ambas especies. El sitio de ruptura Lys575 en la cadena α del fibrinógeno en las dos especies es casi idéntico, mientras que el sitio de ruptura en el fibrinógeno humano propuesto por Thomas y colaboradores (Arg591), se encuentra en una secuencia de aminoácidos que está ausente en el fibrinógeno de ratón.

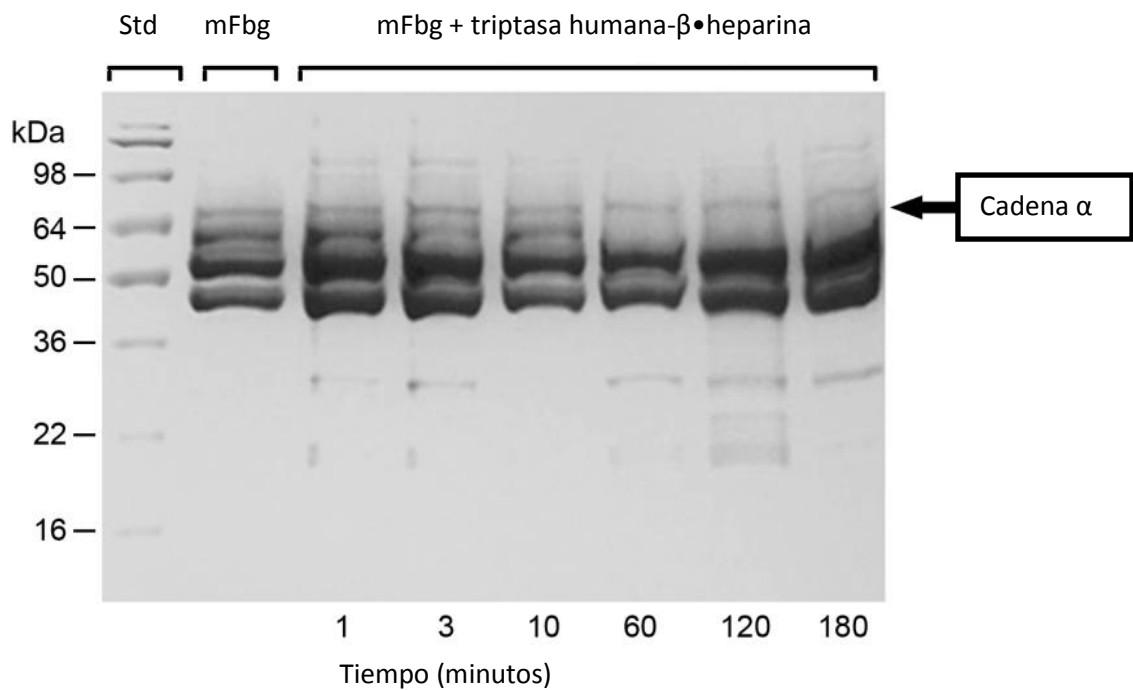


Figura 25. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a los complejos triptasa humana- β •heparina. Se incubó fibrinógeno de ratón (mFbg) con un complejo triptasa humana- β •heparina durante 1-180 minutos y la digestión resultante se sometió a SDS-PAGE. El gel mostrado se tiñó con azul de Coomassie. Como se muestra, la cadena α del fibrinógeno de ratón se rompe de forma preferente por el complejo triptasa humana- β •heparina.

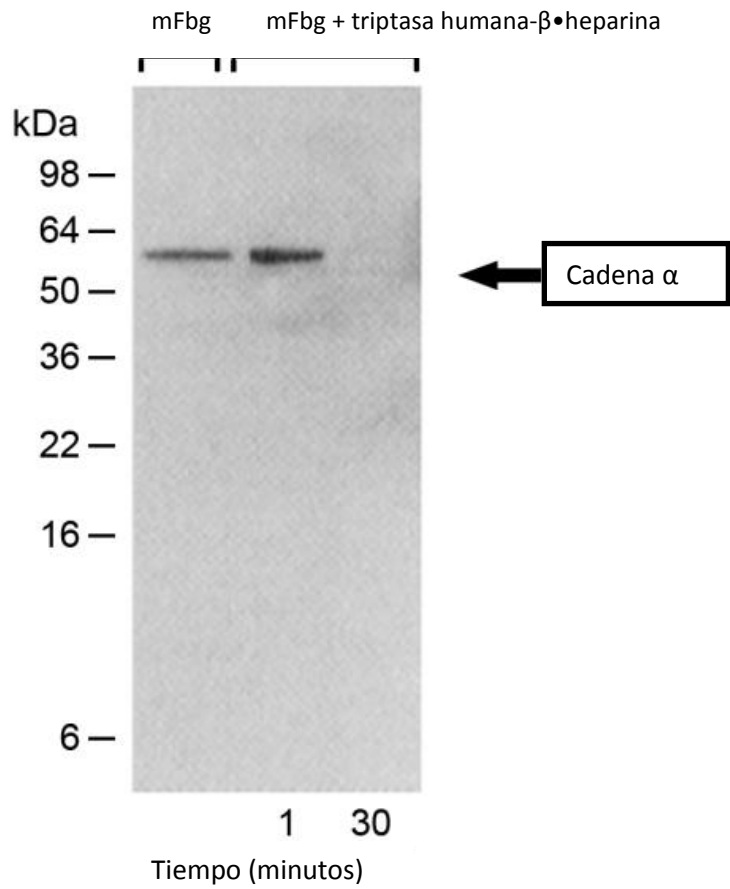


Figura 26. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a los complejos triptasa humana - β •heparina. Se preparó un SDS-PAGE/inmunoblot de fibrinógeno de ratón (mFbg) sin tratar o expuesto al complejo triptasa humana- β •heparina durante 1 o 30 minutos, utilizando el anticuerpo de conejo anti-fibrinógeno ab83477. Igual que ocurría cuando el fibrinógeno humano se incubaba con el complejo enzimático, (Fig. 19B), el antígeno en el extremo C-terminal del fibrinógeno de ratón reconocido por el anticuerpo se pierde rápidamente.

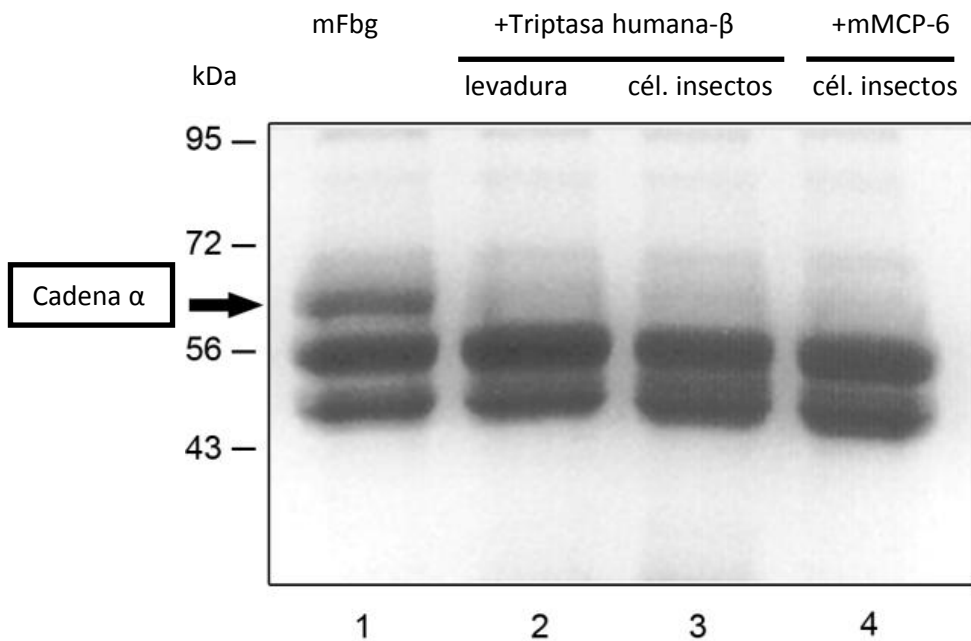


Figura 27. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a complejos recombinantes mMCP-6•heparina glicosaminoglicano. Se incubó fibrinógeno de ratón (mFbg) durante 10 minutos a 37°C en ausencia (carril 1) o presencia de complejos recombinantes triptasa humana- β •heparina (carriles 2, 3) o mMCP-6•heparina (carril 4). Las proteasas recombinantes utilizadas en este experimento fueron generadas en células de levaduras (carril 2) o de insectos (carriles 3 y 4), y el ratio sustrato:enzima era 30:1 o mayor. La cadena α del fibrinógeno de ratón está señalada. Como se obtienen datos similares si la triptasa recombinante se expresa en células de insectos o de levaduras, el factor activo en las preparaciones no es un contaminante que se origine en la célula en la que se expresa.

La triptasa humana- β y mMCP-6 se encuentran empaquetadas en los gránulos secretores de los mastocitos unidos iónicamente a proteoglicanos serina-glicina en lugar de glicosaminoglicanos. Además, ambas enzimas presentes en los mamíferos, contienen N-glicanos de tipo complejo. Las proteínas están glicosiladas de forma diferente en las células de mamíferos a las células de insectos y de levaduras. En los experimentos anteriores se utilizaron complejos recombinantes triptasa humana- β •glicosaminoglicano generados en células de insectos y levaduras, en lugar de complejos endógenos triptasa humana- β • y mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina de los mastocitos. Por eso, se evaluó si la cadena α del fibrinógeno de ratón era o no susceptible también a los complejos nativos mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina presentes en mastocitos de médula ósea de ratones mMCP-6+/mMCP-7- cultivados con IL-3/IL-33. La cadena α del fibrinógeno de ratón era partida rápidamente por una proteasa neutra sensible al calor presente en estas células, como ocurre con un complejo recombinante mMCP-6•heparina (Fig. 28).

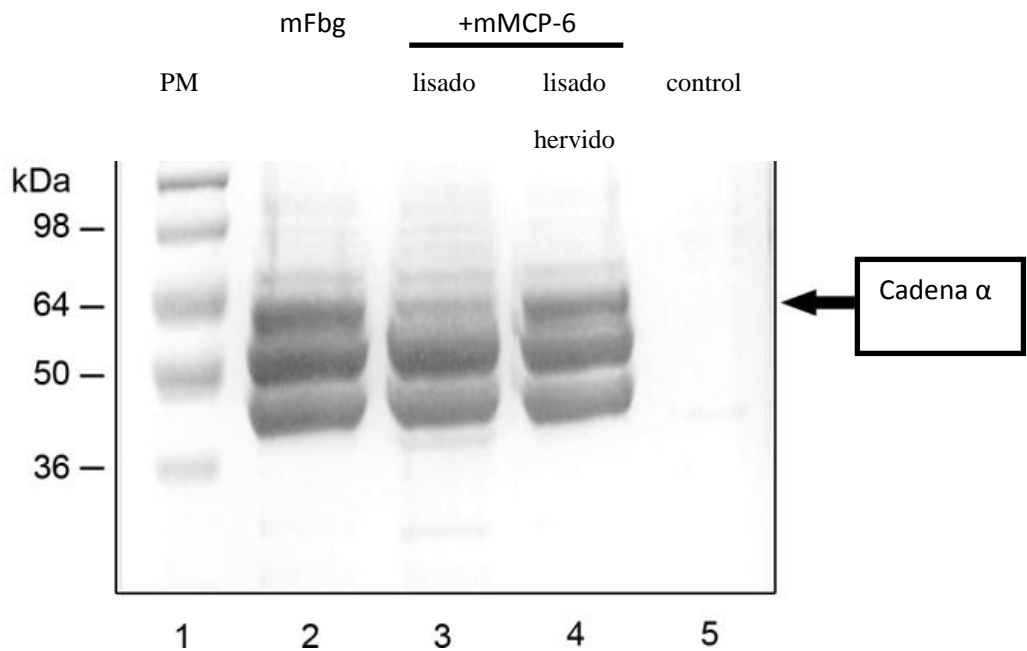


Figura 28. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a complejos naturales mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina. Se expuso fibrinógeno de ratón (carril 2) al lisado de mastocitos de médula ósea de ratón que contiene complejos naturales mMCP-6• proteoglicanos serina-glicina sin hervir (carril 3) y hervido (carril 4). Los marcadores de peso molecular se muestran en el carril 1. En el carril 5 se muestra la baja cantidad de proteína presente en el lisado utilizado en este experimento. La pérdida de la mayor parte de la cadena α del fibrinógeno en el carril 3 indica que esta proteína del plasma también es susceptible a la triptasa mMCP-6 natural.

3. *Actividad anticoagulante de los complejos mMCP-6• y triptasa humana-β•heparina in vitro—*

El hallazgo de que la cadena α del fibrinógeno de ratón y humano se rompa rápidamente por los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina *in vitro*, incluso si la reacción tiene lugar en presencia de inhibidores de proteasas del suero, sugiere la posibilidad de que estos mediadores de los gránulos de los mastocitos puedan impedir la coagulación del plasma mediada por la trombina. La medición por un fibrómetro del tiempo de coagulación de las muestras de plasma antes y después de su incubación con los complejos triptasa•heparina, reveló que el tiempo requerido por la trombina para coagular el plasma, se retrasaba de forma importante si las muestras de plasma se habían expuesto inicialmente a un complejo triptasa de ratón o humana•heparina (Fig. 29). Esta prolongación del tiempo de coagulación era muy superior al producido por la heparina a dosis de 100 μg , dosis muy superior a la presente en los complejos enzimáticos (0,5-4,5 μg).

Por tanto, se puede concluir que el factor anticoagulante activo de estos complejos es la triptasa en lugar de la heparina, ya que este glicosaminoglicano utilizado para crear los complejos tiene una actividad anticoagulante relativamente pobre a la dosis utilizada.

| | Fibrinógeno (mg/dl) | Tiempo coagulación (segundos) |
|--|---------------------|-------------------------------|
| Plasma (basal) | 235 | 22 |
| Plasma + triptasa h- β (6,6 μ g) | 60 | 89 |
| Plasma + triptasa h- β (3,3 μ g) | 74 | 72 |
| Plasma + mMCP-6 (10 μ g) | 92 | 58 |
| Plasma + heparina (100 μ g) | 199 | 26 |

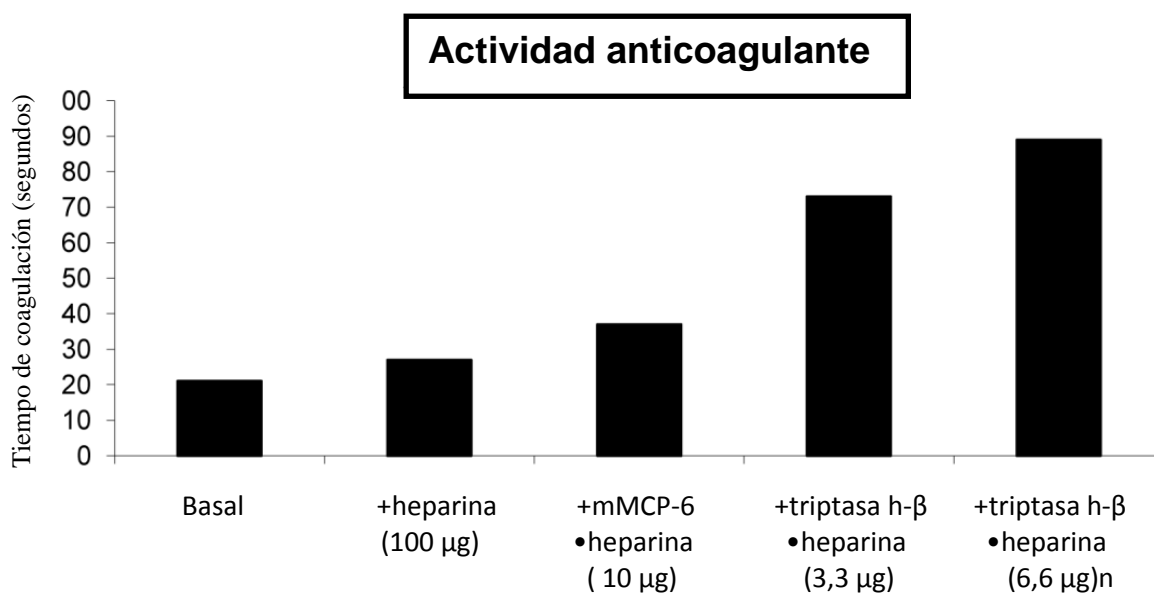


Figura 29. Actividad anticoagulante de los complejos recombinantes mMCP-6• y triptasa humana (h)- β •heparina comparada con la de la heparina. En este experimento se incubó a 37°C plasma humano (100 μ l/ensayo), extraído en tubos de citrato sódico, con heparina sólo (100 μ g) o con complejos recombinantes triptasa humana- β (3,3 y 6,6 μ g) o mMCP-6 (10 μ g)•heparina, durante 60 minutos. Se determinó el tiempo requerido por la trombina para coagular las muestras en relación a la muestra de plasma no tratada (basal), usando un fibrómetro. La preparación de heparina utilizada para crear los complejos de triptasa recombinantes tiene una actividad anticoagulante baja, demostrando que el factor anticoagulante primario en los complejos proteasa•glicisaminoglicano era la triptasa mMCP-6 o la triptasa humana- β en lugar de la heparina.

Como control negativo se inyectó PBS en lugar de IgE anti-DNP en una de las orejas de cada animal (Fig. 31).

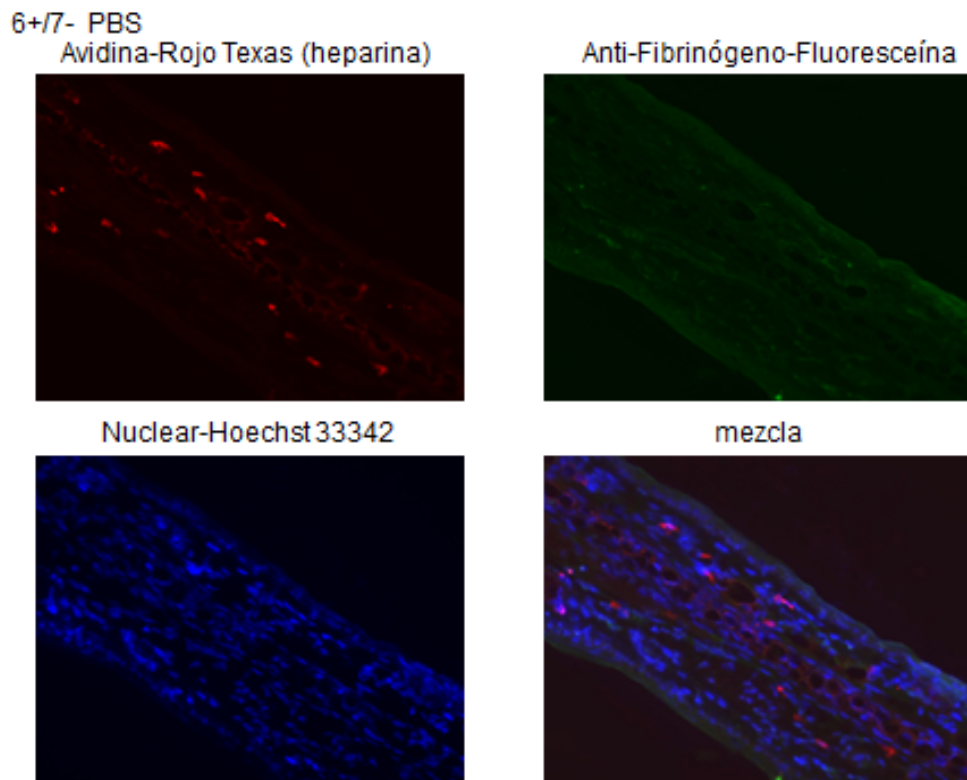


Figura 31. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP. Muestra las tres tinciones utilizadas por separado y juntas en un ratón 6+/7- en la oreja en la que se inyectó PBS en lugar de IgE, como control negativo. No se observan depósitos de fibrina ya que no ha tenido lugar la degranulación mastocitaria ante la ausencia de sensibilización .

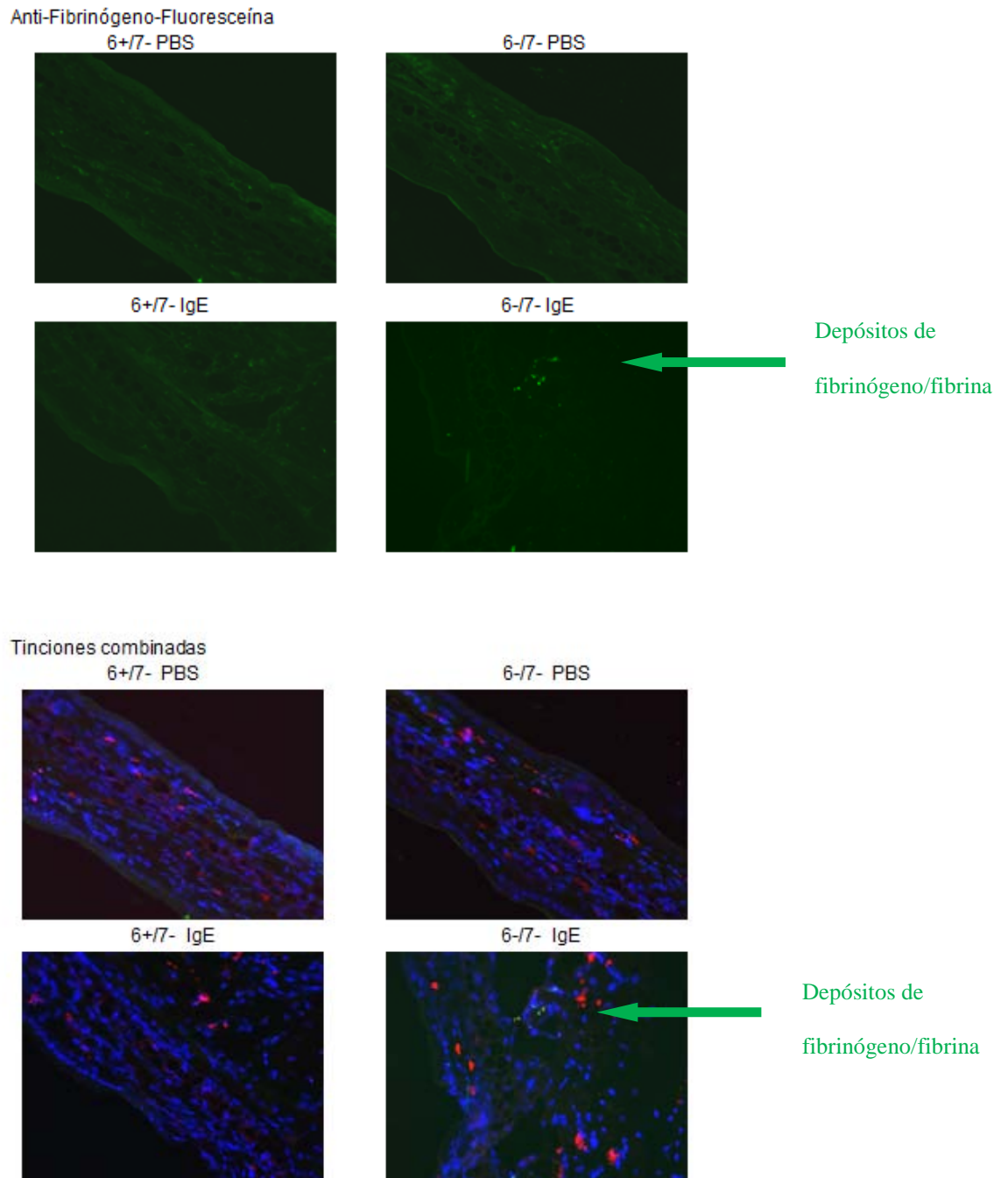
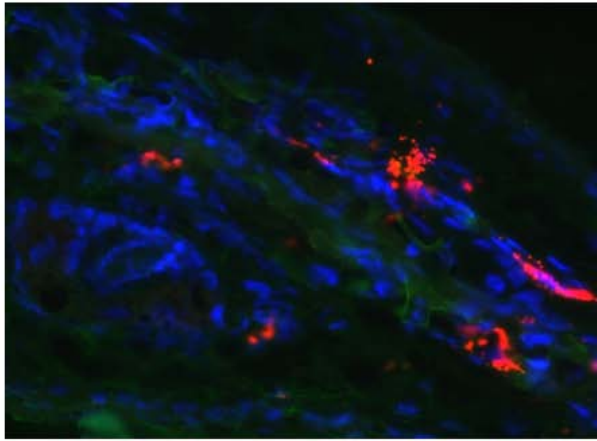


Figura 32. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP. Se muestra la aparición de depósitos de fibrina (en verde) en los ratones carentes de triptasa 6-/7- B6 sometidos a la reacción de ACP, en la oreja en la que se inyectó IgE, mientras que no se observan en ratones 6+/7- en la oreja sensibilizada, ni en los controles negativos de ambos ratones en la oreja en la que se inyectó PBS.

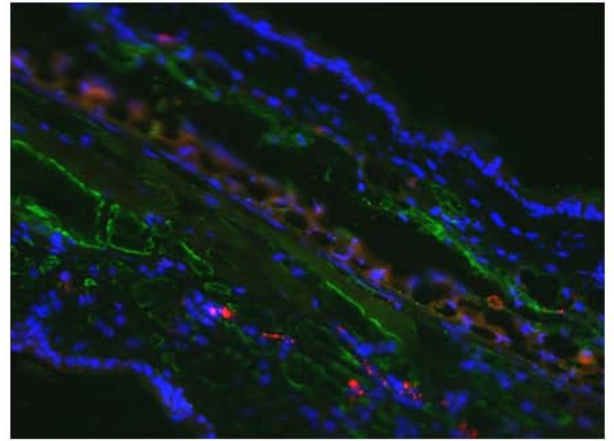
A continuación se muestran los datos de los 12 animales analizados y los resultados obtenidos en diferentes condiciones.

| Nº animal | Genotipo | Dosis (μg) DNP-albúmina | Tiempo Post-ACP |
|------------------|-----------------|---|----------------------------|
| 55 | 6-/7- | 20 | 1 hora |
| 67 | 6-/7- | 20 | 1 hora |
| 62 | 6+/7- | 20 | 1 hora |
| 74 | 6-/7- | 100 | 1 hora |
| 79 | 6-/7- | 100 | 1 hora |
| 91 | 6+/7- | 100 | 1 hora |
| 51 | 6-/7- | 20 | 6 horas |
| 70 | 6-/7- | 20 | 6 horas |
| 75 | 6+/7- | 20 | 6 horas |
| 73 | 6-/7- | 100 | 6 horas |
| 81 | 6-/7- | 100 | 6 horas |
| 86 | 6+/7- | 100 | 6 horas |

Tabla 4. Características de los 12 animales analizados en la reacción de ACP, su genotipo, la dosis administrada del antígeno DNP-albúmina y el tiempo en el que son sacrificados tras la inducción de la reacción de ACP.



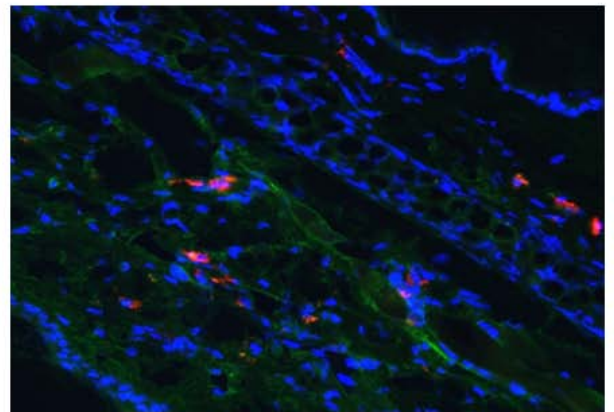
Ratón #75 (6+/7-)



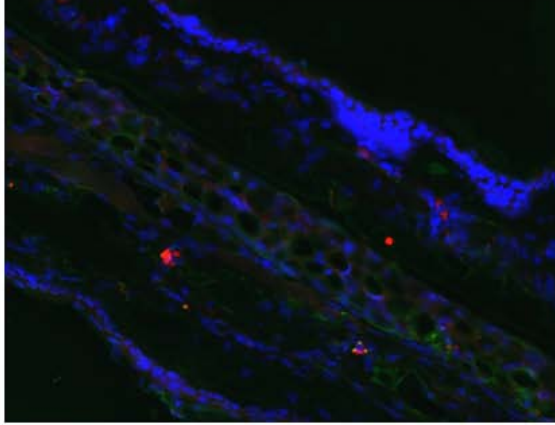
Ratón #70 (6-/7-)

- DNP-albúmina: 20 μ g
- Tiempo tras la ACP: 6h

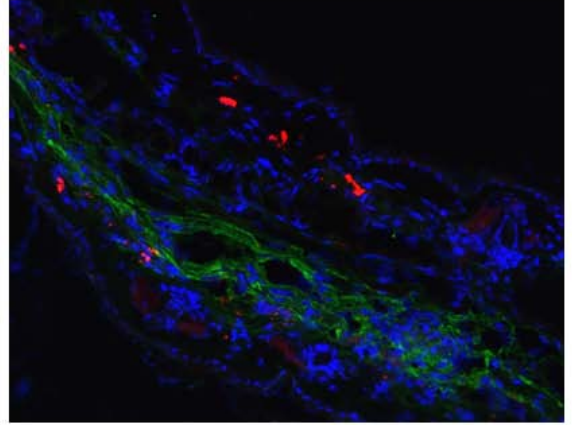
Figura 33A



Ratón #51 (6-/7-)

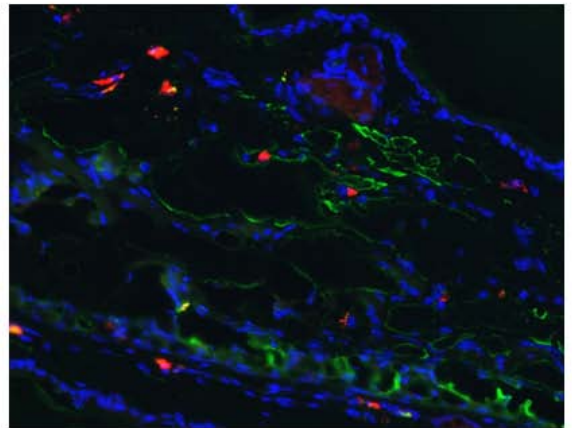


Ratón #86 (6+/7-)



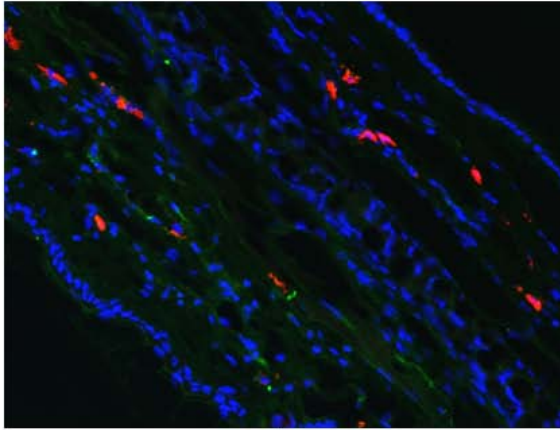
Ratón #73 (6-/7-)

- DNP-albúmina: 100 μ g
- Tiempo tras la ACP: 6h

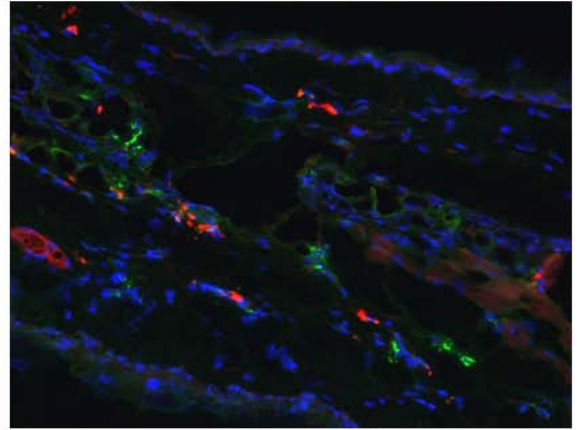


Ratón #81 (6-/7-)

Figura 33B



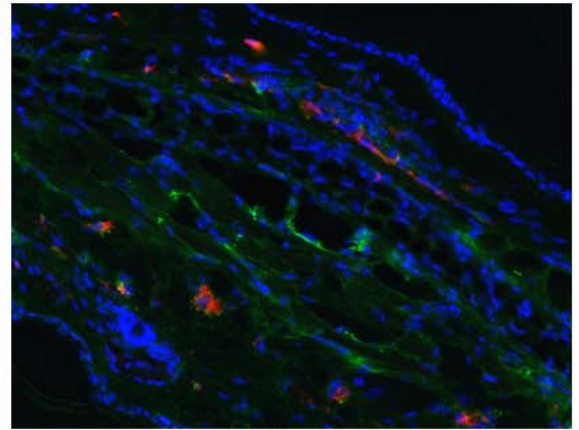
Ratón #62 (6+/7-)



Ratón #55 (6-/7-)

- DNP-albúmina: 20 μ g
- Tiempo tras la ACP: 1h

Figura 33C



Ratón #67 (6-/7-)

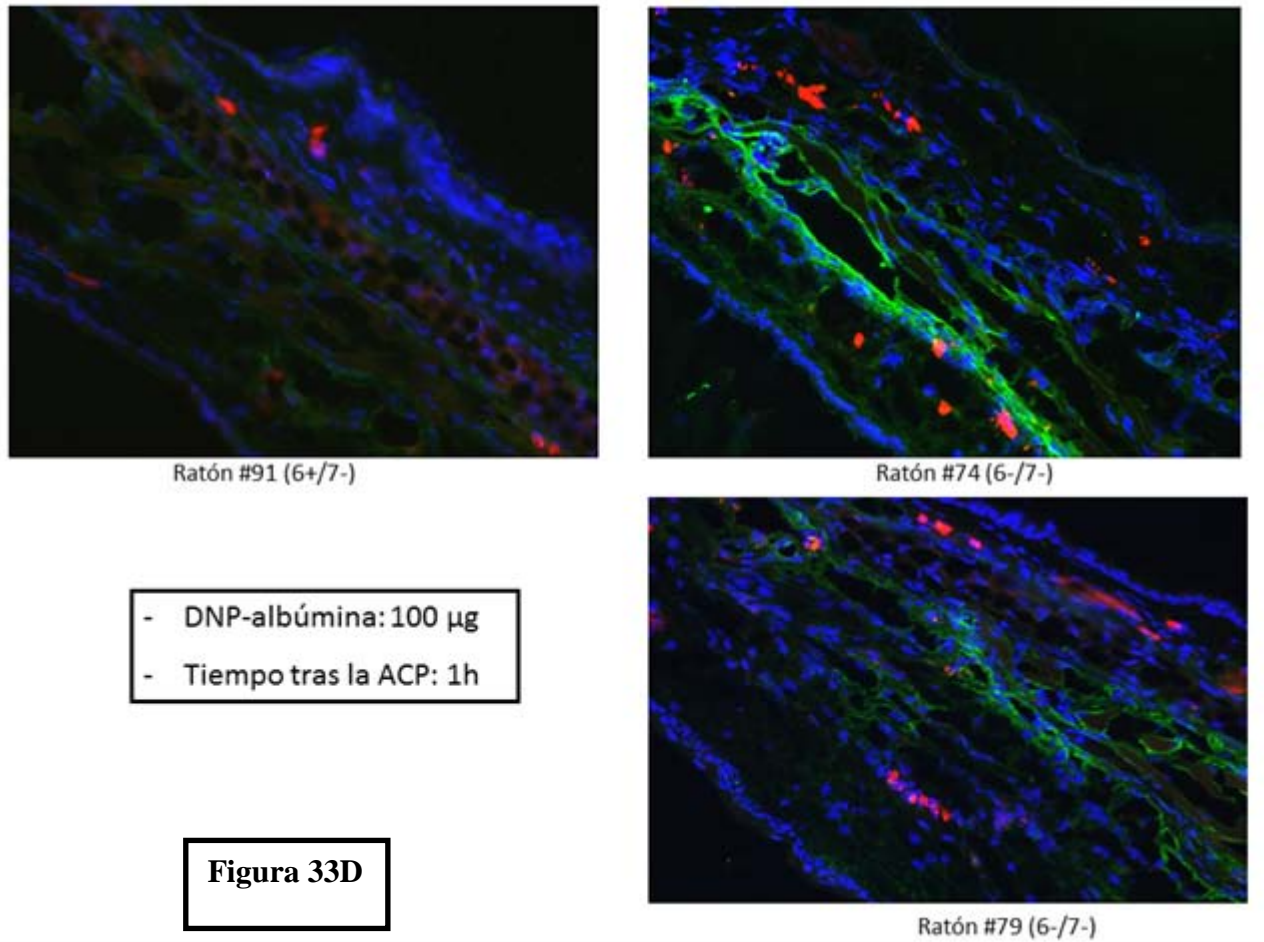


Figura 33. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP en los 12 animales analizados, en diferentes condiciones en cuanto a la dosis de antígeno DNP-albúmina sérica humana (20 o 100 µg) administrada y en cuanto al tiempo en el que los animales son sacrificados después de someterse a la reacción de ACP (1 o 6 horas). Los ratones 6-/7- que no expresan triptasa mMCP-6 (paneles de la derecha), muestran más depósitos de fibrinógeno/fibrina (en verde) que los ratones 6+/7- (paneles de la izquierda).

En las imágenes de la figura 33 se muestra cómo se encuentra una diferencia notable en la cantidad de fibrinógeno/fibrina inmunoreactiva entre las orejas de los ratones 6+/7- y las orejas de los ratones transgénicos carentes de triptasa 6-/7-, a las 6 horas de inducir la ACP, tanto en los animales provocados con 20 μ g de DNP-albúmina (Fig. 33A) como en los provocados con la dosis mayor del antígeno de 100 μ g (Fig. 33B). La diferencia en los datos inmunohistoquímicos es muy notable en el caso de los ratones provocados con 100 μ g del antígeno DNP-albúmina, posiblemente porque una dosis mayor de antígeno causa la liberación de más cantidad de mMCP-6 capaz de destruir por proteólisis el fibrinógeno que está alrededor antes de que éste pueda convertirse en fibrina.

La diferencia entre los niveles de depósitos de fibrinógeno/fibrina entre ambos tipos de ratones, 1 hora después de inducir la reacción de ACP, es menos clara en el caso de la dosis menor de DNP-albúmina de 20 μ g (Fig.33C). Una posible explicación es que la triptasa mMCP-6 exocitada tarda unas horas en destruir mediante proteólisis el fibrinógeno extravasado en los sitios de edema en el ratón 6+/7-. Al igual que ocurre en el análisis a las 6 horas, la diferencia se ve mas clara con la dosis mayor de antígeno de 100 μ g (Fig. 33D).



DISCUSIÓN



Previamente se ha demostrado que el fibrinógeno de ratón es una diana preferente de la triptasa de ratón mMCP-7 natural y recombinante, *in vitro* e *in vivo* (49). Ahora se demuestra que el fibrinógeno de ratón también es una diana preferente de la triptasa mMCP-6 unida iónicamente al glicosaminoglicano heparina o a proteoglicanos serina-glicina (Figs. 27, 28). Este hallazgo es inesperado ya que ambas triptasas recombinantes mMCP-6 y mMCP-7 no tienen preferencias de sustrato idénticas cuando se analiza una biblioteca de péptidos expresados en fagos. Además se muestra que la triptasa mMCP-6 tiene un papel fundamental en prevenir la acumulación de depósitos de fibrina en los tejidos, cuando los mastocitos de la piel de los ratones B6 degranulan en la reacción de ACP (Figs. 30, 32, 33). El hecho de que las cadenas α del fibrinógeno de ratón (Fig. 25, 26) y del fibrinógeno humano (Figs. 13-16, 21, 22, 23) se rompan de forma similar por los complejos recombinantes triptasa humana- β • heparina a pH neutro, sugiere que los datos obtenidos *in vivo* en los ratones, reflejan lo que ocurre en humanos en los sitios de inflamación.

La capacidad para formar fibrina cuando la piel o una superficie mucosa se daña, es esencial para evitar la pérdida de de sangre y la entrada de patógenos en el organismo. Sin embargo, la formación de depósitos de fibrina y de coágulos de fibrina y plaquetas intravasculares o tisulares, puede tener consecuencias fatales. Cuando los mastocitos en la piel y otros tejidos conectivos degranulan, estas células del sistema inmunitario liberan rápidamente el contenido de sus gránulos secretores, que incluye la histamina y los complejos triptasa•proteoglicanos serina-glicina. La histamina es el principal factor que aumenta la permeabilidad vascular, debido a su capacidad de unirse a los receptores H1 localizados sobre la superficie de las células del endotelio vascular,

induciendo el edema que se produce en los tejidos. Esto causa un flujo del fibrinógeno del plasma hacia los tejidos en el sitio de la inflamación.

El fibrinógeno es un componente principal de la sangre, donde su concentración normal es ~2 mg/mL. Como es una glicoproteína de fase aguda sintetizada en el hígado, sus niveles circulantes pueden llegar a 4 mg/mL en situaciones de enfermedad. La isoforma principal del fibrinógeno en el plasma humano y de ratón es un dímero, formado por dos monómeros que consisten cada uno en tres cadenas peptídicas unidas por puentes disulfuro. Se ha mostrado que las triptasas de ratón y humana rompen el extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno, sin encontrarse ninguna evidencia de proteólisis en el extremo N-terminal de la cadena (Figs. 21, 22, 23). Debido a la restricción espacial de los dos monómeros del fibrinógeno en la unidad dimérica circulante (114), es probable que el extremo N-terminal de la cadena α tenga dificultad para acceder al poro central del tetrámero de la triptasa (51), especialmente cuando la triptasa está unida a la heparina, glicosaminoglicano cargado negativamente que restringe la preferencia de sustrato del enzima (50). El extremo C-terminal de la cadena α no está unido covalentemente a las cadenas β y γ de la proteína mediante puentes disulfuro. Por eso, está más expuesta que el resto de la proteína plasmática. Posiblemente, esta característica estructural es la razón por la que el extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno es más susceptible a las triptasas de los mastocitos de ratón y humanos que las cadenas β y γ .

El factor Xa es la proteasa de tipo serina que convierte la pro-trombina en trombina activa. La heparina tiene un efecto anticoagulante en parte por su actividad anti-factor Xa. Una vez formada, la trombina es regulada negativamente por la anti-trombina-III/serpina C1. En ausencia de heparina o sulfato de heparano, la eficiencia de

la interacción trombina•serpina C1 es pobre. Sin embargo, cuando la serpina C1 encuentra una secuencia pentasacárida altamente sulfatada presente en las cadenas de la heparina del proteoglicano serina-glicina y de las cadenas sulfato de heparano del proteoglicano syndecan-4, este inhibidor de proteasa sufre un cambio conformacional que incrementa su afinidad por la trombina más de 1000 veces. Es decir, la heparina actúa también potenciando el efecto inhibitorio de la serpina C1 sobre la trombina. Los mastocitos de la piel de ratones y humanos tienen proteoglicanos serina-glicina que contienen cadenas de heparina. En los sitios de edema que se forman cuando los mastocitos cutáneos degranulan, no se observan depósitos de fibrina, como puede verse en los ratones 6+/7- B6 sometidos a la reacción de ACP (Figs. 30, 32, 33). Por eso, se ha propuesto que el factor anticoagulante relevante liberado de los mastocitos activados es la heparina, que impediría la formación de fibrina evitando la generación de trombina dependiente del Factor Xa, así como potenciando la inactivación de la trombina dependiente de la serpina C1.

Aunque la heparina de origen porcino se utiliza farmacológicamente para prevenir la coagulación dependiente de la trombina *in vivo* e *in vitro*, se cree que los glicosaminoglicanos relevantes fisiológicamente son las cadenas anticoagulantes del sulfato de heparano de los proteoglicanos endógenos syndecan-4 de la superficie de las células endoteliales (115). En apoyo a esta conclusión, no más de un tercio de las cadenas de heparina unidas a los proteoglicanos serina-glicina en los mastocitos de ratón y humanos son, capaces de activar la serpina C1, y muchas preparaciones de heparina tienen una actividad anticoagulante pobre por sí mismas, como ocurre con la preparación utilizada en este estudio para crear los complejos triptasa•heparina (Fig. 29). Además, la heparina de los mastocitos está unida covalentemente al núcleo

peptídico resistente a proteasas del proteoglicano serina-glicina, y la función primaria de este proteoglicano serina-glicina resultante es empaquetar numerosas proteasas neutras en los gránulos secretores de los mastocitos (36, 37). Cuando los mastocitos se activan y degranulan en diversos tejidos conectivos, sus complejos proteasa•proteoglicano serina-glicina exocitados permanecen intactos en la matriz extracelular durante horas (52). La mayoría de estos complejos son finalmente fagocitados por macrófagos (116) y otras células (117, 118) donde se destruyen en los lisosomas. Así, en circunstancias normales, apenas queda disponible en los tejidos el glicosaminoglicano que contiene la heparina, para unirse a la serpina C1, al Factor Xa, o incluso a la trombina. Los fragmentos de heparina de bajo peso molecular que se utilizan farmacológicamente para prevenir la coagulación sanguínea tampoco se han detectado en los tejidos con edema en ratones ni en humanos. Por lo tanto, queda por determinar el mecanismo por el cual los mastocitos previenen la coagulación sanguínea y el depósito de fibrina en los tejidos con edema.

Pejler y Karlström (119) publicaron que la trombina puede ser destruida lentamente por el miembro de la familia de las quimasas de los mastocitos mMCP-4 *in vitro*, si la reacción tenía lugar en ausencia de plasma o suero. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que la destrucción de la trombina dependiente de esta quimasa pudiera ser un modo alternativo por el que los mastocitos impedirían la coagulación sanguínea y la formación de fibrina *in vivo*. Se ha demostrado que los mastocitos de los ratones 6-/7- no tienen defecto en la expresión de mMCP-4 (2). El descubrimiento de que se acumulan depósitos de fibrina en la piel de ratones 6-/7- B6 que han sido sometidos a la reacción de ACP (Fig. 19B), sugiere por tanto que la destrucción de la trombina dependiente de mMCP-4 no es el modo primario por el que los mastocitos previenen la coagulación de la sangre y la formación de fibrina en los tejidos con edema, al menos en

el ratón B6 durante la reacción de ACP. En apoyo a esta conclusión, mMCP-4 y su enzima relacionada quimasa humana-1 (120, 121) son altamente susceptibles a varios inhibidores de proteasas presentes en el plasma (y por tanto en el fluido del edema), al contrario que mMCP-6, mMCP-7 (49), y la triptasa humana- β (53) (Fig. 19B). Si mMCP-4 y la quimasa humana-1 son rápidamente inactivadas por varios inhibidores de proteasas en el plasma, no sería posible que estas serían proteasas de los mastocitos pudieran funcionar como anticoagulantes eficaces *in vivo*.

En el mecanismo anticoagulante dependiente de los mastocitos que se descubre en este estudio, los tetrámeros de las triptasas de estas células destruyen por proteólisis el fibrinógeno antes de que esta proteína del plasma pueda convertirse en fibrina por la acción de la trombina. Los datos mostrados sugieren que los complejos mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina rompen el extremo C-terminal expuesto de la cadena α del fibrinógeno, como ya se había demostrado para mMCP-7 (49). En apoyo de esto datos *in vitro*, se detectó *in vivo* un notable aumento en la cantidad de depósitos de fibrina en la piel de los ratones que no expresan triptasa 6-/7- B6, 6 horas después de la inducción de una reacción de ACP (Figs. 30, 32, 33).

En el presente estudio se ha mostrado que los complejos triptasa humana- β •heparina rompen de forma preferencial la cadena α del fibrinógeno humano en la posición Lys575 (Figs. 21, 22 y 23). Aunque Thomas y colaboradores (106) publicaron en su estudio *in vitro* que un complejo no definido triptasa humana- β •heparina purificado de pulmón humano también rompe la cadena α del fibrinógeno humano, estos investigadores concluyeron que la proteólisis ocurre de forma preferencial en la posición Arg591, que reside en una secuencia de 14 aminoácidos que no está presente en el fibrinógeno de otras especies, incluyendo el ratón (Fig. 24). El descubrimiento de

que los complejos triptasa•heparina de ratón y humanos rompen rápidamente la cadena α del fibrinógeno de ratón (Figs. 25-28) revelaron que estos complejos deben degradar el fibrinógeno en un sitio más conservado que presumiblemente reside anteriormente a Arg591. El hallazgo de que los péptidos liberados en esta digestión eran reconocidos solo débilmente por el anticuerpo antifibrinógeno ab83477 (Fig. 17B) indican que los complejos triptasa humana- β •heparina rompen finalmente el dominio C-terminal de 69 aminoácidos de la cadena α del fibrinógeno en más de un sitio.

Para explicar los datos obtenidos mediante SDS-PAGE e inmunoblot (Figs. 13-16 y 19) y del análisis MS/MS y de la secuencia de aminoácidos C-terminal (Figs. 21-23), los complejos triptasa humana- β •heparina podrían romper inicialmente la cadena α del fibrinógeno en Lys575 y después romper rápidamente el nuevo péptido generado de 69 aminoácidos en múltiples sitios incluido Arg591. Alternativamente, la triptasa humana- β podría “morder” progresivamente el extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno, parando finalmente en Lys575. Estas posibilidades no son mutuamente excluyentes, y se obtuvo evidencia experimental para ambas (Figs. 21-23). Los complejos recombinantes mMCP-6•heparina rompen de forma preferencial péptidos expresados en fagos en secuencias Lys-Thr (50) como la secuencia Lys575-Thr576 en la cadena α del fibrinógeno de ratón (Fig. 24). Sin embargo, si el escenario del “mordisqueo” es la manera principal por la que los complejos endógenos triptasa humana- β • y mMCP-6•heparina atacan la cadena α del fibrinógeno *in vivo*, es posible que la ruptura finalice en Lys575 debido a un problema estérico en la inserción del dominio C-terminal que quedaría en la cadena α dentro del poro central de la unidad tetramérica con forma de rosco de la triptasa.

El hecho de que las triptasas mMCP-6, mMCP-7, y la triptasa humana- β son anticoagulantes más eficaces que muchas preparaciones de heparina en base a su peso (Fig. 29), tiene implicaciones clínicas importantes y cambian el paradigma de cómo los mastocitos de ratones y humanos evitan la coagulación sanguínea y la acumulación de fibrina cuando estas células inmunes degranulan. La formación de depósitos de fibrina y de coágulos de fibrina y plaquetas en los tejidos, podría tener consecuencias devastadoras *in vivo*. Así, estos datos aportan una explicación de por qué no se ha identificado ningún humano carente de triptasa- β (27) y por qué los mamíferos poseen dos genes que codifican estas serín proteasas de mastocitos que reconocen el fibrinógeno. Los hallazgos también justifican la aparente fuerte presión en la evolución para evitar la expresión de inhibidores de proteasas circulantes que pudieran inactivar eficazmente las triptasas de los mastocitos de ratones y humanos. El descubrimiento de que no se acumulan depósitos de fibrina en la piel de los ratones 6+/7- B6 cuando se les somete a la reacción de ACP, en contraste con lo que ocurre en los ratones 6-/7- B6 (Figs. 30, 32, 33), enfatiza la importancia de utilizar ratones transgénicos carentes de ambas triptasas en modelos de enfermedad, como se ha destacado previamente en un estudio de artritis (56).

Finalmente, estos datos explican por qué algunos pacientes pediátricos con mastocitosis cutánea difusa, que presentan episodios agudos de degranulación mastocitaria durante infecciones, cirugía o vacunación, liberando triptasa- β en sangre periférica y en las lesiones cutáneas, presentan sangrado de dichas lesiones o del tracto gastrointestinal (122). De forma anecdótica se ha observado también que algunas mujeres tienen un sangrado similar al de la menstruación poco después de sufrir un episodio de anafilaxia grave (Castells, datos no publicados) con liberación de triptasa- β

en sangre periférica y local de los mastocitos uterinos. El hallazgo de que las triptasas mMCP-6, mMCP-7 y la triptasa humana- β son potentes anticoagulantes, plantea la posibilidad de que la próxima generación de inhibidores de triptasa que son más específicos que los disponibles en la actualidad podrían ser útiles en prevenir los trastornos de sangrado que ocurren a veces en pacientes con mastocitosis sistémica y/o anafilaxia. El uso de complejos recombinantes triptasa- β -heparina (16. 17) también podría ser una forma más eficaz de prevenir la enfermedad tromboembólica en la clínica que utilizando heparina sola.



CONCLUSIONES E INVESTIGACIONES FUTURAS



Conclusiones:

1. El fibrinógeno es un sustrato preferencial de la triptasa de ratón mMCP-6 y de la triptasa humana- β .
2. La acción proteolítica de las triptasas sobre el fibrinógeno es resistente a los inhibidores de proteasas presentes en el suero.
3. La triptasa humana- β ejerce su acción lítica sobre el fibrinógeno humano, de forma preferencial, en el extremo C-terminal de la cadena α , en la posición Lys575, en una secuencia conservada en el fibrinógeno murino y probablemente en algún sitio más del extremo C-terminal.
4. La acción proteolítica de las triptasas sobre el fibrinógeno impide la coagulación del plasma dependiente de la trombina *in vitro*.
5. La acción proteolítica de la triptasa mMCP-6 sobre el fibrinógeno, impide que se formen coágulos de fibrina *in vivo* en los tejidos, cuando los mastocitos se activan y degranulan, lo cuál tendría consecuencias fatales.

El papel crítico de las triptasas, impidiendo la coagulación del plasma inducida por la trombina y la formación de depósitos de fibrina en los tejidos con edema tras la degranulación de los mastocitos, explica la persistencia de estas proteasas a lo largo de la evolución.

Investigaciones futuras:

1. La detección de los fragmentos liberados de la proteólisis del fibrinógeno por las triptasas, como el péptido de ~7 kDa derivado del extremo C-terminal de la cadena α , podría servir como marcador de activación mastocitaria y de anafilaxia. Quedaría por determinar su estabilidad y su persistencia en el tiempo tras la reacción anafiláctica. El desarrollo de un anticuerpo capaz de reconocer estos fragmentos, podría suponer un método diagnóstico alternativo a la determinación de triptasa en el suero, la cuál se detecta en cantidades muy pequeñas y sólo entre 1-4 horas tras el inicio de la reacción.
2. Se desconoce si los productos liberados de la degradación del fibrinógeno por acción de la triptasa tienen alguna función fisiológica.
3. El poder anticoagulante de la triptasa, mayor que el de la heparina, podría tener utilidad clínica en el tratamiento y prevención de la enfermedad tromboembólica.



CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS



Conclusions:

1. Fibrinogen is a preferred target of human tryptase- β and mMCP-6.
2. The proteolytic effect of tryptases on fibrinogen is resistant to the protease inhibitors present in blood.
3. Human tryptase- β preferentially cleaves the C-terminus of fibrinogen α -chain at Lys575, in a sequence that is conserved in murine fibrinogen, and probably somewhere else at the C-terminus.
4. The tryptase proteolytic effect on fibrinogen hinders thrombin dependent coagulation of plasma *in vitro*.
5. The proteolytic effect of mMCP-6 on fibrinogen hinders the deposition of fibrin in tissues *in vivo* when MCs activate and degranulate, which would have life-threatening consequences.

The critical role of tryptases, hindering thrombin dependent coagulation of plasma and deposition of fibrin in edema tissues when MCs degranulate, explains the persistence of these proteases along evolution.

Future directions:

1. The *in vivo* detection of fragments released from tryptase digestion of fibrinogen, like the ~7 kDa peptide derived from the C-terminus of fibrinogen α chain, could be useful as a biomarker of MC activation and anaphylaxis. Its stability and detection time in blood after anaphylaxis remains to be determined. The development of an antibody able to recognize these fragments could be an alternative diagnostic method to serum tryptase levels measurement, which is detected in very small amounts and only between 1-4 hours after the reaction.
2. It is not known if fibrinogen degradation products after tryptase digestion could have any physiologic function.
3. The anticoagulant power of tryptase, greater than that of heparin, could be useful in prevention and treatment of thromboembolic disease.



RESUMEN DE TABLAS Y FIGURAS



- Figura 1. Mastocitos peritoneales de ratón con abundantes gránulos electrodensos en su citoplasma visualizados mediante microscopía de transmisión de electrones.
- Figura 2. Estructura cristalina de la triptasa humana $\beta 2$.
- Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de mastocitos de hígado de ratones del modelo murino de mastocitosis V3 sometidos a una anafilaxia pasiva, con tinciones con azul de metileno y anticuerpos anti-mMCP-6 y anti-mMCP-7.
- Figura 4. Potencial electrostático de mMCP-7 (izquierda) y mMCP-6 (derecha) a pH 7.0.
- Figura 5. Detección mediante inmunoblot de cantidades importantes de mMCP-7 en sangre, 15 minutos después de inducir una anafilaxia sistémica en ratones del modelo de mastocitosis V3.
- Figura 6. Modelo de triptasas de ratón en la inflamación tisular y en la defensa frente a bacterias.
- Figura 7. Esquema de la estructura del fibrinógeno y su conversión en fibrina por acción de la trombina.
- Figura 8. Esquema de la secuencia de aminoácidos de la cadena fibrinógeno humano (FGA-isoforma A, número de acceso del “GenBank” NP_068657).

- Figura 9. Cambio conformacional inducido por la heparina sobre la antitrombina/Serpina- C1 que potencia su acción antitrombina, explicando su efecto anticoagulante.
- Figura 10. Análisis por SDS-PAGE del plasma de ratones del modelo de mastocitosis V3 antes (-) y después (+) de inducir una anafilaxia sistémica.
- Figura 11. Fibrinógeno de ratón antes (carril 2) y después (carril 1) de su incubación con mMCP-7.
- Figura 12. Curva estándar de un ensayo de fibrinogenólisis.
- Figura 13. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en presencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE.
- Figura 14. Proteólisis de diferentes cantidades de fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina (Th β) en presencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE.
- Figura 15. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en diferentes periodos de tiempo en presencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE.
- Figura 16. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β -heparina en ausencia de β -mercaptoetanol: análisis por SDS-PAGE e Inmunoblot.
- Figura 17. Secuencia de 50 aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena α del fibrinógeno humano reconocida por el anticuerpo anti-fibrinógeno ab83477.

- Figura 18. Comparación de la actividad enzimática de las preparaciones utilizadas de tripsina y triptasa humana- β .
- Figura 19. Proteólisis del fibrinógeno humano por el complejo recombinante triptasa humana- β •heparina en presencia de los inhibidores de proteasas del suero humano.
- Figura 20. Purificación del fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno humano mediante SDS-PAGE.
- Figura 21. Análisis mediante MS/MS y de la secuencia de aminoácidos C-terminal del fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno humano, tras su incubación con el complejo recombinante triptasa humana- β •heparina durante 15 minutos.
- Figura 22. Análisis MS/MS y de la secuencia de aminoácidos C-terminal del fragmento generado de la cadena α del fibrinógeno humano tras su incubación con el complejo recombinante triptasa humana- β •heparina durante 1 minuto.
- Figura 23. Análisis por MS/MS del péptido de ~7-kDa producto de la digestión del fibrinógeno humano por el complejo triptasa humana- β •heparina.
- Figura 24. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la cadena α del fibrinógeno humano (en rojo) (“GenBank”, número de acceso NP_068657) y el de ratón (en verde) (“GenBank” número de acceso NP_034326).
- Figura 25. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a los complejos triptasa humana- β •heparina.

- Figura 26. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a los complejos triptasa humana- β •heparina.
- Figura 27. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a complejos recombinantes mMCP-6•heparina glicosaminoglicano.
- Figura 28. La cadena α del fibrinógeno de ratón es susceptible a complejos naturales mMCP-6•proteoglicanos serina-glicina.
- Figura 29. Actividad anticoagulante de los complejos recombinantes mMCP-6• y triptasa humana- β •heparina comparada con la de la heparina.
- Figura 30. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP.
- Figura 31. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP.
- Figura 32. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos de fibrina después de la reacción de ACP.
- Figura 33. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de depósitos tisulares de fibrina después de la reacción de ACP en los 12 animales analizados.
- Tabla 1: Peptidasas triptasas de humanos y ratones.
- Tabla 2. Péptidos susceptibles a mMCP-7.
- Tabla 3. Péptidos susceptibles a mMCP-6 obtenidos en presencia de heparina.
- Tabla 4. Características de los 12 animales analizados en la reacción de ACP.



REFERENCIAS



1. Ehrlich P. *Beitrage zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung*. Doctoral thesis, 1878, Universidad de Leipzig, Alemania.
2. Thakurdas SM, Melicoff E, Sansores-Garcia L, Moreira DC, Petrova Y, Stevens RL, Adachi R. The Mast Cell-restricted Trypsase mMCP-6 has a Critical Immunoprotective Role in Bacterial Infections. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20809-20815.
3. Sonoda T, Kitamura Y, Haku Y, Hara H, Mori KJ. Mast-cell precursors in various haematopoietic colonies of mice produced in vivo and in vitro. *Br J Haematol.* 1983; 53: 611-20.
4. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 787-99.
5. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005; 6: 135-42.
6. Caughey, GH. Protease mediators of anaphylaxis. In: M.C. Castells, ed. *Anaphylaxis and hypersensitivity reactions*. New York: Humana Press; 2011: 89-105.
7. Lagunoff D, Benditt EP. Proteolytic enzymes of mast cells. *Ann NY Acad Sci.* 1963; 103: 185–198.
8. Lagunoff D. Mast cell proteases: a historical perspective. In: Caughey GH, ed. *Mast Cell Proteases in Immunology and Biology*. New York: Marcel Dekker; 1995: 1–8.

9. Glenner GG, Cohen LA. Histochemical demonstration of a species-specific trypsin-like enzyme in mast cells. *Nature*. 1960; 185: 846–847.
10. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1981; 256: 11939–11943.
11. Schwartz LB, Lewis RA, Seldin D, Austen KF. Acid hydrolases and tryptase from secretory granules of dispersed human lung mast cells. *J Immunol*. 1981; 126: 1290–1294.
12. Smith TJ, Hougland MW, Johnson DA. Human lung tryptase. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1984; 259: 11046–11051.
13. Vanderslice P, Ballinger SM, Tam EK, Goldstein SM, Craik CS, Caughey GH. Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 3811–3815.
14. Miller JS, Westin EH, Schwartz LB. Cloning and characterization of complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest*. 1989; 84: 1188–1195.
15. Harris JL, Niles A, Burdick K, Maffitt M, Backes BJ, Ellman JA, Kuntz I, Haak-Frendscho M, Craik CS. Definition of the extended substrate specificity determinants for beta-tryptases I and II. *J Biol Chem*. 2001; 276: 34941–34947.
16. Huang C, Li L, Krilis SA, Chanasyk K, Tang Y, Li Z, Hunt JE, Stevens RL. Human tryptases a (alpha) and b (beta)/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *J Biol Chem*. 1999; 274: 19670–19676.

17. Huang C, De Sanctis GT, O'Brien PJ, Mizgerd JP, Friend DS, Drazen JM, Brass LF, Stevens RL. Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem.* 2001; 76: 26276-26284.
18. Badge RM, Yardley J, Jeffreys AJ, Armour JA. Crossover breakpoint mapping identifies a subtelomeric hotspot for male meiotic recombination. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 1239-1244.
19. Peng Q, McEuen AR, Benyon RC, Walls AF. The heterogeneity of mast cell tryptase from human lung and skin. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 270-283.
20. Wong GW, Yasuda S, Morokawa N, Li L, Stevens RL. Mouse chromosome 17a3.3 contains 13 genes that encode functional tryptic-like serine proteases with distinct tissue and cell expression patterns. *J Biol Chem.* 2004; 279: 2438–2452.
21. Marquardt U, Zettl F, Huber R, Bode W, Sommerhoff C. The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region. *J Mol Biol.* 2002; 321: 491–502.
22. Selwood T, Wang ZM, McCaslin DR, Schechter NM. Diverse stability and catalytic properties of human tryptase alpha and beta isoforms are mediated by residue differences at the S1 pocket. *Biochemistry.* 2002; 41: 3329–3340.
23. Schwartz LB, Min HK, Ren S, Xia HZ, Hu J, Zhao W, Moxley G, Fukuoka Y. Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 cells, Mono-mac-6 cells, and human skin-derived mast cells. *J Immunol.* 2003; 170: 5667–5673.

24. Pallaoro M, Fejzo MS, Shayesteh L, Blount JL, Caughey GH. Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3355–3362.
25. Caughey GH, Raymond WW, Blount JL, Hau LW, Pallaoro M, Wolters PJ, Verghese GM. Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostasin gene families. *J Immunol.* 2000; 164: 6566–6575.
26. Soto D, Malmsten C, Blount JL, Muilenburg DJ, Caughey GH. Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32: 1000–1006.
27. Trivedi NN, Tamraz B, Chu C, Kwok PY, Caughey GH. Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent inheritance of loss-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124: 1099–1105.
28. Wong GW, Foster PS, Yasuda S, Qi JC, Mahalingam S, Mellor EA, Katsoulotos G, Li L, Boyce JA, Krilis SA, Stevens RL. Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase g (gamma). TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277: 41906–41915.
29. Yuan J, Beltman J, Gjerstad E, Nguyen MT, Sampang J, Chan H, Janc JW, Clark JM. Expression and characterization of recombinant gamma-tryptase. *Protein Expr Purif.* 2006; 49: 47–54.

30. Wang HW, McNeil HP, Husain A, Liu K, Tedla N, Thomas PS, Raftery M, King GC, Cai ZY, Hunt JE. Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity. *J Immunol.* 2002; 169: 5145–5152.
31. Caughey GH. Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117: 1411–1414.
32. Reynolds DS, Stevens RL, Lane WS, Carr MH, Austen KF, Serafin WE. Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. 87; 3230-3234.
33. Reynolds DS, Gurley DS, Austen KF, Serafin WE. Cloning of the cDNA and gene of mouse mast cell protease-6. Transcription by progenitor mast cells and mast cells of the connective tissue subclass. *J Biol Chem.* 1991; 266: 3847-3853.
34. McNeil HP, Reynolds DS, Schiller V, Ghildyal N, Gurley DS, Austen K F, Stevens RL. Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 11174-11178.
35. Huang C, Morales G, Vagi A, Chanasyk K, Ferrazzi M, Burklow C, Qiu WT, Feyfant E, Šali A, Stevens RL. Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases. Dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface. *J Biol Chem.* 2000; 275: 351–358.
36. Humphries DE, Wong GW, Friend DS, Gurish MF, Qiu WT, Huang C, Sharpe AH, Stevens RL. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature.* 1999; 400: 769-772.

37. Forsberg E, Pejler G, Ringvall M, Lunderius C, Tomasini-Johansson B, Kusche-Gullberg M, Eriksson I, Ledin J, Hellman L, Kjellén L. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature*. 1999; 400: 773-776.
38. Ghildyal N, Friend DS, Freeland R, Austen KF, McNeil HP, Schiller V, Stevens RL. Lack of expression of the tryptase mouse mast cell protease 7 in mast cells of the C57BL/6J mouse. *J Immunol*. 1994; 53: 2624–2630.
39. Hunt JE, Stevens RL, Austen KF, Zhang J, Xia Z, Ghildyal N. Natural disruption of the mouse mast cell protease 7 gene in the C57BL/6 mouse. *J Biol Chem*. 1996; 271: 2851–2855.
40. Bourdon MA, Oldberg A, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985; 82: 1321–1325.
41. Stevens RL, Avraham S, Gartner MC, Bruns GA, Austen KF, Weis JH. Isolation and characterization of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1988; 263: 7287–7291.
42. Lane DA, Bjork I, Lindahl U. Heparin and Related Polysaccharides. Proceedings of an international meeting. Uppsala, Sweden, September 1-6, 1991. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; 313: 1–374.
43. Stevens RL, Lee TD, Seldin DC, Austen KF, Befus AD, Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* contain protease-resistant chondroitin sulfate di-B proteoglycans. *J Immunol*. 1986; 137: 291–295.

44. Razin E, Stevens RL, Akiyama F, Schmid K, Austen KF. Culture from mouse bone marrow of a subclass of mast cells possessing a distinct chondroitin sulfate proteoglycan with glycosaminoglycans rich in N-acetylgalactosamine-4,6-disulfate. *J Biol Chem.* 1982; 257: 7229–7236.
45. McNeil HP, Adachi R, Stevens RL. Mast cell-restricted tryptases: structure and function in inflammation and pathogen defense. *J Biol Chem.* 2007; 282: 20785-20789.
46. Johnson DA, Barton GJ. Mast cell tryptases: examination of unusual characteristics by multiple sequence alignment and molecular modeling. *Protein Sci.* 1992; 1: 370–377.
47. Šali A, Matsumoto R, McNeil HP, Karplus M, Stevens RL. Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. *J Biol Chem.* 1993; 268: 9023–9034.
48. Matsumoto R, Šali A, Ghildyal N, Karplus M, Stevens RL. Packaging of proteases and proteoglycans in the granules of mast cells and other hematopoietic cells. A cluster of histidines on mouse mast cell protease 7 regulates its binding to heparin serglycin proteoglycans. *J Biol Chem.* 1995; 270: 19524–19531.
49. Huang C, Wong GW, Ghildyal N, Gurish MF, Šali A, Matsumoto R, Qiu WT, Stevens RL. The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the

- presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31885–31893.
50. Huang C, Friend DS, Qiu WT, Wong GW, Morales G, Hunt J, Stevens RL. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. *J Immunol.* 1998; 160: 1910–1919.
51. Pereira PJ, Bergner A, Macedo-Ribeiro S, Huber R, Matschiner G, Fritz H, Sommerhoff CP, Bode W. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature.* 1998; 392: 306–311.
52. Ghildyal N, Friend DS, Stevens RL, Austen KF, Huang C, Penrose JF, Šali A, Gurish MF. Fate of two mast cell tryptases in V3 mastocytosis and normal BALB/c mice undergoing passive systemic anaphylaxis: prolonged retention of exocytosed mMCP-6 in connective tissues, and rapid accumulation of enzymatically active mMCP-7 in the blood. *J Exp Med.* 1996; 184: 1061–1073.
53. Alter SC, Kramps JA, Janoff A, Schwartz LB. Interactions of human mast cell tryptase with biological protease inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 276: 26-31.
54. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med.* 1987; 316:1622-6.
55. Fukuoka Y, Schwartz LB. Human beta-tryptase: detection and characterization of the active monomer and prevention of tetramer reconstitution by protease inhibitors. *Biochemistry.* 2004; 43: 10757-10764.

56. McNeil HP, Shin K, Campbell IK, Wicks IP, Adachi R, Lee DM, Stevens RL. The mouse mast cell-restricted tetramer-forming tryptases mouse mast cell protease 6 and mouse mast cell protease 7 are critical mediators in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58: 2338-2346.
57. Stevens RL, Adachi R. Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunol Rev.* 2007; 217: 155-167.
58. Jackson NE, Wang HW, Bryant KJ, McNeil HP, Husain A, Liu K, Tedla N, Thomas PS, King GC, Hettiaratchi A, Cairns J, Hunt JE. Alternate mRNA splicing in multiple human tryptase genes is predicted to regulate tetramer formation. *J Biol Chem.* 2008; 283: 34178-34187.
59. Kinoshita M, Okada M, Hara M, Furukawa Y, Matsumori A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1858-1863.
60. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol.* 1998; 161: 1939-1946.
61. Robson SC, Shephard EG, Kirsch RE. Fibrin degradation product D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1 beta, IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. *Br J Haematol.* 1994; 86: 322-326.

62. Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol.* 2009; 182: 647-656.
63. Shin K, Watts GF, Oettgen HC, Friend DS, Pemberton AD, Gurish MF, Lee DM. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol.* 2008; 180: 4885-4891.
64. Tremaine WJ, Brzezinski A, Katz JA, Wolf DC, Fleming TJ, Mordenti J, Strenkoski-Nix LC, Kurth MC. Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16: 407-413.
65. Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Handa O, Takagi T, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41: 944-953.
66. Hamilton MJ, Sinnamon MJ, Lyng GD, Glickman JN, Wang X, Xing W, Krilis S A, Blumberg RS, Adachi R, Lee DM, Stevens RL. Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 290-295.
67. Zhang J, Sun J, Lindholt JS, Sukhova GK, Sinnamon M, Stevens RL, Adachi R, Libby P, Thompson RW, Shi GP. Mast cell tryptase deficiency attenuates mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circ Res.* 2011; 108: 1316-1327.

68. Oh SW, Pae CI, Lee DK, Jones F, Chiang GK, Kim HO, Moon SH, Cao B, Ogbu C, Jeong KW, Kozu G, Nakanishi H, Kahn M, Chi EY, Henderson WR Jr. Tryptase inhibition blocks airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol.* 2002; 168: 1992-2000.
69. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol.* 1997; 159: 6216-6225.
70. Tam EK, Caughey GH. Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990; 3: 27-32.
71. Stack MS, Johnson DA. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J Biol Chem.* 1994; 269: 9416-9419.
72. Ren S, Lawson AE, Carr M, Baumgarten CM, Schwartz LB. Human tryptase fibrinogenolysis is optimal at acidic pH and generates anticoagulant fragments in the presence of the anti-tryptase monoclonal antibody B12. *J Immunol.* 1997; 159: 3540-3548.
73. Molinari JF, Moore WR, Clark J, et al. Role of tryptase in immediate cutaneous responses in allergic sheep. *J Appl Physiol.* 1995; 79: 1966-1970.
74. Molinari JF, Scuri M, Moore WR, et al. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 649-653.

75. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, et al. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest.* 1989; 83: 1551–1555.
76. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thrombosis and Haemostasis.* 2005; 3: 1894-1904.
77. Henschen A, Lottspeich F, Kehl M, Southan C. Covalent structure of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 408: 28–43.
78. Blombäck B, Hessel B, Hogg D. Disulfide bridges in NH₂-terminal part of human fibrinogen. *Thromb Res.* 1976; 8: 639–658.
79. Huang S, Cao Z, Davie EW. The role of amino-terminal disulfide bonds in the structure and assembly of human fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 488–495.
80. Zhang J-Z, Redman CM. Identification of Bb chain domains involved in human fibrinogen assembly. *J Biol Chem.* 1992; 267: 21727–21732.
81. Hoepflich PD Jr, Doolittle RF. Dimeric half-molecules of human fibrinogen are joined through disulfide bonds in an antiparallel orientation. *Biochemistry.* 1983; 22: 2049–2055.
82. Scheraga HA, Laskowski MJr. The fibrinogen-fibrin conversion. *Adv Protein Chem.* 1957; 12: 1–131.
83. Blombäck B. Studies on the action of thrombotic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. *Ark Kemi.* 1958; 12: 321–335.

84. Blombäck B, Hessel B, Hogg D, Therkildsen L. A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*. 1978; 275: 501–505.
85. Laudano AP, Doolittle RF. Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 3085–3089.
86. Liu CY, Koehn JA, Morgan FJ. Characterization of fibrinogen New York 1. *J Biol Chem* 1985; 260: 4390–4396.
87. Pandya BV, Cierniewski CS, Budzynski AZ. Conservation of human fibrinogen conformation after cleavage of the Bb-chain NH₂-terminus. *J Biol Chem*. 1985; 260: 2994–3000.
88. Siebenlist KR, DiOrio JP, Budzynski AZ, Mosesson MW. The polymerization and thrombin-binding properties of des-(B beta 1–42)-fibrin. *J Biol Chem*. 1990; 265: 18650–18655.
89. Shimizu A, Nagel GM, Doolittle RF. Photoaffinity labeling of the primary fibrin polymerization site: isolation of a CNBr fragment corresponding to c337–379. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 2888–2892.
90. Pratt KP, Côté HCF, Chung DW, Stenkamp RE, Davie EW. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal c-chain fragment complexed with the peptide gly-pro-arg-pro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 7176–7181.

91. Everse SJ, Spraggon G, Veerapandian L, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*. 1998; 37: 8637–8642.
92. Ferry JD. The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1952; 38: 566–569.
93. Krakow W, Endres GF, Siegel BM, Scheraga HA. An electron microscopic investigation of the polymerization of bovine fibrin monomer. *J Mol Biol*. 1972; 71: 95–103.
94. Fowler WE, Hantgan RR, Hermans J, Erikson HP. Structure of the fibrin protofibril. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 4872–4876.
95. Müller MF, Ris HA, Ferry JD. Electron microscopy of fine fibrin clots and fine and coarse fibrin films. *J Mol Biol*. 1984; 174: 369–384.
96. Mosesson MW, Siebenlist KR, Amrani DL, Di Orio JP. Identification of covalently linked trimeric and tetrameric D domains in crosslinked fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1113–1117.
97. Hewat EA, Tranqui L, Wade RH. Electron microscope structural study of modified fibrin and a related modified fibrinogen aggregate. *J Mol Biol*. 1983; 170: 203–222.
98. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hainfeld JF, Wall JS. The covalent structure of factor XIIIa crosslinked fibrinogen fibrils. *J Struct Biol*. 1995; 115: 88–101.

99. Siebenlist KR, Meh D, Mosesson MW. Protransglutaminase (factor XIII) mediated crosslinking of fibrinogen and fibrin. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1221–1228.
100. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Wall JS, Hainfeld JF. Fibrinogen assembly and crosslinking on a fibrin fragment E template. *Thromb Haemost* 2002; 87: 651–658.
101. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 14683-14688.
102. Skinner R, Abrahams JP, Whisstock JC, Lesk AM, Carrell RW, Wardell MR. The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site. *J Mol Biol*. 1997; 266: 601-609.
103. Samoszuk M, Corwin MA. Mast cell inhibitor cromolyn increases blood clotting and hypoxia in murine breast cancer. *Int. J. Cancer*. 2003; 107: 159-163.
104. Gurish MF, Pear WS, Stevens RL, Scott ML, Sokol K, Ghildyal N, Webster MJ, Hu X, Austen KF, Baltimore D. Tissue-regulated differentiation and maturation of a v-abl-immortalized mast cell-committed progenitor. *Immunity*. 1995; 3: 175-186.
105. Samoszuk M, Corwin M, Hazen SL. Effects of human mast cell tryptase and eosinophil granule proteins on the kinetics of blood clotting. *Am J Hematol*. 2003; 73: 18-25.

106. Thomas VA, Wheelless CJ, Stack MS, Johnson DA. Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption. *Biochemistry*. 1998; 37: 2291-2298.
107. Schwartz LB, Bradford TR, Littman BH, Wintroub BU. The fibrinogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol*. 1985; 135: 2762-2767.
108. Niles AL, Maffitt M, Haak-Frendscho M, Wheelless CJ, Johnson DA. Recombinant human mast cell tryptase: stable expression in *Pichia pastoris* and purification of fully active enzyme. *Biotechnol Appl Biochem*. 1998; 28: 125-131.
109. Svendsen L, Blomback B, Blomback M, Olsson PI. Substrates for determination of trypsin, thrombin and thrombin-like enzymes. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*. 1972; 98: 446-454.
110. Eng JK, McCormick AL, Yates JR III. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994; 5: 976-989.
111. Razin E, Ihle JN, Seldin D, Mencia-Huerta JM, Katz HR, LeBlanc PA, Hein A, Caulfield JP, Austen KF, Stevens RL. Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J Immunol*. 1984; 132: 1479-1486.
112. Kaieda S, Shin K, Nigrovic PA, Seki K, Lee RT, Stevens RL, Lee DM. Synovial fibroblasts promote the expression and granule accumulation of

- tryptase via interleukin-33 and its receptor ST-2 (IL1RL1). *J Biol Chem.*2010; 285: 21478-21486.
113. Brown, B. Hematology: Principles and Procedures, Lea and Febiger, Philadelphia, PA. 1988, 5^a Ed: 219-222.
114. Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, Riley M, Doolittle RF. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry.* 2009; 48: 3877-3886.
115. Shworak NW, Kojima T, Rosenberg RD. Isolation and characterization of ryudocan and syndecan heparan sulfate proteoglycans, core proteins, and cDNAs from a rat endothelial cell line. *Haemostasis.* 1993; 23 Suppl 1: 161-176.
116. Fabian I, Bleiberg I, Aronson M. Increased uptake and desulphation of heparin by mouse macrophages in the presence of polycations. *Biochim Biophys Acta.* 1978; 544: 69-76.
117. Atkins FM, Metcalfe DD. Degradation of the heparin matrix of mast cell granules by cultured fibroblasts. *J Immunol.* 1983; 131: 1420-1425.
118. Atkins FM, Friedman MM, Metcalfe DD. Biochemical and microscopic evidence for the internalization and degradation of heparin-containing mast cell granules by bovine endothelial cells. *Lab Invest.*1985; 52: 278-286.
119. Pejler G, Karlstrom A. Thrombin is inactivated by mast cell secretory granule chymase. *J Biol Chem.* 1993; 268: 11817-11822.
120. Schick C, Kamachi Y, Bartuski AJ, Cataltepe S, Schechter NM, Pemberton PA, Silverman GA. Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel

serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 1849-1855.

121. Schechter NM, Sprows JL, Schoenberger OL, Lazarus GS, Cooperman BS, Rubin H. Reaction of human skin chymotrypsin-like proteinase chymase with plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem.* 1989; 264: 21308-21315.

122. Kettelhut BV, Metcalfe DD. Pediatric mastocytosis. *J Invest Dermatol.* 1991; 96: 15S-18S.



**PUBLICACIONES Y OTRA PRODUCCIÓN
CIENTÍFICA RELACIONADAS**



PUBLICACIÓN:

- Prieto-García A, Zheng D, Adachi R, Xing W, Lane WS, Chung K, Anderson P, Hansbro PM, Castells M, Stevens RL. Mast cell restricted mouse and human tryptase-heparin complexes hinder thrombin-induced coagulation of plasma and the generation of fibrin by proteolytically destroying fibrinogen. *J Biol Chem.* 2012; 287: 7834-44.

COMUNICACIÓN A CONGRESO:

- Prieto-García A, Castells MC, Wang S, Stevens RL. Mast Cell Restricted, Tetramer-forming Tryptases Hinder Thrombin-Induced Coagulation of Plasma by Proteolytically Destroying Fibrinogen. 2011 American Academy of Allergy Asthma & Immunology Annual Meeting. San Francisco. March 17-22.