

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

**Participación de la β -2-glicoproteína I en la
Regulación de la Coagulación Sanguínea**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS**

PRESENTA

M. en C. Francisco López Lira

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La perseverancia allana todos los caminos

Ignacio González Guzmán*

* Fundador del Laboratorio de Estudios Médicos y Biológicos de la UNAM, actualmente, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB)

Para llevar a cabo los estudios de doctorado que concluyen con este trabajo, obtuve el apoyo de la **Universidad Autónoma de Nayarit**, que como miembro del personal académico y de acuerdo al programa de formación y superación del personal académico tiene contemplados; del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, a través de una beca otorgada por pertenecer a un programa de posgrado de excelencia; al Laboratorio de Inmunología del **Instituto Nacional de Pediatría** que me ofreció la oportunidad de poder contribuir a esclarecer los mecanismos moleculares de las enfermedades autoinmunes, al permitirme tener acceso a sus instalaciones y sus pacientes, compartiendo experiencias con su personal médico adscrito al servicio. Finalmente, del **Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM**, institución líder de la investigación biomédica en México, que me brindó su hospitalidad, asesoría y laboratorios.

Dedicada:

A la memoria de mi padre, que no alcanzó a ver concluida mi tarea. A mi madre que siempre se preocupó por mis estudios universitarios. A mis hermanos presentes y ausentes que me vieron crecer, sin saber el final.

A Hilda, que siempre ha estado a mi lado, compartiendo mi sueño, robándole horas a nuestra convivencia, siempre con la convicción de que lograríamos llegar a la meta propuesta, desde el mismo momento en que decidimos alcanzarla. Incansable compañera de mis días y del porvenir.

A mis hijos Ana Luisa y Javier, ya unos jóvenes universitarios, espero que el esfuerzo realizado, los motive a superarse humana y académicamente, haciéndolos mejores individuos con un espíritu de servicio hacia sus semejantes. El futuro es de ustedes. Gracias por su apoyo, especialmente por las gráficas de este trabajo.

A mis compañeros del “Lab”, Giovanni, Carlos, Jorge “el che”, Esteban, Alejandra Huerta, Irma, Gustavo con los que compartí alegrías, desvelos, angustias, sinsabores y un gran sueño: generar conocimiento.

Especial mención merece Angélica Plaza del Instituto Nacional de Pediatría, que vió nacer este proyecto, ayudándome a superar muchos de los obstáculos presentados en el Instituto.

Agradecimientos:

A mi maestra, amiga, consejera, tutora, directora de tesis: Dra Blanca Haydee Ruiz Ordaz, le agradezco infinitamente el haberme brindado la oportunidad de realizar en su laboratorio del IIB, el trabajo que se presenta en esta tesis, producto de una inquietud personal originada en la práctica del laboratorio de rutina del INP. Su apoyo fue fundamental, gracias a la especial sensibilidad para conjugar la investigación básica con la clínica. Con su fortaleza, motivación, conocimiento y experiencia se logró el objetivo planteado. Agradezco especialmente sus enseñanzas, su comprensión en mi toma de decisiones, acertadas o no, su apoyo en los momentos difíciles del proyecto y sobre todo el llevar a buen término este trabajo a pesar de las dificultades encontradas a lo largo del camino.

Agradezco a la Dra. Verónica Monroy Martínez su valioso apoyo en la realización de este trabajo, no solamente desde el punto de vista académico, donde “Verito”, como le nombramos en el laboratorio cariñosamente, sin egoismos ni fastidio, me brindó su apoyo poniendo a mi disposición su experiencia y su conocimiento en el complejo mundo de la fibrinólisis. También en el aspecto humano, “Verito” es una persona sencilla, de trato amable, con un gran defecto: un gran amor por su trabajo. Tener su amistad es un privilegio.

A Luis Rosales, le agradezco grandemente su apoyo por los análisis estructurales de las moléculas involucradas en este trabajo: β eta-2-glicoproteína I y plasminógeno. Incansable trabajador de noche, maestro del docking y agudo observador de estructuras moleculares.

ÍNDICE

Agradecimientos	5
Índice	6
Índice de figuras	8
Abreviaturas	9
Resumen	10
Abstract	12
Introducción	13
Planteamiento del problema	17
Hipótesis	18
Objetivo general	18
Objetivos particulares	19
Materiales y métodos	20
Obtención de proteínas	20
Anticuerpos	20
Ensayos de unión Glu-Plasminógeno- β_2 GPI	21
Inhibición de la interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI	21
Evaluación de la participación de lisinas C-terminales en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI	22
Interacción de diferentes regiones del Glu-Plasminógeno con β_2 GPI	22
Inhibición competitiva de la interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI por K5-sp	23
Unión y activación del Glu-Plasminógeno en la superficie de células HMEC-1 en la presencia de β_2 GPI	24
Unión de β_2 GPI y Glu-Plasminógeno a superficies de fibrina	24
Activación del Glu-Plasminógeno por SK sobre fibrina en presencia de β_2 GPI	25
Efecto en la expresión de trombomodulina e ICAM-I en células endoteliales activadas con anti- β_2 GPI	25

Modelaje molecular y ensayos de docking	26
Resultados	28
Interacción del Glu-Plasminógeno con β_2 GPI	28
Unión de fragmentos del Glu-Plasminógeno a β_2 GPI	28
Unión de la β_2 GPI a células HMEC-1. Su efecto en la generación de plasmina	29
Activación del Glu-Plasminógeno en la presencia de β_2 GPI sobre una superficie de fibrina	29
Activación de células HMEC-1 por anticuerpos anti- β_2 GPI del isotipo IgG	30
Docking del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI	30
Discusión	37
Bibliografía	41
Artículo: The role of β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) in the activation of plasminogen	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Molécula de la proteína beta-2-glicoproteína I

Figura 2.- Estructura del V dominio de la beta-2-glicoproteína I

Figura 3.- Homología estructural de la apolipoproteína (a) con la molécula del plasminógeno

Figura 4.- Estructura de la molécula del Glu-Plasminógeno

Figura 5.- Unión de Glu-Plasminógeno a la β_2 GPI inmovilizada

Figura 6.- Unión de fragmentos del Glu-Plasminógeno a β_2 GPI inmovilizada

Figura 7.- Activación del Glu-Plasminógeno en la presencia de β_2 GPI sobre la superficie de células HMEC-I

Figura 8.- Activación del Glu-Plasminógeno por SK sobre una superficie de fibrina en la presencia de β_2 GPI

Figura 9.- Presencia de ICAM-I y trombosmodulina sobre la superficie de células endoteliales activadas

Figura 10.- Docking del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI

ABREVIATURAS

AFL	Anticuerpos antifosfolípido
ADP	Adenosina difosfato
apo(a)	apolipoproteína (a)
β_2 GPI	β eta-2-glicoproteína I
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FCS	Suero fetal de ternera
GPL	Unidad de medida para la cantidad de proteína o de fosfolípido que se une a un microgramo de anticuerpo del isotipo IgG
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMEC-1	Células endoteliales de la microvasculatura
ICAM-I	Molécula de adhesión I
IgG	Inmunoglobulina G
LBS	Sitio de unión a lisina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
Lp(a)	Lipoproteína(a)
PBS	Amortiguador de fosfato en solución salina
PC	Proteína C de la coagulación
SAF	Síndrome antifosfolípido
SAFP	Síndrome antifosfolípido primario
SCR	Secuencias repetidas de concensos cortos
SK	Estreptocinasa
TM-FITC	Trombomodulina fluoresceinada
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

La β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI) es una glicoproteína plasmática que ha sido identificada como uno de los principales antígenos reconocidos por los anticuerpos antifosfolípido (AAF), los que asociados a una serie de condiciones clínicas como trombosis arterial o venosa, aborto espontáneo recurrente o trombocitopenia han dado origen al síndrome clínico conocido como Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido (SAF). El mecanismo por medio del cual se produce trombosis en el SAF es desconocido. Se ha propuesto que los AAF interfieren con la formación de los complejos enzimáticos relacionados con la vía de la coagulación sanguínea, lo que sugiere una función importante para la β_2 GPI en éste sistema. Otro sitio de acción sugerido para la intervención de los AAF, es la desregulación del sistema fibrinolítico, en donde el plasminógeno tiene una participación fundamental en la disolución de los coágulos, al ser convertido a plasmina, proteasa de serina encargada de degradar la fibrina. Estructuralmente el plasminógeno es homólogo a la apolipoproteína(a) en relación al dominio de proteasa de serina, así como a los dominios kringle IV y V, a través de los cuales se une a la β_2 GPI.

En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización de la unión entre la β_2 GPI y el Glu-Plasminógeno, así como el efecto que dicha interacción tiene sobre el proceso de activación del plasminógeno, tanto sobre fibrina intacta como sobre la superficie de células endoteliales. En estas condiciones, la unión de Glu-Plasminógeno a β_2 GPI, exhibió un perfil característico de saturación dependiente de la concentración de plasminógeno adicionado. Observamos que la interacción fue inhibida por el análogo de la lisina EACA, así mismo encontramos que el NaCl ejerció un efecto inhibitorio de la unión entre ambas moléculas. Los estudios llevados a cabo con fragmentos del plasminógeno, mostraron una unión del K5-sp con la β_2 GPI. En otra serie de experimentos demostramos que la β_2 GPI incrementa la activación del Glu-Plasminógeno sobre fibrina intacta de una manera dependiente de la concentración de β_2 GPI adicionada. A nivel de la superficie de células HMEC-1 la β_2 GPI interacciona con el Glu-Plasminógeno

incrementando la concentración de plasminógeno en la superficie celular, que al ser activado por el t-PA generado constitutivamente por la célula, resultó en un incremento en la producción de plasmina. Sobre la superficie endotelial el Glu-Plasminógeno es reconocido antigénicamente por anticuerpos dirigidos contra la β_2 GPI, activando a la célula, con un incremento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-I y una disminución de la trombomodulina, molécula fundamental del sistema anticoagulante de la proteína C, cuya desregulación es causa de trombosis.

En conclusión, estos resultados son los primeros que describen la existencia de una interacción entre la β_2 GPI y el Glu-Plasminógeno, que a nivel de la superficie celular incrementa la generación de plasmina, pudiendo ser considerado como una nueva función biológica para la β_2 GPI. Una interferencia con su funcionamiento por AAF puede desregular el sistema fibrinolítico, favoreciendo la generación de un estado protrombótico como el observado en el SAF.

ABSTRACT

β_2 -glycoprotein I (β_2 GPI) is a glycoprotein of unknown physiological function. It is the main target antigen for antiphospholipid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome (APS). β_2 GPI binds with high affinity to the atherogenic lipoprotein Lp(a) which shares structural homology with plasminogen, a key molecule in the fibrinolytic system. Impaired fibrinolysis has been described in APS. The present work reports the interaction between β_2 GPI and Glu-Plasminogen which may explain the recently described proteolytic effect of plasmin on β_2 GPI. In the process of Glu-Plasminogen activation, we found an increase in plasmin generation both at fibrin and cellular surface level as a function of the concentration of β_2 GPI added, suggesting an important role as a cofactor in the trimolecular complex β_2 GPI-Plasminogen-tPA. This phenomenon represents a novel regulatory step both in the positive feedback mechanism for extrinsic fibrinolysis and antithrombotic regulation. IgG anti- β_2 GPI antibodies recognized the β_2 GPI at the endothelial surface, inducing its activation with an increase of ICAM-I and a decrease in the expression of thrombomodulin favoring a pro-thrombotic state in the vascular endothelium. The interference in the plasmin generation by anti- β_2 GPI antibodies could generate thrombosis as observed in APS.

INTRODUCCIÓN

La β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI), también conocida como apolipoproteína H, es una glicoproteína presente en el plasma en una concentración de 20 mg/dL, que está formada por una sola cadena polipeptídica de 326 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 50 kDa (1) Fig 1. El contenido de carbohidratos es de aproximadamente el 18 % de su masa molecular. Por su estructura la β_2 GPI ha sido clasificada como un miembro de la superfamilia de proteínas reguladoras del complemento, las cuales se caracterizan por tener unidades de repetición de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, con cuatro cisteínas altamente conservadas formando dos puentes disulfuro en la posición cys1-3 y cys2-4, denominados dominios SCR (*Short Consensus Repeat*) o módulos CCP (*Complement Control Protein*) (2-3). La β_2 GPI está constituida por cinco de éstos dominios SCR, siendo el quinto dominio rico en residuos de lisina, el cual posee dos cisteínas adicionales que origina la formación de un nuevo puente disulfuro (Fig 2). Adicionalmente, el quinto dominio presenta un segmento peptídico C-terminal de 19 residuos de aminoácidos, que espacialmente dan origen a una área cargada positivamente de aproximadamente 2000 Å, integrada por los grupos R de 12 residuos de lisina, uno de arginina y uno de histidina (4-5).

La función biológica de la β_2 GPI es desconocida. Se ha propuesto que pueda participar de manera importante en el metabolismo de lípidos (6), ya que aproximadamente el 35 % de la β_2 GPI plasmática circula asociada a diferentes fracciones lipoproteicas tales como quilomicrones y lipoproteínas de alta (HDL) y muy baja densidad (VLDL) (7); de la misma manera se ha descrito, que la β_2 GPI promueve la activación *in vitro* de la lipoprotein lipasa (8), así como una depuración incrementada de triglicéridos de acuerdo a los experimentos realizados en modelos murinos (9). Por otra parte, se ha sugerido que la β_2 GPI puede tener una función importante en los procesos de regulación de la coagulación sanguínea, debido a sus propiedades anticoagulantes observadas *in vitro* relacionadas a su capacidad para unirse a fosfolípidos sobre células dañadas (10-

11), así como por sus efectos en la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por adenosinadifosfato (ADP) (12) y por la estimulación de la actividad de protrombinasa a través de plaquetas (13). Similarmente se ha descrito que la β_2 GPI puede unirse a otras estructuras macromoleculares cargadas negativamente diferentes a los fosfolípidos, como lo son el DNA, la heparina y las mitocondrias. (14-15).

Recientemente se ha incrementado el interés por el estudio de la β_2 GPI ya que se le ha identificado como el principal blanco antigénico reconocido por los anticuerpos antifosfolípido (AAF), los que asociados a condiciones clínicas como trombosis arterial o venosa, trombocitopenia o pérdida fetal recurrente han dado origen al síndrome conocido como Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido (SAF)(16). El mecanismo por el cual se produce trombosis en el SAF es desconocido. De acuerdo a las propiedades descritas para la β_2 GPI, se ha hipotetizado que los AAF pueden contribuir a la génesis de las trombosis asociadas al SAF, por interferir con las reacciones de la coagulación dependientes de fosfolípidos o por unirse a plaquetas o a células endoteliales en donde la β_2 GPI puede tener una función importante. Se ha sugerido que la unión de la β_2 GPI a estas células es el resultado de su interacción con los fosfolípidos de membrana, sin embargo, esta proteína sólo se une con una elevada afinidad a fosfolípidos aniónicos con un alto grado de pureza, por lo que, su afinidad por preparaciones fosfolípicas con una composición parecida a aquellas de las membranas celulares es baja (17). Kochl y col. describieron que la β_2 GPI forma un complejo fisiológico con la apolipoproteína(a) de la lipoproteína aterotrombótica Lp(a) a través de los dominios kringle IV tipo 2 (18). Interesantemente, la apo(a) comparte una estrecha homología estructural con la molécula del plasminógeno (19) (Fig 3), proteína central del sistema fibrinolítico, cuya desregulación puede ser causa de trombosis (20). El sistema fibrinolítico comprende una proenzima inactiva, el plasminógeno, que puede ser convertido a la enzima activa, plasmina, la cual degrada la fibrina en péptidos solubles de degradación (20). Estructuralmente el plasminógeno es una proteína modular, que presenta un péptido de preactivación,

seguido por cinco dominios kringle (K1+K2+K3+K4+K5) y un dominio catalítico de proteasa serínica C-terminal (sp) (Fig. 4). Los dominios kringle del plasminógeno poseen sitios de unión a lisina que le permiten unirse específicamente tanto a la fibrina como a superficies celulares (20). La apo(a) contiene de 14 a 37 copias de una secuencia homóloga (75 al 94 %) al kringle 4 del plasminógeno, referidas como KIV y distribuidas en 10 clases designadas del 1 al 10. El último kringle de la apo(a) (KV), comparte un 95 % de homología con el kringle 5 del plasminógeno, seguido por un dominio de proteasa serínica, el cual es 94 % homólogo al del plasminógeno. Aunque el dominio de proteasa de la apo(a) humana conserva la triada catalítica de proteasa serínica, ésta es inactiva proteolíticamente (21). Estudios previos han demostrado que la Lp(a) y la apo(a), se unen con una afinidad relativamente elevada tanto a la fibrina como al fibrinógeno (22). Se ha propuesto que dicha interacción está asociada con los efectos patológicos atribuidos a la Lp(a) en la progresión de la aterosclerosis. De igual manera, se ha hipotetizado que la Lp(a), puede inducir un estado hipercoagulable por inhibir la fibrinólisis en la superficie de la célula endotelial, por lo que estudios dirigidos hacia el análisis del(los) mecanismo(s) involucrado(s) en los efectos protrombóticos, han sugerido que la capacidad antifibrinolítica de la apo(a), puede estar mediada por una inhibición competitiva del sitio de unión del plasminógeno y su activador fisiológico el t-PA, a la fibrina o al fibrinógeno en la superficie de la célula endotelial (22). Recientemente fue descrito que la anexina II, es el receptor en la célula endotelial para la β_2 GPI, el cual interesantemente es el mismo, tanto para el plasminógeno como para el t-PA (23).

Diversos grupos han demostrado que la β_2 GPI, es reconocida en la superficie de la célula endotelial por anticuerpos presentes en el suero o plasma de pacientes con SAF, induciendo la activación celular, lo que en determinadas situaciones puede favorecer la generación de un estado procoagulante. Se ha sugerido que estos efectos (*in vitro*), representan un mecanismo patogénico potencial por medio del cual los anticuerpos antifosfolípido, pueden provocar trombosis *in vivo* (24-25). A pesar de los avances logrados hasta la fecha en el estudio de la β_2 GPI, aún no se ha logrado esclarecer el mecanismo por medio del cual, los anticuerpos

dirigidos contra esta proteína, pueden causar trombosis, así como de cual podría ser la función de la β_2 GPI en el complejo sistema de la coagulación sanguínea.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo por medio del cual los pacientes con anticuerpos antifosfolípido presentan trastornos en la coagulación es desconocido. Uno de los principales antígenos reconocidos por este tipo de anticuerpos, es la proteína plasmática conocida como beta-2-glicoproteína I (β_2 GPI), descubierta en 1961. Se ha descrito que la β_2 GPI, pudiera tener una función importante en la regulación de la coagulación sanguínea por su capacidad para unirse a moléculas cargadas negativamente, como son los fosfolípidos aniónicos. Se ha propuesto, que al formarse el complejo β_2 GPI-fosfolípidos, la molécula de la β_2 GPI experimenta un cambio conformacional, dejando al descubierto sitios ocultos de la molécula que son reconocidos por anticuerpos antifosfolípido y que probablemente, debido a una interferencia de éstos anticuerpos con el sistema de la coagulación sanguínea, el cual depende fundamentalmente de fosfolípidos, se originen las trombosis como las observadas en el SAF. De la misma manera, a la β_2 GPI también se le ha atribuido una función muy importante en el metabolismo de lípidos, por su participación en la depuración de triglicéridos en modelos murinos, así como por ser una parte integrante de las lipoproteínas de varias densidades como las HDL y las VLDL. Se ha reportado que la apolipoproteína (a) de la Lp (a), es capaz de unirse a la β_2 GPI fisiológicamente a través de los dominios kringle IV, desconociéndose su posible significado biológico. Interesantemente la apo(a) comparte una estrecha homología estructural con el plasminógeno, molécula central del sistema fibrinolítico cuya desregulación representa una anomalía hemostática observada comúnmente en trombosis. Dicha homología sugiere igualmente, una posible interacción entre la β_2 GPI y el plasminógeno.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo llevamos a cabo, en un sistema *in vitro*, la evaluación de la interacción de la β_2 GPI con el sistema Plasminógeno-Plasmina (sistema que regula los procesos de coagulación-fibrinólisis) como un posible mecanismo en la generación de trombosis causada por anticuerpos antifosfolípido.

HIPOTESIS

La β_2 -glicoproteína I participa en la regulación de la coagulación sanguínea mediante su interacción con el sistema Plasminógeno-Plasmina formando un complejo molecular con el Glu-Plasminógeno, lo cual permite incrementar la generación de plasmina a nivel de la superficie del endotelio vascular. Una interferencia con éste proceso por anticuerpos antifosfolípido puede favorecer el establecimiento de un estado protrombótico como el observado en pacientes con Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípido.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la interacción de la β_2 GPI con el sistema Plasminógeno-Plasmina, en un sistema *in vitro* utilizando β_2 GPI unida a una placa de poliestireno, así como en presencia de células endoteliales (HMEC-1), valorando la posible participación que pudiera tener la β_2 GPI en la generación de plasmina sobre una malla de fibrina y en la superficie de células HMEC-1 De igual manera, investigar el efecto de los AAF en la activación celular en presencia de β_2 GPI y de plasminógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificación de la β_2 GPI a partir de suero humano.
2. Evaluar la posible unión del Glu-Plasminógeno a la β_2 GPI, tanto en fase sólida unida a una placa de poliestireno como sobre células endoteliales HMEC-1.
3. Determinar la región de la molécula del Glu-Plasminógeno (K1+2+3, K4 ó K5-sp) que interacciona con la β_2 GPI en fase sólida.
4. Evaluar la capacidad de activación del Glu-Plasminógeno en presencia tanto de β_2 GPI en un sistema *in vitro* de fibrinólisis como en la superficie de células endoteliales HMEC-1.
5. Determinar si las gamma globulinas anti- β_2 GPI del isotipo IgG de conejo y/o de pacientes con SAF, son capaces de reconocer antigénicamente tanto al Glu-Plasminógeno como a la β_2 GPI en la superficie de la célula endotelial HMEC-1, activándola.
6. Evaluar las posibles interacciones de los sitios de unión a lisina (LBS) de los dominios kringle 1 y kringle 5 del Plasminógeno con las lisinas superficiales de la β_2 GPI, mediante docking y modelaje molecular.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de proteínas: La purificación de la β_2 GPI se llevó a cabo a partir de suero humano siguiendo el procedimiento descrito por Blank y col. (26), la cual fue considerada pura de acuerdo a los análisis de los estudios realizados en electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y por inmunoblot. El **Glu-Plasminógeno** lo adquirimos de Roche Molecular Biochemical de Alemania y lo biotinilamos de acuerdo a la técnica descrita por Monroy y col. (27). Para la obtención de los **fragmentos del Glu-Plasminógeno** K1+2+3 (sitio de enlace a lisina I o LBS I), K4 (kringle 4) y K5-sp (kringle 5 y el dominio de proteasa de serina o miniplasminógeno), el Glu-Plasminógeno se sometió a una digestión con elastasa porcina, tomando como base el procedimiento técnico descrito por Sottrup-Jensen y col. (28), y cada uno de los fragmentos obtenidos se les unió biotina covalentemente de acuerdo al procedimiento descrito por Monroy y col. (27). El Fibrinógeno lo adquirimos de Sigma, USA.

Anticuerpos. La IgG humana con actividad específica de anti- β_2 GPI, la obtuvimos a partir de una colección de sueros de pacientes pediátricos con Síndrome Antifosfolípido Primario (SAFP), definido de acuerdo a los criterios establecidos por Alarcón Segovia y col. (29). Estos sueros mostraron una especificidad positiva anti- β_2 GPI determinada por ELISA (INOVA Diagnostic, USA) mayor a 150 unidades de antifosfolípido (GPL), con ninguna reactividad hacia la cardiolipina, fosfatidilserina o protrombina. Como control se usó una mezcla de sueros obtenidos a partir de personas sanas. Los anticuerpos policlonales de conejo con actividad de anti- β_2 GPI los preparamos por inmunización de un conejo blanco Nueva Zelanda, al cual se le aplicaron cuatro inyecciones subcutáneas (una cada semana) de β_2 GPI, a una concentración de 1 mg/mL disuelta en adyuvante completo de Freund. La especificidad del antisuero hacia la β_2 GPI se corroboró mediante inmunoblot. Las IgG de pacientes, sujetos sanos así como de conejo se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando proteína A unida covalentemente a Sepharosa 4B (Sigma USA).

Ensayos de unión Glu-Plasminógeno- β_2 GPI. La interacción entre el Glu-Plasminógeno y la β_2 GPI se evaluó usando β_2 GPI inmovilizada a una placa de poliestireno de alta capacidad de fijación (Costar, USA), como se describe a continuación: En cada uno de los pozos de la placa de microtitulación, se agregaron 80 μ L de una solución de β_2 GPI ajustada a una concentración de 5 μ g/mL en amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M pH 7.4, incubándose toda la noche a 4 °C. La proteína que no se unió a la placa se desechó y entonces adicionamos 100 μ L/pozo, de una solución de albúmina sérica bovina disuelta en PBS, con el objeto de bloquear los sitios en la superficie de la placa no ocupados por la β_2 GPI y evitar uniones inespecíficas, dejándose en reposo durante 2 h a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó por tres ocasiones con PBS para después agregar un volumen de 80 μ L/pozo de Glu-Plasminógeno biotinilado en concentraciones variables (0-16 μ M), disuelto en amortiguador de fosfato 0.05 M pH 7.4 conteniendo Tween 20 al 0.01 % y timerosal al 0.01 % (buffer A) e incubándose con la proteína inmovilizada durante 1 h a 37 °C. El Glu-Plasminógeno que no se unió a la β_2 GPI lo descartamos lavando la placa tres veces con buffer A. Posteriormente adicionamos a cada uno de los pozos, un volumen de 80 μ L de un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Sigma, USA) diluido 1:8000, incubando la mezcla de reacción durante 1 h a 37 °C. El conjugado que no reaccionó se descartó, para luego adicionar una solución de 1 mg/mL de 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB, Sigma USA) como sustrato para el desarrollo de color, incubando la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Al final del periodo de incubación se midió la absorbancia a 450 nm en un lector para placas de ELISA (LabSystem, USA). Con el objeto de detectar posibles enlaces no específicos, utilizamos como control BSA inmovilizada sobre una placa de microtitulación. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado y los resultados obtenidos fueron analizados ajustando los datos a una curva no lineal por el método de mínimos cuadrados usando el programa de computo Kaleidagráfic (Synergy Software, USA)

Inhibición de la Interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI. El plasminógeno interacciona con otras moléculas a través de los sitios de unión a lisina presentes

en los dominios kringle, por lo cual evaluamos el efecto inhibitorio que puede tener el ácido épsilon amino caproico (EACA), un análogo de la lisina, en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI. Los ensayos se llevaron a cabo manteniendo constante la concentración de Glu-Plasminógeno y variando la del EACA, como se describe a continuación. A los pozos de una placa con β_2 GPI inmovilizada, se les adicionó un volumen de 80 μ L/pozo, de una mezcla de Glu-Plasminógeno biotinilado a una concentración constante de 2.5 μ M y concentraciones variables de EACA (0-40 mM) disueltos en buffer A, dejándose incubar durante 1 h a 37 °C. Después del periodo de incubación, la placa la lavamos por tres ocasiones con buffer A y el Glu-Plasminógeno unido a la β_2 GPI fue detectado como se indicó anteriormente en el experimento de unión del Glu-Plasminógeno a la β_2 GPI. Experimentos similares se llevaron a cabo manteniendo constante la cantidad de EACA (40 mM) disuelto en buffer A y variando la concentración de Glu-Plasminógeno (0-16 μ M).

Con el objeto de evaluar la participación de las interacciones iónicas en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI, se llevaron a cabo ensayos usando NaCl disuelto en buffer A. En éstos experimentos se mantuvo constante la concentración de Glu-Plasminógeno (2.5 μ M), variando la cantidad de NaCl (0-1000 mM). El Glu-Plasminógeno unido a la β_2 GPI se determinó como se describió anteriormente.

Evaluación de la participación de lisinas C-terminales en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI. Con el objeto de evaluar la participación de las lisinas C-terminales en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI debido a la posible existencia de β_2 GPI cortada (la cual se encuentra escindida entre los residuos de aminoácidos Lys317 y Thr318) se llevaron a cabo ensayos de docking como se describe en la sección “Modelaje molecular y ensayos de docking”.

Interacción de diferentes regiones del Glu-Plasminógeno con β_2 GPI. Con el objeto de investigar la región del Glu-Plasminógeno que interacciona con la β_2 GPI, llevamos a cabo varios ensayos usando los diferentes fragmentos del Glu-

Plasminógeno obtenidos mediante digestión con elastasa (K1+2+3, K4 y K5-sp) y β_2 GPI inmovilizada en placas de microtitulación preparada como describimos en la sección donde se investigó la interacción β_2 GPI-Glu-Plasminógeno. Estos experimentos los realizamos agregando a la proteína inmovilizada, un volumen de 80 μ L/pozo de cada uno de los fragmentos biotinilados en concentraciones variables (0-8 μ M), disueltos en forma separada en buffer A. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, lavamos las placas tres veces con buffer A y la cantidad de proteína unida a la β_2 GPI la detectamos adicionando un conjugado de estreptavidina unido a peroxidasa diluido 1:8,000 que después de adicionarle TMB como sustrato, se produce una reacción colorida, la cual se midió como describimos en la sección anterior. Como control utilizamos BSA inmovilizada en las placas de microtitulación.

Inhibición competitiva de la interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI por K5-sp.

El efecto que puede tener el fragmento K5-sp en la unión del Glu-Plasminógeno a la β_2 GPI, lo analizamos llevando a cabo ensayos de inhibición competitiva entre el Glu-Plasminógeno y K5-sp por la β_2 GPI. Con este objetivo, adicionamos a la β_2 GPI inmovilizada, un volumen de 80 μ L/pozo de una concentración constante Glu-Plasminógeno biotinilado (0.5 μ M) disuelto en buffer A conteniendo concentraciones variables de K5-sp (0-8 μ M), incubándose durante 1 h a 37 °C. Después del periodo de incubación, lavamos la placa por tres ocasiones con buffer A y la cantidad de Glu-Plasminógeno unido a la β_2 GPI fue detectado utilizando el conjugado de estreptavidina peroxidasa como se describió en la sección anterior.

Unión y activación del Glu-Plasminógeno en la superficie de células HMEC-1 en la presencia de β_2 GPI.

La posible función biológica de la interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI a nivel celular, la evaluamos de acuerdo a la formación de este complejo en la superficie de células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1), las cuales fueron cultivadas en placas de 96 pozos, a una temperatura de 37 °C y en un ambiente de 5 % de CO₂, utilizando como medio de cultivo MCDB (Gibco Invitrogen Corp. Grand Island, NY. USA) suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10 %, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de

penicilina, 250 μg de anfotericina B y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acetato de hidrocortisona (Sigma, USA). Previo a cada experimento, las células se incubaron por un periodo de 24 h en medio de cultivo libre de FCS y entonces adicionamos un volumen de 80 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de concentraciones variables de $\beta_2\text{GPI}$ (0-500 nM) disuelta en medio de cultivo sin FCS, incubándose durante 3 h a 37 °C. Posteriormente lavamos las células tres veces con medio de cultivo libre de FCS y la $\beta_2\text{GPI}$ unida a la célula fue detectada con un anticuerpo policlonal anti- $\beta_2\text{GPI}$ obtenido en conejo. Como anticuerpo secundario se utilizó, un anticuerpo policlonal anti IgG de conejo obtenido en cabra y unido a peroxidasa, usando TMB como sustrato, midiendo el color desarrollado, producto de la reacción con la peroxidasa como se describió en la sección previa. Como control, nosotros realizamos experimentos en ausencia de $\beta_2\text{GPI}$.

Para los estudios de activación del Glu-Plasminógeno en la superficie celular en presencia de $\beta_2\text{GPI}$ (5 nM), llevamos a cabo experimentos similares a los descritos inicialmente en esta sección, para ello, después del proceso de lavado de las células, en lugar de proceder a identificar la $\beta_2\text{GPI}$ unida a la célula, nosotros adicionamos 80 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de diferentes concentraciones de Glu-Plasminógeno (0-5 μM) disuelto en medio de cultivo sin FCS, el cual contenía el sustrato cromogénico acetato de tosyl-glycyl-prolyl-lysine-4-nitroanilina (Chromozym PL, Roche Molecular Biochemicals, Germany) a una concentración de 1.5 mM. La cinética de formación de plasmina se determinó a 37 °C, midiendo la velocidad de liberación de p-nitroanilina del sustrato cromogénico Chromozym PL a 405 nm. Como control, se realizaron ensayos paralelos de activación en la ausencia de $\beta_2\text{GPI}$.

Unión de $\beta_2\text{GPI}$ y Glu-Plasminógeno a superficies de fibrina. Con el objeto de investigar si la $\beta_2\text{GPI}$ se une a la fibrina intacta, se prepararon placas de fibrina por tratamiento con trombina del fibrinógeno unido a la superficie de una placa de poliestireno de alta capacidad de fijación, de acuerdo a la metodología descrita por Monroy y col (27). Los experimentos se llevaron a cabo adicionando a la superficie de fibrina, 80 μL por pozo de diferentes concentraciones de $\beta_2\text{GPI}$ (0-800 nM), disuelta en buffer A e incubándose durante 1 h a 37 °C. Posteriormente las placas

se lavaron por tres ocasiones con buffer A y la proteína unida a la fibrina se detectó con la ayuda de un anticuerpo policlonal anti- β_2 GPI obtenido en conejo. Se utilizó como anticuerpo secundario una IgG anti-conejo obtenido en cabra conjugada a peroxidasa, midiendo el color desarrollado como ha sido descrito en secciones previas. Como control se llevaron a cabo ensayos paralelos en ausencia de β_2 GPI.

Activación del Glu-Plasminógeno por SK sobre fibrina en presencia de β_2 GPI.

En presencia de fibrina intacta, la estreptocinasa (SK) puede efectivamente convertir el Glu-Plasminógeno a la enzima activa plasmina, motivo por el cual evaluamos la posible generación de plasmina en presencia de SK y β_2 GPI sobre una malla de fibrina. Estos ensayos se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Monroy y col. (27). Para este propósito, las mallas de fibrina, preparadas como se describió en la sección previa, fueron lavadas por tres ocasiones con buffer A e incubadas durante 30 min a 37 °C con 100 μ L de buffer de Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 conteniendo como conservador azida de sodio al 0.01 %. Después del periodo de incubación, adicionamos a cada uno de los pozos con fibrina 5 μ L de Glu-Plasminógeno (0.5 μ M), 4 μ L de SK (SK, 500 I:U:/mL) y 2 μ L de β_2 GPI a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 nM) e inmediatamente depositamos 25 μ L (9.7 mg/mL) del sustrato cromogénico específico para plasmina (Chromozym PL), midiendo el cambio de absorbancia a 405 nm cada 5 minutos, durante un periodo de 50 minutos. En este experimento, el incremento en la actividad amidolítica es directamente proporcional a la cantidad de plasmina generada por la muestra. Un ensayo similar realizado en ausencia de β_2 GPI fue usado como control.

Efecto en la expresión de trombomodulina e ICAM-I en células endoteliales activadas con anti- β_2 GPI. Con el objeto de investigar la activación de células endoteliales por anticuerpos anti- β_2 GPI de origen humano o de conejo, cultivamos células HMEC-1 como previamente se describió, sólo que en ésta ocasión el cultivo se realizó en una caja de petri de plástico de 60 mm de diámetro. Previo a cada uno de los experimentos, monocapas confluentes de 5×10^5 células las privamos de suero fetal de ternera por un periodo de 24 h, para posteriormente

adicionar (en ensayos separados), 3 mL/placa de Glu-Plasminógeno (55 nM) ó β_2 GPI (100 nM) disueltos en medio de cultivo libre de suero fetal de ternera. Después de 2 h de incubación a 37 °C, la proteína que no se unió a las células fue desechada. Posteriormente, agregamos 3 mL/placa de IgG anti- β_2 GPI (100 μ g/mL) de humano o de conejo, incubándose por 10 h a 37 °C. Los anticuerpos anti- β_2 GPI que no reaccionaron los removimos lavando las células dos veces con medio de cultivo libre de FCS. Las células adheridas a la placa de cultivo se despegaron con EDTA 30 μ M por 10 min a 37 °C, resuspendiéndolas en 1 mL de PBS para ser analizadas mediante citometría de flujo (Coulter EPICS[®]XL). La trombomodulina (TM) fue detectada con ayuda de un anticuerpo policlonal obtenido en conejo y conjugado a fluoresceína (diluido 1:5000) (TM-FITC, Santa Cruz, USA). La molécula de adhesión ICAM-I (CD54) se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD54-FITC (Sigma USA) obtenido en ratón el cual fue diluido 1:10,000. Para evaluar la activación celular no específica por contaminación con endotoxina, se llevaron a cabo ensayos similares en presencia de polimixina B (5 μ g/mL; Sigma, USA). Como control de activación celular se realizaron experimentos paralelos en presencia de TNF- α .

Modelaje molecular y ensayos de docking. Con la finalidad de determinar los posibles sitios de interacción dependientes de lisina entre la β_2 GPI y el plasminógeno, llevamos a cabo una evaluación de las lisinas expuestas en la superficie molecular de la β_2 GPI (Clave PDB 1C1Z (30)), tomando como referencia la interacción lisina-sitio de unión a lisina presente en el complejo homodimérico de la estructura reportada para el kringle 2 del activador tisular del Plasminógeno (t-PA. No. de acceso 1TPK), el cual es un modelo funcional de interacción entre dominios kringle y una lisina no carboxilo terminal. Cada lisina presente en la β_2 GPI intacta se analizó tomando en cuenta las siguientes características estructurales: 1) la lisina debería encontrarse en una asa, 2) contar con un grupo ceto expuesto y 3) un área accesible de 130 Å² (este valor se determinó a partir de mediciones en el complejo Lys-K2 del t-PA, utilizando el programa Naccess (31) el cual toma en consideración un área 30 % menor al área de interfase). Las lisinas detectadas mediante este análisis se utilizaron en un

ensayo de docking entre la β_2 GPI y el dominio kringle 1 de la plasmina (P1m, 1HPG). Así mismo, se evaluaron las interacciones entre la microplasmina (No. de acceso 1BUI) y la β_2 GPI en el sitio de corte comprendido entre los residuos 317 y 318, para ello se consideraron las conformaciones posibles del asa antes y después del corte. En ambos casos fue necesario modelar esta asa en la conformación canónica asociada con los sustratos de proteasas serínicas.

El afinamiento de los complejos resultantes se llevó a cabo de acuerdo con la metodología reportada previamente por Selisko y col. (32), con ayuda del programa X-PLOR (33). Inicialmente los complejos se sometieron a minimización de energía (parámetros: 200 pasos, gradiente energético 40.0 kcal/mol, energía armónica 40.0 kcal/mol \AA^2) y dinámica molecular ($C\alpha$ fijos, time step 0.5 fs, 200 pasos, temperatura inicial 300 °K). La siguiente fase consistió en 50 ciclos de minimización de energía de cuerpo rígido (50 pasos, gradiente energético inicial 0.1 kcal/mol, cada dominio considerado como un cuerpo rígido) alternada con dinámica molecular ($C\alpha$ fijos, time step 0.2 fs, 200 pasos, temperatura inicial 300 °K). Finalmente, todos los complejos se sometieron a minimización de energía con ayuda de la suite InsightII, módulo DISCOVER (force field CVFF, capa de agua de 5.0 \AA) hasta que el máximo derivativo se encontró por debajo de 0.01 kcal.

RESULTADOS

Interacción del Glu-Plasminógeno con β_2 GPI. Con el objeto de demostrar la interacción entre el Glu-Plasminógeno y la β_2 GPI llevamos a cabo una serie de ensayos de asociación disociación de estas proteínas como se ha especificado en “Materiales y métodos”. Nuestros resultados demuestran que la molécula del Glu-Plasminógeno efectivamente puede unirse a la β_2 GPI, siendo esta interacción saturable y dependiente de concentración (Fig. 5a), lo cual sugiere que ambas proteínas interactúan específicamente. Adicionalmente, para evaluar si la unión llevada a cabo entre el Glu-Plasminógeno y la β_2 GPI es mediada por sitios de unión a lisina (LBS), realizamos ensayos de inhibición en la presencia de EACA. Como puede observarse en la Fig 5b, la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI es inhibido por el EACA de una manera dependiente de concentración, indicando la participación de lisinas en la interacción. De igual manera, nosotros encontramos un efecto inhibitorio del EACA sobre la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI cuando el experimento se llevó a cabo en presencia de diferentes concentraciones de Glu-Plasminógeno (0-16 μ M) manteniendo constante la del EACA (40 mM) Fig. 5d. Para detectar la posible participación de interacciones iónicas, llevamos a cabo ensayos de inhibición en presencia de diferentes cantidades de NaCl (0-1000 mM) observando que el NaCl es capaz de producir un efecto inhibitorio en la formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI (Fig. 5c) evidenciando la presencia de enlaces iónicos en la interacción llevada a cabo entre ambas moléculas.

Unión de fragmentos del Glu-Plasminógeno a β_2 GPI. Para investigar la región del Glu-Plasminógeno que interactúa con la β_2 GPI, llevamos a cabo ensayos con diferentes fragmentos del plasminógeno obtenidos por digestión con elastasa porcina. Nuestros resultados indican que la región que comprende el K1+2+3 (LBS I), interactúa débilmente con la β_2 GPI, observando que el K4 no participa en la interacción (Fig. 6a). Sin embargo, la unión más importante fue observada con el miniplasminógeno. Estos resultados sugieren que las interacciones lisina dependientes entre Glu-Plasminógeno y β_2 GPI se llevan a cabo principalmente

con el fragmento K5-sp o miniplasminógeno. Adicionalmente llevamos a cabo estudios de competencia entre K5-sp y el Glu-Plasminógeno por la β_2 GPI. En estas condiciones observamos que efectivamente el K5-sp compite con el Glu-Plasminógeno por la β_2 GPI (Fig. 6c). Para evaluar la posible participación de lisinas en la formación del complejo K5-sp- β_2 GPI, llevamos a cabo ensayos en la presencia de diferentes concentraciones de EACA (0-40 mM) manteniendo constante la cantidad de miniplasminógeno. Sobre estas condiciones nosotros encontramos que el EACA inhibió hasta en un 95 % la interacción del miniplasminógeno con la β_2 GPI (Fig. 6b)

Unión de la β_2 GPI a células HMEC-1. Su efecto en la generación de plasmina.

La posible función biológica de la interacción Glu-Plasminógeno- β_2 GPI a nivel celular se evaluó induciendo la formación de éste complejo en la superficie de células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1), las cuales constitutivamente expresan el activador tisular del plasminógeno (t-PA). Con este propósito, inicialmente determinamos la interacción de β_2 GPI con las células HMEC-1 y encontramos un incremento de la unión de esta proteína a la superficie de la célula dependiente de la concentración de β_2 GPI adicionada (Fig. 7a). Por lo que, con el objeto de demostrar la generación de plasmina a partir del Glu-Plasminógeno unido a la β_2 GPI sobre la superficie de las células HMEC-1, llevamos a cabo ensayos de activación a nivel celular de acuerdo a lo descrito en la sección de "Materiales y métodos". Nuestros resultados demuestran un incremento en la cantidad de plasmina generada dependiente de la concentración de β_2 GPI presente en la superficie celular (Fig. 7b) comparado con el obtenido en ausencia de esta proteína. Esto datos sugieren que la β_2 GPI puede generar sitios de unión adicionales para la plasmina y/o el Glu-Plasminógeno a nivel de la superficie de células endoteliales.

Activación del Glu-Plasminógeno en la presencia de β_2 GPI sobre una superficie de fibrina. Para evaluar si el Glu-Plasminógeno puede ser activado por SK sobre una malla de fibrina intacta en presencia de β_2 GPI, llevamos a cabo ensayos de activación variando la cantidad de β_2 GPI (25-100 nM) y manteniendo

constante la concentración de Glu-Plasminógeno (0.5 μ M). El modelo de superficie de fibrina usado en estos experimentos nos permitió determinar la formación de plasmina, midiendo el progreso de la hidrólisis de un sustrato cromogénico específico para esta enzima. Inicialmente exploramos si la β_2 GPI puede unirse a la superficie de fibrina. Los resultados obtenidos muestran que la β_2 GPI se une específicamente a la fibrina de una manera dependiente de concentración (Fig. 8a). Por otra parte, también observamos un incremento en la generación de plasmina dependiente de la concentración de β_2 GPI adicionada (Fig 8b) lo cual sugiere una posible función para esta proteína de cofactor en el sistema plasminógeno-plasmina.

Activación de células HMEC-1 por anticuerpos anti- β_2 GPI del isotipo IgG. La activación de células endoteliales por anticuerpos anti- β_2 GPI del isotipo IgG en presencia tanto de β_2 GPI como de Glu-Plasminógeno se determinó por la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-I o trombosmodulina (TM) en la superficie celular mediante citometría de flujo. Observamos (Fig 9a-b) que el Glu-Plasminógeno y la β_2 GPI fueron reconocidos en la superficie de células HMEC-1 por los anticuerpos anti- β_2 GPI induciendo su activación, la cual se determinó mediante el incremento en la expresión de las moléculas ICAM-I (Fig. 9a) y la disminución de trombosmodulina (Fig. 9b) molécula reguladora del sistema anticoagulante de la proteína C cuya disminución puede ser causa de trombosis. Para evitar una posible activación celular inespecífica debido a contaminación por endotoxina, se llevaron a cabo ensayos similares en presencia de polimixina B (5 μ g/mL) sin observar diferencias con los resultados obtenidos en ausencia de polimixina B.

Docking del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI. Con el objetivo de caracterizar las interacciones dependientes de lisina entre la β_2 GPI y el Glu-Plasminógeno llevamos a cabo el análisis de estas interacciones mediante docking y modelaje molecular (34). Nuestros datos revelaron que solo los residuos Lys268 y Lys324 cumplieron los requerimientos necesarios para una interacción lisina-LBS de acuerdo a los datos obtenidos a partir del complejo homodimérico formado entre

dos dominios kringle del t-PA. Adicionalmente, la evaluación de la interface en el complejo μ Plm- β_2 GPI indicó que el residuo de Lys268 forma parte de la interface molecular, lo cual deja a la Lys324 como el único residuo capaz de interactuar con el kringle I del plasminógeno sin causar un impedimento estérico durante la ruptura entre los residuos Lys317-Thr318 (Fig. 10a). Basados tanto en los resultados experimentales que muestran la presencia de interacciones iónicas en el complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI (Fig. 4c), como en la descripción de un sitio susceptible de corte en el dominio V de la β_2 GPI por plasmina (35), llevamos a cabo un segundo ensayo de docking para caracterizar los residuos que interaccionan en el complejo microplasmina- β_2 GPI (Fig. 10b). La formación de la interface requiere de una modificación conformacional de la β_2 GPI entre los residuos 309 a 322. Debido a la proximidad de la interface, es posible que las interacciones iniciales entre Lys324 y el dominio kringle I del plasminógeno facilite y establezca el docking del dominio V de la β_2 GPI con la plasmina en la generación de β_2 GPI cortada (N- β_2 GPI). Una vez que el enlace peptídico entre la Lys317-Thr318 es cortado, las lisina C-ter en la β_2 GPI puede interactuar con los dominios kringle del plasminógeno (Fig. 10c).

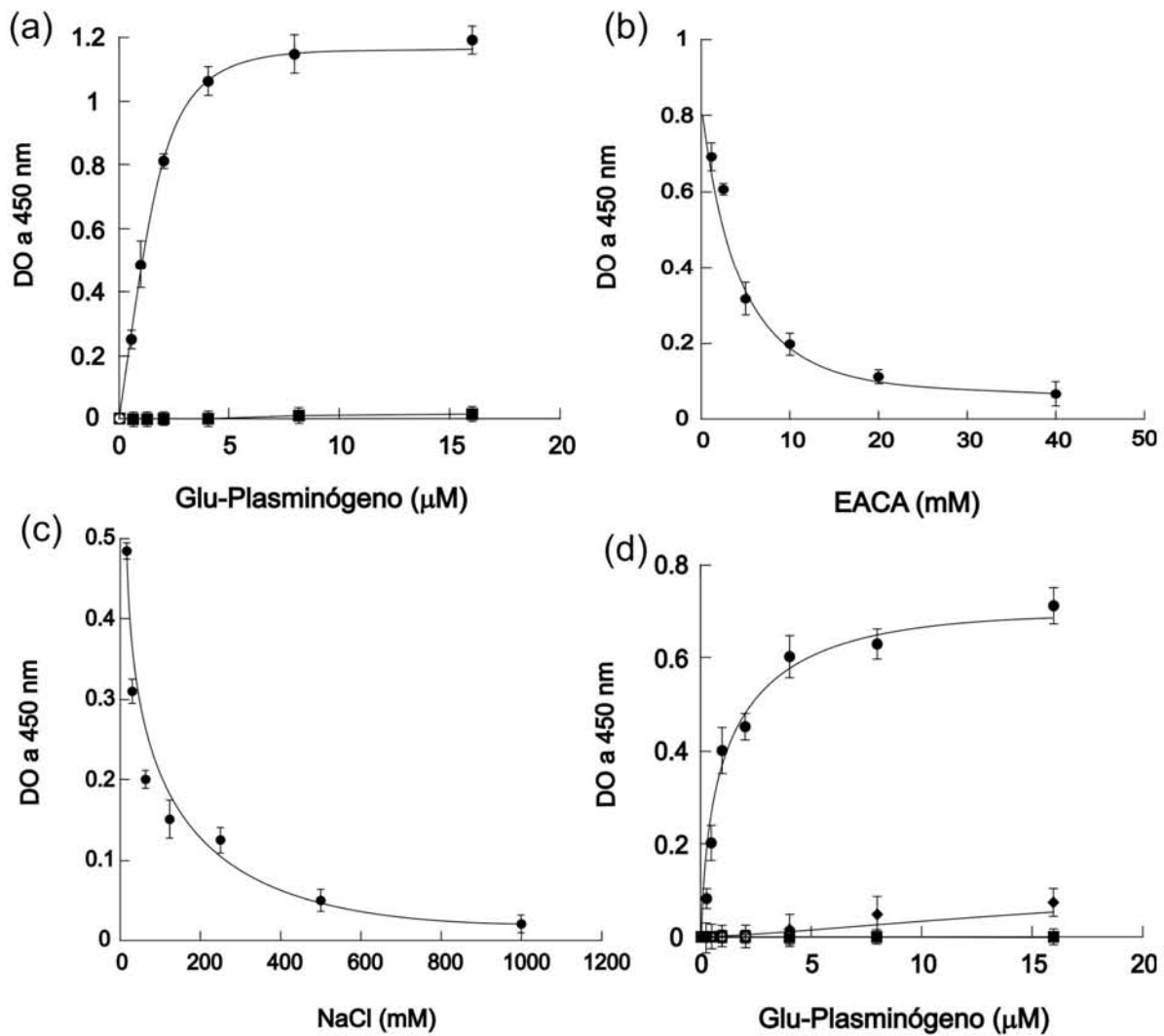


Figura 5. Unión de Glu-Plasminógeno a la β_2 GPI inmovilizada. (a) Diferentes concentraciones de Glu-Plasminógeno biotinilado (0-16 μ M) fueron adicionados a una cantidad constante de β_2 GPI (5 μ g/mL) inmovilizada sobre una placa de poliestireno de alta capacidad de fijación detectando el Glu-Plasminógeno unido a β_2 GPI (círculos cerrados) usando estreptavidina unida a peroxidasa. BSA fue usada como control (cuadros cerrados). (b) Inhibición de la unión Glu-Plasminógeno- β_2 GPI (círculos cerrados) por EACA a concentraciones variables (0-40 mM) manteniendo constante la cantidad de Glu-Plasminógeno (2.5 μ M). (c) Inhibición de la unión Glu-Plasminógeno- β_2 GPI a concentraciones variables de NaCl (0-1000 mM) manteniendo constante la cantidad de Glu-Plasminógeno (2.5 μ M). (d) Unión de Glu-Plasminógeno (0-16 μ M) a la β_2 GPI en la presencia (diamantes cerrados) o ausencia (círculos cerrados) de EACA (40 mM).

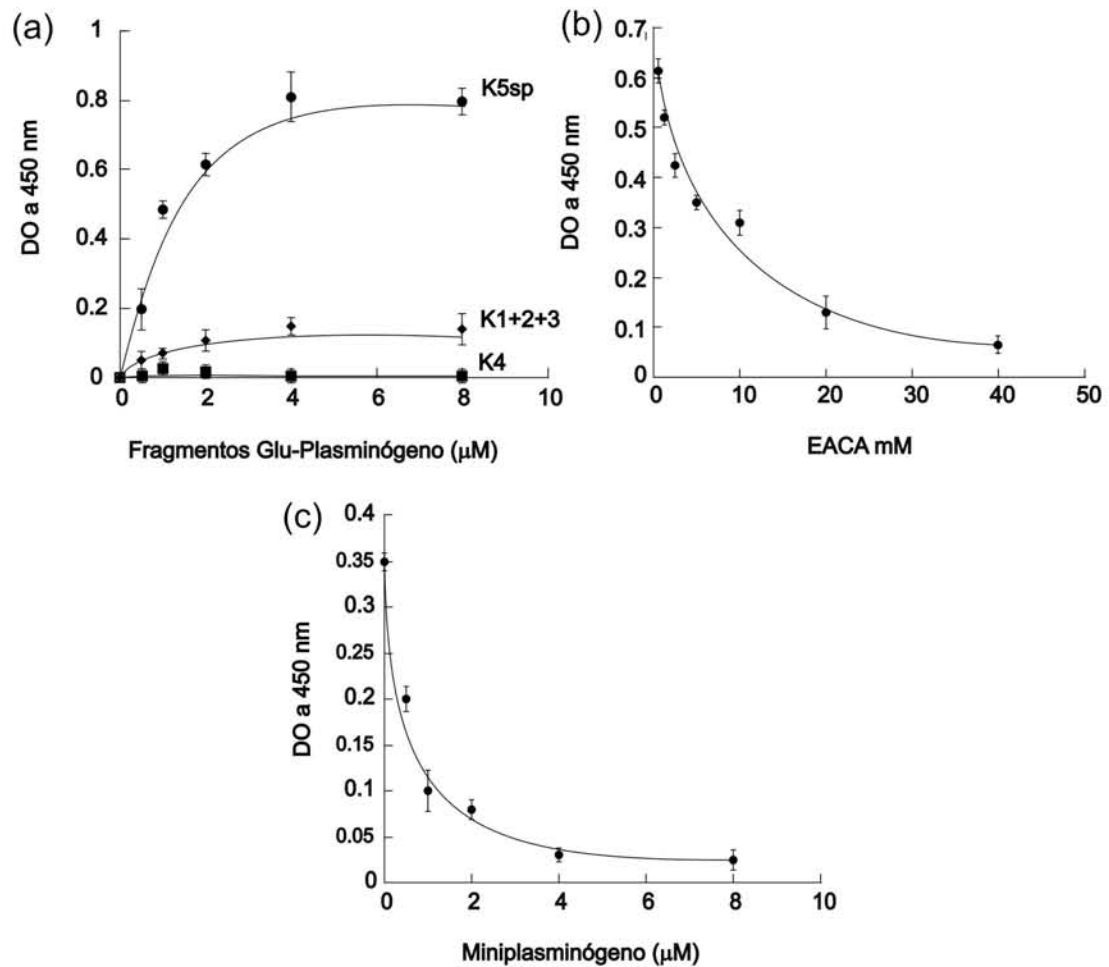


Figura 6. Unión de fragmentos del Glu-Plasminógeno a β_2 GPI inmovilizada. (a) Para identificar la región del Glu-Plasminógeno que interacciona con la β_2 GPI, llevamos a cabo diferentes ensayos con fragmentos del Glu-Plasminógeno biotinilados. Para este propósito adicionamos a la β_2 GPI cantidades variables (0-8 μ M) de cada uno de los fragmentos disueltos en buffer A: K1+2+3 (diamantes cerrados), K4 (cuadros cerrados) o K5-sp (círculos cerrados). La unión de estos fragmentos fue detectado usando un conjugado de estreptavidina peroxidasa. BSA fue usada como control. (b) Ensayos de inhibición de la unión del miniplasminógeno a la β_2 GPI inmovilizada usando una concentración constante de este fragmento (2.0 μ M) y variando la concentración de EACA (0-40 mM). (c) También fueron realizados, ensayos competitivos de unión a la β_2 GPI entre Glu-Plasminógeno (a una concentración constante, 2.5 μ M) y K5-sp (concentraciones variables 0-8 μ M) Datos de todas las gráficas son experimentos por triplicado.

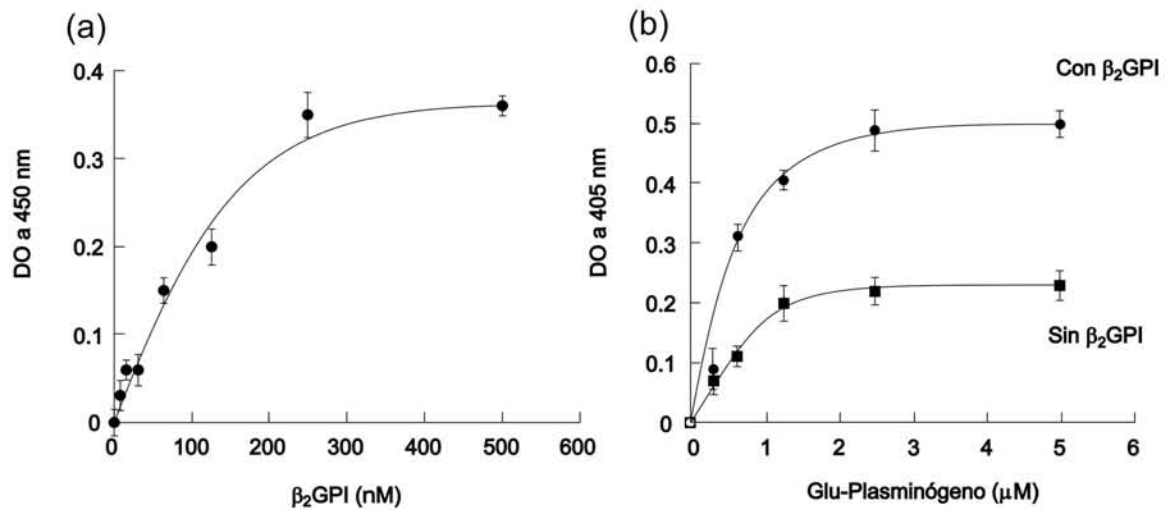


Figura 7. Activación del Glu-Plasminógeno en la presencia de β_2 GPI sobre la superficie de células HMEC-1. (a) Experimentos de unión de la β_2 GPI a células endoteliales HMEC-1, adicionando cantidades variables de β_2 GPI (0-500 nM) disuelta en medio de cultivo libre de suero fetal bovino. (b) Ensayos de formación de plasmina sobre la superficie de células HMEC-1 en presencia de β_2 GPI, como una función de la concentración de Glu-Plasminógeno adicionado. Para este propósito, agregamos a células endoteliales, cantidades variables de Glu-Plasminógeno (0-5 μ M) disuelto en medio de cultivo conteniendo Chromozym PL (1.5 mM) en ausencia (círculos cerrados) o presencia (cuadros cerrados) de β_2 GPI (100 nM). La absorbancia fue determinada a 405 nm.

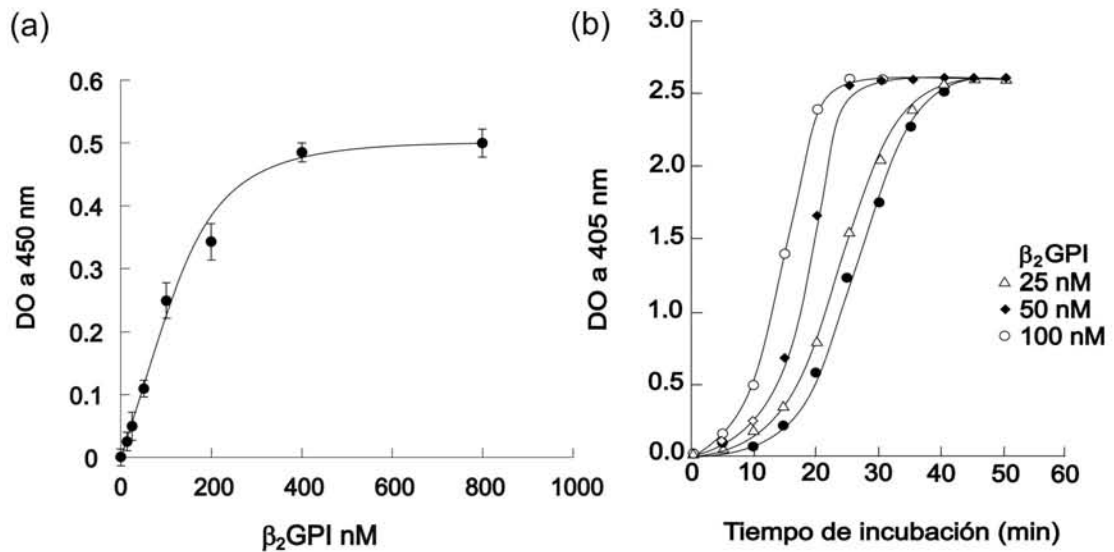


Figura 8. Activación del Glu-Plasminógeno por SK sobre una superficie de fibrina en la presencia de β_2 GPI. (a) Unión de la β_2 GPI (0-800 nM) a la fibrina intacta inmovilizada a placas de poliestireno. (b) Ensayos de activación del Glu-Plasminógeno sobre fibrina intacta en la presencia de cantidades variables de β_2 GPI (0-100 nM) manteniendo constante la de Glu-Plasminógeno (0.5 μ M). Los experimentos fueron realizados en la presencia [círculos abiertos (100 nM), rombos (50 nM) y triangulos abiertos (25 nM)] o en ausencia (círculos cerrados) de β_2 GPI. Las lecturas fueron realizadas cada 5 minutos durante un periodo de 50 minutos.

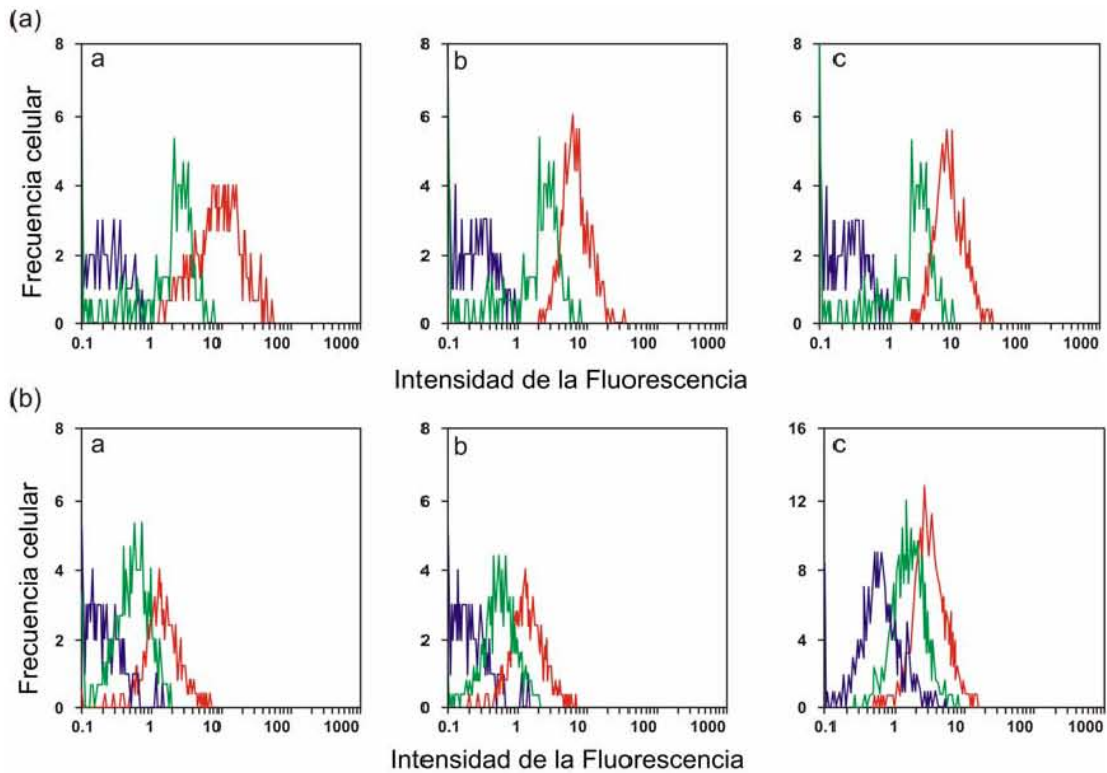


Figura 9. Presencia de ICAM-I y trombomodulina sobre la superficie de células endoteliales activadas. Medida de la intensidad de la fluorescencia por citometría de flujo, de células endoteliales HMEC-1, activadas con anticuerpos anti- β_2 GPI, en la presencia de Glu-Plasminógeno o de β_2 GPI . (a) Células HMEC-1 marcadas con anti-ICAM-1. Control de isotipo (azul). Expresión de ICAM-I en condiciones normales (verde) y sobre células endoteliales activadas (rojo). Panel izquierdo: Expresión de ICAM-I en células HMEC-1 activadas con TNF- α . Panel central, células HMEC-1 activadas con anti- β_2 GPI en la presencia de β_2 GPI . Panel derecho, células HMEC-1 activadas con anti- β_2 GPI en la presencia de Glu-Plasminógeno. (b) Células endoteliales HMEC-1 marcadas con anticuerpos policlonales anti-TM. Control de isotipo (azul), expresión de TM sobre condiciones normales (verde) y expresión de TM sobre células andoteliales activadas (rojo). Panel izquierdo: expresión de TM sobre células HMEC-1 activadas con TNF- α Centro: células HMEC-1 activadas con anti- β_2 GPI en la presencia de β_2 GPI. Derecha: células HMEC-1 activadas con anti- β_2 GPI en la presencia de Glu.-Plasminógeno.

DISCUSION

En el presente trabajo, llevamos a cabo la caracterización de la interacción entre la β_2 GPI y la molécula del Glu-Plasminógeno, con el objeto de evaluar su posible función en la producción de plasmina tanto a nivel celular como en la superficie de fibrina, de tal manera que una posible interferencia por AAF en éste proceso pudiera ser una posible explicación para las trombosis observadas en el SAF. Por otra parte, también evaluamos la activación de células endoteliales por anticuerpos anti- β_2 GPI del isotipo IgG en la presencia de β_2 GPI y de Glu-Plasminógeno.

Uno de los enigmas centrales dentro de la patogenia del SAF, es el conocer el mecanismo por medio del cual los pacientes con AAF tienen un incremento en la tendencia a generar trombosis. Una hipótesis poco estudiada ha sido, la interferencia que pueden tener los AAF con el proceso fibrinolítico como posible causa de hipercoagulabilidad. En este sistema, la conversión del plasminógeno a plasmina, es un evento clave en la disolución de trombos, por lo que una alteración en la fibrinólisis puede ser causa de trombofilia. Se ha descrito que la apo(a), glicoproteína que forma parte de la Lp(a), inhibe la conversión del plasminógeno a plasmina (22). Así mismo, niveles elevados de Lp(a) han sido asociados a la presencia de AAF en SAF (36). La apo(a) comparte una estrecha similitud estructural con la molécula del plasminógeno (19 y Fig. 3), lo cual le permite interactuar con fibrina y proteínas de membrana de la célula endotelial y monocitos, inhibiendo la unión del plasminógeno a sus receptores con la consecuente disminución en la generación de plasmina (22). Interesantemente Kochl y col. (18), han demostrado que la β_2 GPI puede unirse a la apo(a) a través del dominio kringle IV tipo 2, formando un complejo fisiológico, por lo que no es descartable que el plasminógeno también interactúe con la β_2 GPI.

En este trabajo reportamos que la β_2 GPI interactúa con el Glu-Plasminógeno de una manera saturable y específica, similar a la reportada para la unión del plasminógeno a la fibrina parcialmente degradada (20). La formación del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI fue inhibido por EACA, lo cual sugiere la participación de

lisinas en la interacción (Fig. 5b), sin embargo también demostramos que las interacciones iónicas son importantes (Fig. 4c), quizá en la estabilización del complejo. Para determinar cual de las 29 lisinas presentes en la β_2 GPI pueden mediar las interacciones dependientes de lisina, llevamos a cabo ensayos de docking (34) con la molécula completa de la β_2 GPI de acuerdo a la estructura reportada por Schwarzenbacher y col. (30). Nuestros análisis revelaron que solamente los residuos Lys268 y Lys324 poseen las características moleculares necesarias para interactuar con el plasminógeno a través de los LBS de los dominios kringle. Sin embargo, evaluaciones posteriores, indicaron que la Lys268 forma parte de la interface molecular, dejando a la Lys324, localizada en la región del quinto dominio de la β_2 GPI, rico en residuos de lisina, como el único residuo capaz de interactuar con los dominios kringle. Recientemente, Yasuda y col. (37) reportaron que la β_2 GPI cortada (N- β_2 GPI), se une al Glu-Plasminógeno con una $K_d = 0.37 \mu\text{M}$ sugiriendo que ésta interacción puede ser mediada por el grupo de lisinas presentes en el quinto dominio de la N- β_2 GPI y el LBS perteneciente al dominio K5 del Glu-Plasminógeno, lo cual está de acuerdo con nuestros datos de docking. Sin embargo, la posibilidad de que la interacción reportada por Yasuda fuera llevada a cabo por la lisina C-ter 317, presente en la β_2 GPI cortada no puede ser descartada. Por otra parte, para identificar la región del Glu-Plasminógeno que se une a la β_2 GPI, llevamos a cabo diferentes ensayos de asociación disociación usando fragmentos del plasminógeno, observando que el miniplasminógeno (K5-sp) es el fragmento que se une con mayor afinidad a la β_2 GPI. La afinidad similar observada entre la proteína completa y la obtenida a través del K5-sp sugiere que el Glu-Plasminógeno interacciona con la β_2 GPI principalmente a través de éste fragmento. El plasminógeno naturalmente se encuentra circulando en el torrente sanguíneo en una conformación globular o conformación “cerrada”. Para mantener esta conformación, el dominio K5 del plasminógeno interacciona con la lisina 50 del péptido de preactivación, el cual es un sitio probable de anclaje de la región N-terminal del zimógeno a través del LBS (38-39). El LBS del K5-sp tiene una alta afinidad tanto por fibrina intacta como por superficies celulares y su participación en el inicio de las reacciones de fibrinólisis es un evento esencial. La interacción

inicial con residuos de lisina a través de los LBS del Glu-Plasminógeno induce un cambio conformacional de la forma “cerrada” a la “abierta”, promoviendo la accesibilidad a los activadores, como el t-PA, con la consecuente generación de plasmina, enzima proteolítica encargada de disolver los coágulos de fibrina. Esta forma activa de la proteína, simultáneamente degrada fibrina, generando lisinas C-ter en la superficie de fibrina, proporcionando más sitios de unión para el plasminógeno vía kringles 1-2-3 y por lo tanto acelerando el proceso fibrinolítico (38). Estas interacciones pueden ser de relevancia patofisiológica en el SAF, si consideramos que el complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI, al interactuar con los AAF puede ser causa de una disminución en la actividad fibrinolítica. La unión del complejo Glu-Plasminógeno- β_2 GPI tanto a fibrina como a células puede favorecer la localización de la β_2 GPI en éstas superficies en donde es posible que sea cortada por la plasmina a nivel de los residuos de aminoácido Lys317-Thr318, lo cual podría explicar el efecto proteolítico descrito de la plasmina sobre la β_2 GPI (35). La lisina C-ter 317 resultante, puede interactuar con otra molécula de Glu-Plasminógeno a través de sus LBS, favoreciendo la generación de más plasmina. Autoanticuerpos dirigidos contra la β_2 GPI, pueden interferir con este proceso, generando un estado procoagulante, como el observado en pacientes con SAF. En el presente estudio demostramos, que a nivel de la superficie de células endoteliales de la microvasculatura (HMEC-1), la β_2 GPI puede incrementar la generación de plasmina en presencia del t-PA, el cual es constitutivamente producido por este tipo de tejido (Fig. 7b) favoreciendo la posible generación de nuevos sitios de unión para el Glu-Plasminógeno debido a su interacción con la β_2 GPI, lo cual sugiere que la β_2 GPI puede llevar a cabo una función de cofactor en la activación del plasminógeno por el complejo trimolecular β_2 GPI –plasminógeno-tPA, similarmente al reportado para la fibrina (40), ya que el complejo Plg-tPA-fibrina es muy eficiente en la generación de plasmina. Este proceso representa un paso regulador, en el mecanismo de retroalimentación positiva de la fibrinólisis extrínseca y en la regulación antitrombótica.

En otra serie de experimentos, encontramos que los anticuerpos anti- β_2 GPI del isotipo IgG, pueden reconocer ambas moléculas (β_2 GPI y Glu-Plasminógeno) en la

superficie de células HMEC-1 e inducir su activación (determinada por el incremento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-I, Fig. 10a). De la misma manera, la expresión de trombomodulina (una molécula moduladora del sistema anticoagulante de la proteína C) en la superficie endotelial se encontró disminuida (Fig. 10b). Debido a que la trombomodulina es una proteína importante en la regulación de la coagulación sanguínea, bajos niveles de esta proteína han sido asociados a la generación de trombosis (41). Por otra parte, también se ha reportado que la unión de anticuerpos antifosfolípido a la β_2 GPI sobre células endoteliales puede ocasionar activación celular, lo cual induce la expresión de moléculas proinflamatorias y proadhesivas (24-25) generando un estado procoagulante.

En conclusión, en este trabajo demostramos que la interacción entre la β_2 GPI intacta y el Glu-Plasminógeno pueden participar en la generación de plasmina a nivel celular. La producción de plasmina es un evento clave en la fibrinólisis extrínseca; por lo tanto, la regulación de la generación de plasmina es importante para el mantenimiento del balance hemostático *in vivo*. El proceso de generación de plasmina con participación de la β_2 GPI puede representar un nuevo mecanismo de regulación en la fibrinólisis extrínseca en donde la β_2 GPI puede tener una participación fundamental. Finalmente, anticuerpos anti- β_2 GPI pueden interferir con este proceso generando un estado protrombótico como el observado en SAF.

BIBLIOGRAFIA

1. **Kandiah, D. A. y Krilis, S. A.** (1994). β 2-glycoprotein I. *Lupus* 3:207-212
2. **Reid, K. B. M., Bentley, D. R., Campbell, R. D., Chung, L. P., Sim, R. B., Kristensen, T. y Tack, B. F.** (1986). Complement system proteins which interact with C3b or C4b. A superfamily of structurally related proteins. *Immunol. Today* 7:230-234
3. **Reid, K. B. M. y Day, A. J.** (1989). Structure-function relationship of the complement components. *Immunol. Today* 6:177-180
4. **Hunt, J. E., Simpson, R. J. y Krilis, S. A.** (1993). Identification of a region of β 2-glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2141-2145
5. **de Groot, P. G., Bouma, B., Lutters, B. C. H., Simmelink, M. J. A., Derksen, R. H. W. M. y Gros, P.** (2000). Structure-Function studies on β 2-glycoprotein I. *J. Autoimmun.* 15:87-89
6. **Kamboh, M. I. y Ferrel, R. E.** (1991). Apolipoprotein H polymorphism and its role in lipid metabolism. *Adv. Lipid. Res.* 1:9-18
7. **Polz, E. y Kostner, G. M.** (1979). The binding of β 2-glycoprotein I to human serum lipoproteins. Distribution among density fractions. *FEBS Lett.* 102:183-186
8. **Nakaya, Y., Schaefer, E. J. y Brewer, H. B.** (1980). Activation of human post heparin lipoprotein lipasa by apolipoprotein H (β 2-glycoprotein I). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1168-1172
9. **Wurm, H., Beubler, E., Polz, E., Holasek, A. y Kostner, G.** (1982). Studies on the possible function of β 2-glycoprotein I: Influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 31:484-486
10. **Schousboe, I.** (1985). β 2-glycoprotein I: A plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 66:1086-1091

11. **Kandiah, D. A., Sali, A., Sheng, Y., Victoria, E. J., Marquis, D. M., Coutts, S. M. y Krilis, S. A.** (1998). Current insights into the "antiphospholipid" syndrome: clinical, immunological, and molecular aspects. *Adv. Immunol.* 70: 507-563
12. **Nimpf, J., Wurm, H. y Kostner, G. M.** (1987). β 2-glycoprotein I (apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* 63:109-114
13. **Nimpf, J., Bevers, E. M., Bomans, P. H. H. y col.** (1986). Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by β 2-glycoprotein I. *Biochim. Biophys. Acta* 884:142-149
14. **Kroll, J., Larsen, J. K., Loft, H., Ezban, M., Wallevik, K. y Faber, M.** (1976). DNA-binding proteins in Yoshida ascites tumor fluid. *Biochem. Biophys. Acta* 434:490-501
15. **Schousboe, I.** (1983). Characterization of the interaction between β 2-glycoprotein I and mitochondria, platelets, liposomes and bile acids. *Int. J. Biochem.* 12:1393-1401
16. **McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N. y Krilis, S. A.** (1990) Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that induces a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4120-4124
17. **Mehdi, H., Naqvi, A. y Kamboh M. I.** (2000). A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (β 2-glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding. *Eur. J. Biochem.* 267: 1770-1776
18. **Kochl, S., Fresser, F., Lobentanz, E., Baier, G. y Utermann, G.** (1997). Novel interaction of apolipoprotein(a) with β 2-glycoprotein I mediated by the kringle IV domain. *Blood* 90:1482-1489
19. **McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W. J., Eaton, D. L., Chen, E. Y., Fless, G. M., Scanu, A. M. y Lawn, R. M.** (1987). cDNA sequence of

- human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330:132-137
20. **Lijnen, H. R.** (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902:226-236.
21. **Miles, L. A. y Plow, E. F.** (1990). Lp(a): an interloper into the fibrinolytic system?. *Thromb. Haemost.* 63:331-335
22. **Anglés-Cano, E., Hervio, L., Rouy, D., Fournier, C., Chapman, J. M., Laplaud, M. y Koschinsky, M. L.** (1994). Effects of lipoprotein(a) on the binding of plasminogen to fibrin and its activation by fibrin-bound tissue-type plasminogen activator. *Chem. Phys. Lipids.* 67/68: 369-380
23. **Ma, K., Simantov, R., Zhang J-C., Silverstein, R., Hajjar, K. A. y McCrae, K. R.** (2000). High affinity binding of β_2 -glycoprotein I to human endothelial cell is mediated by annexin II. *J. Biol. Chem.* 20:15541-15548
24. **Simantov, R., LaSala, J. M., Lo, S. K., Gharavi, A. E., Sammaritano, L. R., Salmon, J. E. y Silverstein, R. L.** (1995). Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J. Clin. Invest.* 96:2211-2219.
25. **Meroni, P. L., Raschi, E., Camera, M., Testoni, C., Nicoletti, F., Tincani, A., Khamashta, M. A., Balestrieri, G., Trmoli, E. y Hess, D. C.** (2000) Endothelial activation by aPL: a potential pathogenic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J. Autoimmun.* 15(2):237-240
26. **Blank, M., Faden, D., Tincani, A., Kopolovic, J., Goldberg, I., Gilburd, B., Allegri, F., Balestrieri, G., Valesini, G. y Shoenfeld, Y.** (1994). Immunization with anticardiolipin cofactor (Beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *J. Autoimmun.* 7:441-445
27. **Monroy, V., Ruiz, B. H.** (2000). Participation of the dengue virus in the fibrinolytic process, *Virus Genes* 21: 197-208
28. **Sottrup-Jensen, L., Claeys, H., Zajdel, M., Petersen, T. E. y S. Magnusson.** (1978). The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one "mini" plasminogen (MW, 38,000)

- by elastase-catalysed-specific limited proteolysis. *Progress Chem. Fibrinolysis Thrombolysis* 3:191-209
29. **Alarcón-Segovia, D. y Sanchez-Guerrero, J.** (1989). Primary antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 16:482-488
 30. **Schwarzenbacher, R., Zeth, K., Diederichs, K., Gries, A., Kostner, G. M., Laggner, P. y Prassl, R.** (1999). Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J.* 18:6228-6239
 31. **NACCESS** (1996). version 2.1.1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London.
 32. **Selisko, B., Licea, A., Becerril, F. B., Zamudio, F., Possani, L. D. y Horjales, E.** (1999). Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen, *Proteins* 37 130-143.
 33. **Brünger, A. T., Kuriyan, J. y Karplus, M.** (1987). Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science* 235:458-460
 34. **Vakser, I. A.** (1996). Low-resolution docking: prediction of complexes for under-determined structures *Biopolymers* 39:455-464.
 35. **Horbach, D. A., van Oort, E. T., Lisman, T., Meijers, J. C., Derksen, R. H. y de Groot, P. G.** (1999). β_2 -glycoprotein I is proteolytically cleaved in vivo upon activation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 81:87-95
 36. **Atsumi, T., Khamashta, M. A., Andujar, C., Leandro, M. J. Amengual, O., Ames, P. R. J. y Hughes, G. R. V.** (1998). Elevated plasma Lipoprotein(a) level and its association with impaired fibrinolysis in patient with antiphospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 25:69-73
 37. **Yasuda, S., Atsumi, T., Ieko, M., Matsuura, E., Kobayashi, K., Inagaki, J., Kato, H., Tanaka, H., Yamakado, M., Akino, M., Saitou, H., Amasaki, Y., Jodo, S., Amengual, O. y Koike, T.** (2004). Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 103:3766-3772

38. **An, S. S. A., Carreño, C., Marti, D. N., Schaller, J., Albericio, F. y LLinas, M.** (1998). Lysine-50 is a likely site for anchoring the plasminogen N-terminal peptide to lysine-binding kringles. *Protein Sci.* 7:1960-1969
39. **Cockell, C. S., Marshall, J. M., Dawson, K. M., Cederholm-Williams, S. A. y Ponting, C. P.** (1968). Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem J.* 333:99-105
40. **Nesheim, M., Walker, J., Wang, W., Boffa, M., Horrevoets, A. y Bajzar, L.** (2001). Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936:247-260
41. **Esmon, C. T.** (2003). The protein C pathway. *Chest* 124:26S-32S



ELSEVIER

The role of β 2-glycoprotein I (β ₂GPI) in the activation of plasminogen

Francisco López-Lira^{a,b}, Luis Rosales-León^a,
Verónica Monroy Martínez^a, Blanca H. Ruiz Ordaz^{a,*}

^a Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria 04510, México, D.F., México

^b Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Pediatría, SSA, México, D.F., México

Received 9 November 2005; received in revised form 21 December 2005; accepted 22 December 2005

Abstract

β 2-glycoprotein I (β ₂GPI) is a glycoprotein of unknown physiological function. It is the principal target antigen for antiphospholipid antibodies in patients with antiphospholipid syndrome (APS). β ₂GPI binds with high affinity to the atherogenic lipoprotein Lp(a) which shares structural homology with plasminogen, a key molecule in the fibrinolytic system. Impaired fibrinolysis has been described in APS. The present work reports the interaction between β ₂GPI and Glu-Plasminogen which may explain the recently described proteolytic effect of plasmin on β ₂GPI. In the process of Glu-Plasminogen activation, we found an increase in plasmin generation both at fibrin and cellular surface level as a function of the concentration of β ₂GPI added, suggesting an important role as a cofactor in the trimolecular complex β ₂GPI-Plasminogen-tPA. This phenomena represents a novel regulatory step both in the positive feedback mechanism for extrinsic fibrinolysis and in antithrombotic regulation. IgG anti- β ₂GPI antibodies recognized the β ₂GPI at the endothelial surface inducing its activation with an increase of ICAM-1 and a decrease in the expression of thrombomodulin favoring a pro-thrombotic state in the vascular endothelium. The interference in the plasmin conversion by anti- β ₂GPI antibodies would generate thrombosis as observed in APS.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: β 2-glycoprotein; Plasmin; Plasminogen activation; Fibrinolysis; Thrombosis

1. Introduction

Beta-2-glycoprotein I (β ₂GPI), also known as apolipoprotein II, is an abundant human plasma glycoprotein that is found both free and lipoprotein associated forms [1]. It is a single chain protein that consists of 326 amino acids and has a molecular mass of 42 kDa. β ₂GPI is composed of five contiguous domains, four of which are highly homologous and contain ~60 amino acid residues and two disulfide bonds. The fifth domain is aberrant since it contains ~80 amino acids, an extra C-terminal loop and a positively-charged lysine cluster, in particular the regions Cys281 to Cys288 and Ser311 to Lys317 [2]. β ₂GPI has high affinity for negatively charged phospholipids and has been identified as the primary target antigen recognized by circulating autoantibodies in patients with antiphospholipid syndrome (APS), which is clinically characterized by recurrent venous and arterial thrombosis, miscarriages and thrombocytopenia

[3,4]. Different studies have shown that there is a significant correlation between thrombotic manifestations and the presence of anti- β ₂GPI antibodies in these patients [4,5]. However, β ₂GPI has both negative and positive effects on coagulation in vitro since it can inhibit the contact activation pathway of coagulation [6], and the anticoagulant effect of activated protein C [7].

Although the physiological function(s) of β ₂GPI in biological fluids is unknown, a role in lipid metabolism has been suggested by the observations that 30% of plasma β ₂GPI circulates complexed to lipoproteins [1,8] and that β ₂GPI accelerates triglyceride clearance in rat [9]. β ₂GPI also binds with high affinity to the atherogenic lipoprotein Lp(a) by the kringle 4 domains of apo(a) in a specific manner [10]. Apolipoprotein(a) shares extensive sequence homology with plasminogen [11], which is the inactive precursor of the protease plasmin and plays a key role in the blood clot dissolution [12]. Native plasminogen is a single-chain polypeptide of 791 amino acids consisting of an amino-terminal glutamic acid followed by a tandem of five homologous triple-loop structures called kringle domains and a carboxy-terminal serine protease domain. Plasminogen binds to fibrin,

* Corresponding author.

E-mail address: bhro@servidor.unam.mx (B.H. Ruiz Ordaz).

59 and to endothelial vascular cells by the lysine-binding sites
60 (LBS) of the kringle domains [12]. Hunt et al. reported that
61 β_2 GPI is proteolytically cleaved by plasmin [2] between amino
62 acids Lys317–Thr318 generating a nicked β_2 GPI (N- β_2 GPI)
63 with a carboxy-terminal lysine (C-ter lysine), which can function
64 as a possible binding site to plasminogen. In agreement with
65 these concepts and given the striking homology between apo(a)
66 and plasminogen, we hypothesized that plasminogen can bind
67 β_2 GPI, which may be of pathophysiological relevance since
68 both proteins can bind to fibrin and to cell surfaces, and can be
69 recognized by pathogenic anti- β_2 GPI antibodies affecting the
70 function of the plasmin–plasminogen system as a mechanism
71 for the increased incidence of thrombosis observed in patients
72 with APS [5,13]. Therefore, as an initial step in evaluating this
73 hypothesis, we characterized the interaction of Glu-Plasminogen
74 with β_2 GPI as well as its effects on plasmin generation, both at
75 cellular level and at the fibrin surface. Furthermore, we evalu-
76 ated the activation of endothelial cells by anti- β_2 GPI antibodies
77 in the presence of Glu-Plasminogen and β_2 GPI.

78 2. Materials and methods

79 2.1. Proteins

80 β_2 GPI was purified from human serum using the method described by Blank
81 et al. [13] and was considered pure as assessed under non-reducing conditions on
82 SDS–10% polyacrylamide gels. Glu-Plasminogen was obtained from Roche
83 Molecular Biochemical, Germany and biotinylated according to Monroy et al.
84 [14]. Elastase-derived plasminogen fragments: K1+K2+K3 (the lysine binding
85 site 1 or LBS1), K4 (kringle-4) and K5-sp (kringle-5 and the serine protease
86 domain or miniplasminogen) were prepared as described by Sottrup-Jensen et al.
87 [15] and biotinylated as described previously. Fibrinogen and thrombin were
88 purchased from Sigma, USA.

89 2.2. Antibodies

90 Human IgG anti- β_2 GPI was obtained from serum of 32 patients suffering
91 from primary anti-phospholipid syndrome (PAPS) defined according to the cri-
92 teria by Alarcón-Segovia and Sanchez-Guerrero [16] with positive specificity
93 for β_2 GPI determined by ELISA (INOVA Diagnostic, USA) of 150 gamma
94 phospholipid units (GPL). No anti-cardiolipin, anti-phosphatidylserine and anti-
95 prothrombin reactivity were detected. A pool of human serum obtained from
96 five healthy subjects was used as control. Polyclonal rabbit antiserum with anti-
97 β_2 GPI reactivity was produced in our laboratory immunizing a New Zealand
98 white rabbit with four subcutaneous injections (one each week) of purified
99 human β_2 GPI at a concentration of 1 mg/mL in Freund's complete adjuvant
100 (Difco, USA). Four weeks after the last injection, one booster injection was
101 administered with the same amount of β_2 GPI. The specific binding of anti-
102 β_2 GPI in the serum of the immunized rabbit was confirmed by immunoblot
103 assay. IgG from patients or healthy subjects as well as from rabbit were purified
104 by protein A-Sepharose 4 B (Sigma, USA) affinity chromatography.

105 2.3. Binding of Glu-Plasminogen to β_2 GPI

106 The interaction between Glu-Plasminogen and β_2 GPI was evaluated using
107 β_2 GPI immobilized on a microtitre plate as follows: 80 μ L of β_2 GPI adjusted to
108 a concentration of 5 μ g/mL in 0.5 M phosphate buffer pH 7.4 with NaCl 0.15 M
109 (PBS), was incubated overnight at 4 °C on high binding capacity activated
110 polystyrene plates (Costar, USA). Unbound protein was discarded and 100 μ L/
111 well of bovine serum albumin (BSA) dissolved in PBS were added to saturate
112 the plastic surface. After 2 h incubation at 37 °C, the plate was washed three
113 times with PBS and then a volume of 80 μ L/well of biotinylated Glu-
114 Plasminogen at different concentrations (0–16 μ M) in 0.05 M phosphate buffer,
115 pH 7.4 containing, 0.01% Tween 20 and 0.01% thymersol, (buffer A), were

incubated at 37 °C with the immobilized protein for 1 h. Unbound Glu-
Plasminogen was removed by washing the plate three times with buffer A, and 80
 μ L/well of a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma, USA) diluted to 1:8000
was added, incubating for 1 h at 37 °C. The plate was washed as described above
and 1 mg/mL solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma, USA) as
substrate for color development was incorporated and allowed to react for 30 min
at room temperature. We measured the absorbance at $A_{450\text{ nm}}$ using a ELISA
Multiskan plate reader. To detect possible non-specific binding, BSA
immobilized on a microtitre plate was used as control. Each experiment was
performed in triplicate and the obtained results were analyzed by non-linear curve
fitting using the least squares method (Kaleidagraphic V.4, Synergy Software).

127 2.4. Inhibition of the Glu-Plasminogen β_2 GPI interaction

128 To characterize the interaction of Glu-Plasminogen and β_2 GPI we probed
129 the inhibitory effect of epsilon amino caproic acid (EACA) in the formation of
130 the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex. We used a high binding capacity
131 polystyrene plate (Costar, USA) with covalently bound β_2 GPI, prepared as
132 indicated above. The assays were performed adding 80 μ L per well of
133 biotinylated Glu-Plasminogen at constant concentration (2.5 μ M) in buffer
134 A containing varying concentrations of EACA (0–40 mM), and incubating
135 for 1 h at 37 °C. After incubation, the plate was washed three times with buffer A
136 and bound Glu-Plasminogen was detected as previously indicated. Parallel
137 assays were performed keeping constant the amount of EACA (40 mM) and
138 varying the concentration of Glu-Plasminogen (0–16 μ M). Likewise, similar
139 experiments were performed keeping constant the amount of Glu-Plasminogen
140 (2.5 μ M) and different concentrations of NaCl (0–1000 mM).

141 2.5. Evaluation of C-ter Lysines participation in the 142 Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex

143 We evaluated the participation of carboxy-terminal lysines in the Glu-
144 Plasminogen– β_2 GPI complex due to the possible existence of nicked β_2 GPI in
145 our sample (which is known to be cleaved between amino acids Lys317 and
146 Thr318) by Docking assay (see below).

147 2.6. Interaction of different regions of Glu-Plasminogen with β_2 GPI

148 To investigate the region of Glu-Plasminogen that binds to β_2 GPI in a
149 lysine-dependent manner, we carried out different assays using elastase-derived
150 fragments of biotinylated Glu-Plasminogen (K1+2+3, K4 and K5-sp) and
151 immobilized β_2 GPI on microtitre plates. A volume of 80 μ L per well of each
152 fragment at varying concentrations (0–8 μ M) was separately dissolved in buffer
153 A and added to the immobilized β_2 GPI. After 1 h incubation at 37 °C, the plates
154 were washed three times with buffer A and the amount of bound protein was
155 detected with a streptavidin–peroxidase conjugate (Sigma, USA) diluted to
156 1:8000, and color development was measured as described previously. BSA
157 immobilized on microtitre plates, was used as control.

158 2.7. Competitive inhibition assay of K5-sp in the interaction 159 Glu-Plasminogen– β_2 GPI

160 To analyze the effect of K5-sp on Glu-Plasminogen binding to β_2 GPI, we
161 performed a competitive inhibition assay between biotinylated Glu-Plasmino-
162 gen and K5-sp by β_2 GPI. A volume of 80 μ L per well of biotinylated Glu-
163 Plasminogen at constant concentration (0.5 μ M) in buffer A and varying
164 concentrations of K5-sp (0–8 μ M) was incubated for 1 h at 37 °C. Unbound
165 protein was discarded and the amount of bound biotinylated Glu-Plasminogen
166 was detected with a streptavidin–peroxidase conjugate as previously
167 described. Likewise, we carried out parallel inhibition assays between
168 β_2 GPI and miniplasminogen (K5-sp) in the presence of different amounts of
169 EACA (0–40 mM) keeping constant the concentration of K5-sp (0.5 μ M).

170 2.8. Binding and activation of Glu-Plasminogen on HMEC-1 cells in 171 the presence of β_2 GPI

172 To elucidate the possible biological function of the Glu-Plasminogen– β_2 -
173 GPI interaction at cellular level, we evaluated the participation of this complex at

174 the surface of human microvascular endothelial cells (HMEC-1) which were
 175 cultured in plastic 96-well culture plates at 37 °C in a humidified atmosphere of
 176 5% CO₂ using MCDB (Gibco, USA) culture medium supplemented with 10%
 177 fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 250 µg
 178 amphotericin B and 1 µg/mL hydrocortisone acetate (Sigma, USA). Before
 179 each experiment, cells were incubated with FCS-free culture medium for 24 h,
 180 and 80 µL per well of β₂GPI at different concentrations (0–500 nM) in culture
 181 medium without FCS were added. After 3 h incubation at 37 °C, the cells were
 182 washed three times with FCS-free culture medium, and bound β₂GPI was
 183 detected with a rabbit anti-β₂GPI polyclonal antibody. A peroxidase-
 184 conjugated goat anti-rabbit IgG was used as secondary antibody and color
 185 development was measured using TMB as substrate as described previously.
 186 Parallel experiments in absence of β₂GPI were performed. For studies of Glu-
 187 Plasminogen activation on the HMEC-1 cell surface in the presence of constant
 188 amount of β₂GPI (5 nM) we performed similar experiments except that Glu-
 189 Plasminogen was added at different concentrations (0–5 µM) containing 1.5
 190 mM of the chromogenic substrate tosyl-glycyl-prolyl-lysine-4-nitroanilide
 191 acetate (Chromozym PL, Roche Molecular Biochemicals, Germany). The
 192 plasmin formation at 37 °C was monitored by measuring the nitroanilide
 193 release from the Chromozym PL chromogenic substrate at 405 nm. As control,
 194 parallel activation assays were performed in the absence of β₂GPI.

195 2.9. Binding of β₂GPI and Glu-Plasminogen to fibrin surfaces

196 To investigate if β₂GPI binds to intact fibrin, solid-phase fibrin plates were
 197 prepared [14]. Briefly, fibrinogen (Sigma, USA) was bound to a high binding

capacity polystyrene plate and transformed to a fibrin surface by treatment
 with thrombin. The assay was carried out using different concentrations of
 β₂GPI (0–800 nM) in buffer A (80 µL per well), which were incubated for
 1 h at 37 °C. The plates were washed three times with buffer A and the
 bound protein was detected with a rabbit anti-β₂GPI polyclonal antibody. A
 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was used as secondary antibody
 and color development was measured as described previously. As control,
 parallel assays were performed in absence of β₂GPI.

2.9.1. Activation of Glu-Plasminogen by SK on fibrin plates in the presence of β₂GPI

In the presence of intact fibrin, the streptokinase (SK) can effectively activate
 Plasminogen to plasmin, we therefore assessed the possible generation of
 plasmin in the presence of SK and β₂GPI in a fibrin mesh. This assay was done
 according to Monroy et al. [14]. Briefly, the fibrin meshes were washed for 2 min
 with buffer A and incubated in 100 µL of 0.05 M HCl, 0.11 M NaCl Tris, pH 7.4,
 with 0.01% sodium azide as preservative. Each well received 5 µL of 7 U/mL
 chromogenic PLG, 4 µL streptokinase (SK, 500 IU/mL) or 2 µL of β₂GPI.
 Different concentrations of the β₂GPI (25, 50 y 100 nM) were tested, but the
 optimal response was found using 100 nM of β₂GPI. To each well were added 25
 µL of plasmin-specific chromogenic substrate (Roche, 9.7 mg/mL). In this assay,
 the increase in amyolytic activity is directly proportional to the amount of
 plasmin generated by the sample. They were then incubated at 37 °C in a
 humid chamber for 60 min, after which absorbance was measured at 405 nm.
 The negative control contained the fibrin matrix with 5 mL of PLG (7 U/mL)
 without β₂GPI and with 25 µL of plasmin-specific chromogenic substrate.

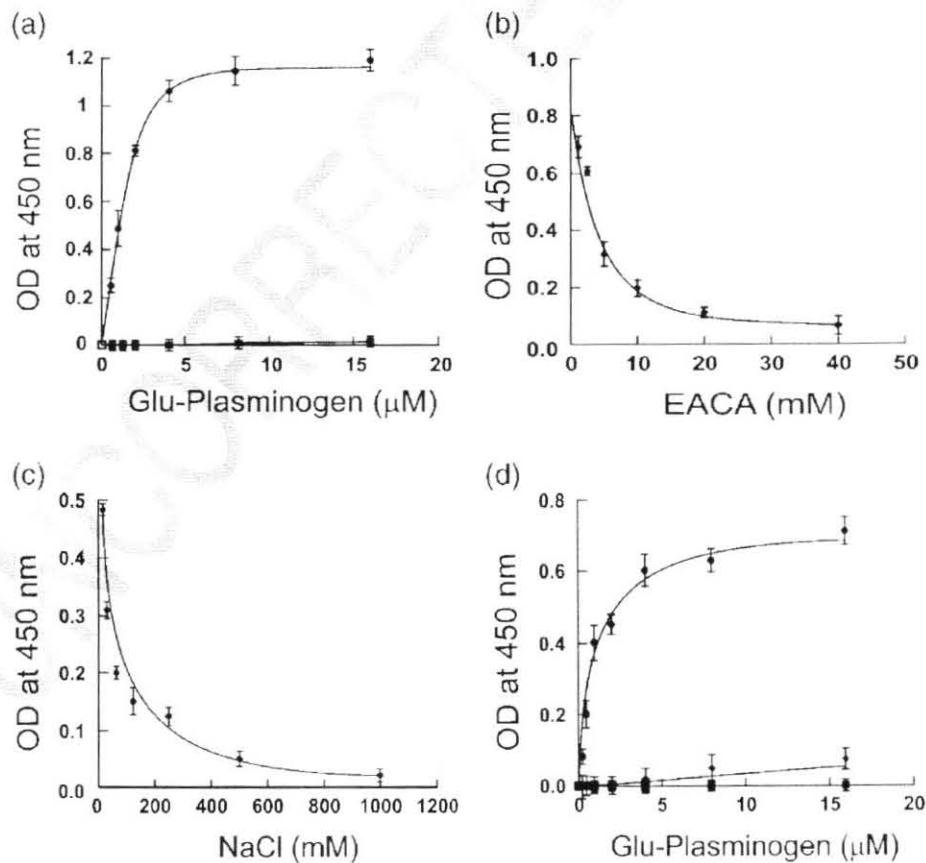


Fig. 1. Binding of Glu-Plasminogen to immobilized β₂GPI. (a) Different concentrations of biotinylated Glu-Plasminogen (0–16 µM) were added to a constant amount of β₂GPI (5 µg/mL) immobilized in high binding capacity activated polystyrene plate and the bound Glu-Plasminogen was detected (●) using streptavidine-peroxidase. BSA served as control (■). (b) Glu-Plasminogen-β₂GPI binding inhibition (●) by EACA at varying concentrations (0–40 mM) keeping constant the amount of Glu-Plasminogen (2.5 µM). (c) Glu-Plasminogen-β₂GPI binding inhibition by NaCl at different concentrations (0–1000 mM) keeping constant the amount of Glu-Plasminogen (2.5 µM). (d) Glu-Plasminogen (0–16 µM) binding to β₂GPI in the presence (◆) or absence (○) of EACA (40 nM). BSA was used as a control (■).

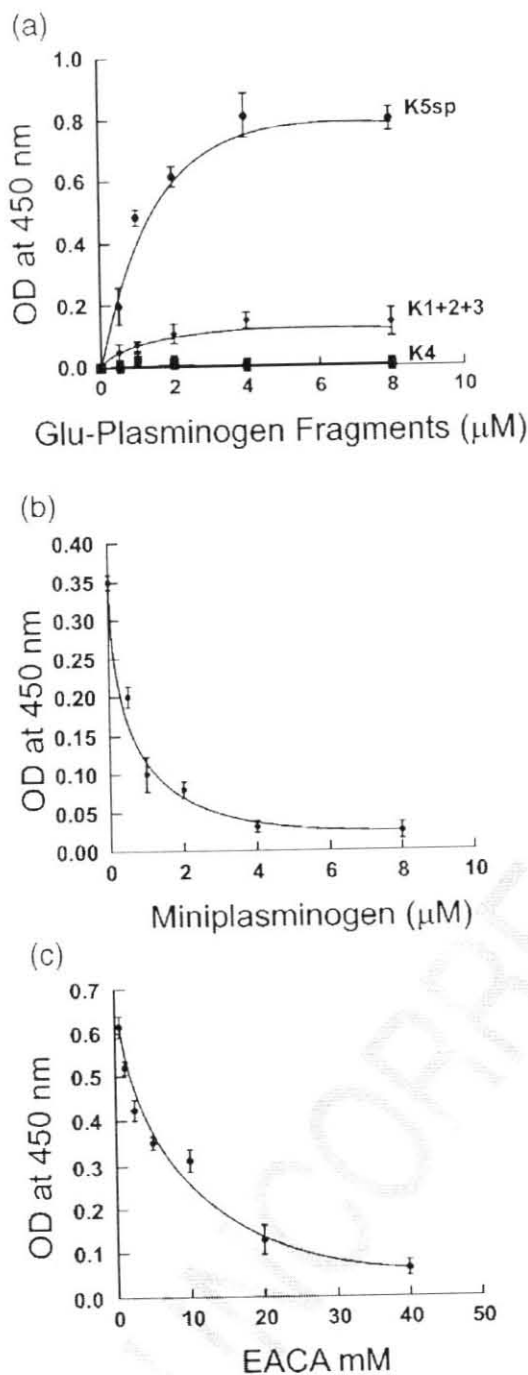


Fig. 2. Binding of elastase-derived fragments of Glu-Plasminogen to immobilized β_2 GPI. (a) To identify the region of Glu-Plasminogen that interacts with β_2 GPI, we performed different assays with elastase-derived plasminogen fragments (which were biotinylated). We added varying amounts (0–8 μ M) of each fragment: LB1 or K1+2+3 (\blacklozenge), K4 (\blacksquare) and miniplasminogen or K5-sp (\bullet) in buffer A, to immobilized β_2 GPI. The binding of these peptides was detected using streptavidin–peroxidase. BSA was used as control. (b) Binding competition assays between Glu-Plasminogen (at a constant concentration 0.5 μ M) and miniplasminogen or K5-sp (varying concentrations 0–8 μ M) by immobilized β_2 GPI were carried out. (c) Inhibition assays of the binding of miniplasminogen to immobilized β_2 GPI by EACA were carried out using constant concentration of miniplasminogen (0.5 μ M) and different amounts of EACA (0–40 mM). Data for all graphics are the average of triplicate experiments.

2.10. Effect on thrombomodulin and ICAM-1 expression by anti- β_2 GPI activated endothelial cells

To investigate the activation of endothelial cells by anti- β_2 GPI antibodies (IgG) of human or rabbit origin, human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were cultured in a 60-mm diameter plastic Petri dish as described previously. Before each experiment, confluent monolayers of 5×10^5 cells were starved of FCS for 24 h and, in separate assays, 3 mL/plate of Glu-Plasminogen (55 nM) or β_2 GPI (100 nM) in FCS-free culture medium were added. After 2 h of incubation at 37 °C, unbound protein was discarded washing the cells twice with culture medium, and then 3 mL/plate of human or rabbit IgG anti- β_2 GPI antibodies (100 μ g/mL) were added incubating for 10 h at 37 °C. Subsequently, unbound anti- β_2 GPI was removed and the cells were detached with EDTA 30 μ M for 10 min at 37 °C, resuspended in 1 mL of PBS and analyzed by cytofluorometry (Coulter EPICS^{XL}). Thrombomodulin (TM) was detected with a fluorescein-conjugated rabbit polyclonal antibody (diluted 1:5000) (TM-FITC, Santa Cruz, USA) and the adhesion molecule ICAM-1 (CD54) was identified with a monoclonal anti-human CD54-FITC (Sigma, USA) obtained in mouse which was diluted 1:10,000. To evaluate any non-specific cell activation by contaminating endotoxin, all the assays were also performed in the presence of polymyxin B (5 μ g/mL; Sigma, USA). Parallel experiments were performed with TNF- α as a cellular activation control.

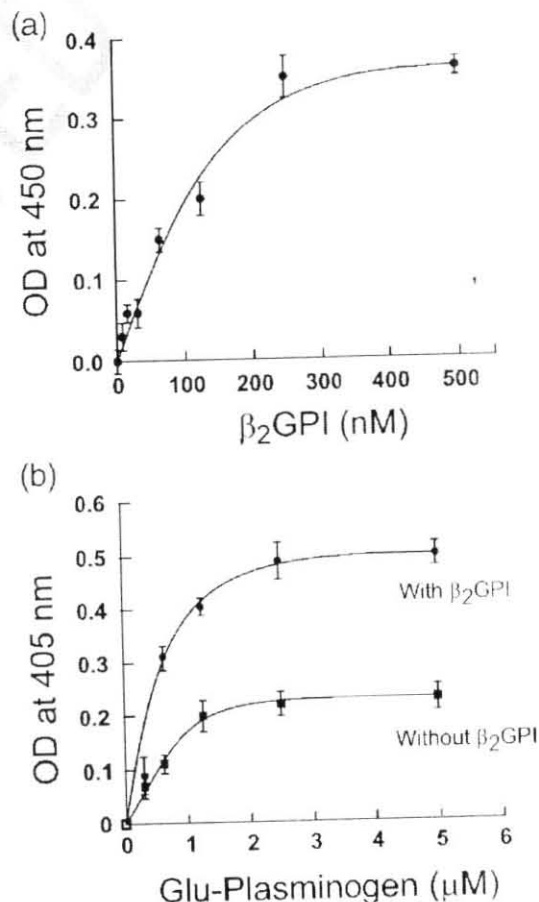


Fig. 3. Activation of Glu-Plasminogen in the presence of β_2 GPI at the surface of HMEC-1 cells. (a) Binding of β_2 GPI to HMEC-1 endothelial cells (\bullet) adding different amounts of β_2 GPI (0–500 nM). (b) Plasmin formation as a function of the concentration of added β_2 GPI. Different amounts of Glu-Plasminogen (0–5 μ M) in presence of Chromozym PL (1.5 mM) were added to endothelial cells which were previously incubated for 3 h, either in the presence (\bullet) or absence (\blacksquare) of β_2 GPI (100 nM).

223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243

244 2.11. Molecular modeling and Docking assays

245 To further evaluate which of the 29 lysines present in β_2 GPI may mediate
 246 the lysine-dependent interactions, we performed molecular modeling and
 247 docking assays using the structures of β_2 GPI (1C1Z) and plasminogen kringle 1
 248 (PDB ID: 1CEA). We utilized the lysine–LBS interaction of the homodimeric
 249 complex of kringle 2 from t-PA (1TPK) as reference, which is a functional
 250 model of interactions between a kringle domain and a non C-ter lysine (since
 251 intact β_2 GPI has not carboxy-terminal lysines). Each lysine present in the intact
 252 β_2 GPI was analyzed looking for the following structural characteristics: (1) an
 253 area exposed to the solvent greater than 130 Å². This value was determined with
 254 the program Naccess [17], considering an area 30% smaller than the interface
 255 area. (2) The presence of an exposed keto group and (3) its position within a
 256 loop. Detected lysines were used in a manual docking assay between β_2 GPI and
 257 plasminogen kringle 1.

258 The interaction between microplasmin (μ Plm, 1BUI) and β_2 GPI at the nick
 259 site Lys317–Thr318 was based on manual docking of both proteins, modeling
 260 the region comprised between residues 309 and 322 in the canonic conformation
 261 of substrates associated to serin proteases [18].

262 Complex refinement was carried out by semi-rigid docking according to
 263 Selisko et al. [19] with the program XPLOR [20]. All complexes were minimized
 264 with the suite InsightII [21] using the module DISCOVER in presence of a 5.0-Å
 265 water layer, until the maximum derivative was below 0.01 kcal/mol Å.

266 3. Results

267 3.1. Interaction of Glu-Plasminogen with β_2 GPI

268 To demonstrate a specific interaction between Glu-Plasminogen
 269 and β_2 GPI we performed a series of association–dis-
 270 sociation assays of these proteins as described in Materials and
 271 methods. We found that Glu-Plasminogen was able to bind to
 272 β_2 GPI, which was in turn saturable and dependent on concentra-
 273 tion (Fig. 1a) indicating a specific interaction between both
 274 molecules. Furthermore, to assess whether the Glu-Plasminogen
 275 interaction is mediated by the lysine binding site (LBS), we
 276 performed inhibition assays in the presence of EACA, a lysine
 277 analog. As shown in Fig. 1b, Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex
 278 formation was inhibited by EACA in a concentration-dependent
 279 manner indicating the participation of lysines in the interaction.
 280 In addition, we found an inhibitory effect by EACA on the forma-
 281 tion of the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex when different
 282 amounts of Glu-Plasminogen (0–16 μ M) were used, keeping
 283 constant the EACA concentration (40 mM) Fig. 1d. To further
 284 investigate the possibility of other types of interactions (ionic or
 285 hydrophobic) in the complex, we performed inhibition assays in
 286 the presence of different amounts of NaCl (0–1000 mM) and
 287 found that NaCl was able to produce an inhibitory effect on the
 288 formation of the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex (Fig. 1c),
 289 evidencing the existence of ionic (lysine independent) interactions.

290 3.2. Binding of Glu-Plasminogen domains with β_2 GPI

291 To investigate the region of Glu-Plasminogen that interacts
 292 with β_2 GPI, we performed association assays with different
 293 elastase-derived plasminogen fragments. We found that the re-
 294 gion which comprises K1+2+3 (LBS), interacts weakly with
 295 β_2 GPI, whereas the K4 did not participate in the complex forma-
 296 tion (Fig. 2a). However, the main interaction takes place with
 297 miniplasminogen. These data suggest that the lysine-dependent

298 binding between Glu-Plasminogen and β_2 GPI mainly occurs
 299 with miniplasminogen or K5-sp. To further explore the compe-
 300 tence of K5-sp with Glu-Plasminogen to immobilized β_2 GPI,
 301 we performed competitive experiments using different concen-
 302 trations of miniplasminogen (0–8 μ M) keeping constant the
 303 amount of Glu-Plasminogen (2.5 μ M). Under these conditions,
 304 we observed that K5-sp competes with Glu-Plasminogen for
 305 β_2 GPI (Fig. 2b). For evaluation of the possible participation of
 306 lysines in the complex K5-sp– β_2 GPI, we performed different
 307 inhibition assays in the presence of EACA at different concen-
 308 trations (0–40 mM) keeping constant the amount of Glu-
 309 Plasminogen (2.5 μ M). Under these conditions, we found that
 310 EACA was able to inhibit until 95% the interaction of mini-
 311 plasminogen with the β_2 GPI (Fig. 2c).

312 3.3. Binding of β_2 GPI to HMEC-1 cells. Its effect on plasmin
 313 generation

314 The possible biological function of the Glu-Plasminogen– β_2 -
 315 GPI interaction at cellular level was evaluated according to the

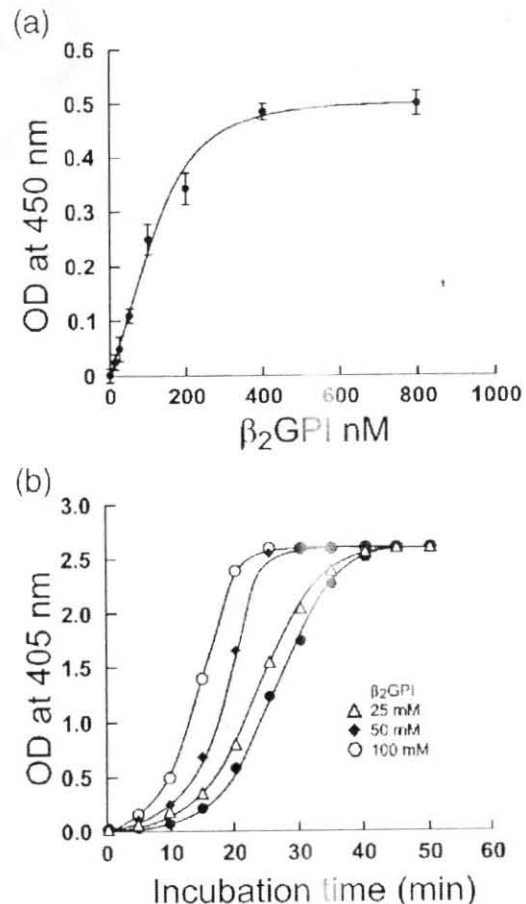


Fig. 4. Activation of Glu-Plasminogen by SK at the fibrin surface in the presence of β_2 GPI. (a) β_2 GPI binding to intact fibrin immobilized in polystyrene plates (\bullet) (b) Glu-Plasminogen activation assay on intact fibrin in the presence of different amounts of β_2 GPI (25–100 nM), keeping constant the concentration of Glu-Plasminogen (0.5 μ M). The assays were performed in the presence (\circ 100 nM, \blacklozenge 50 nM and \triangle 25 nM) or absence (\bullet) of β_2 GPI (control, only Glu-Plasminogen + SK). Readings were done every 5 min for a period of 30 min.

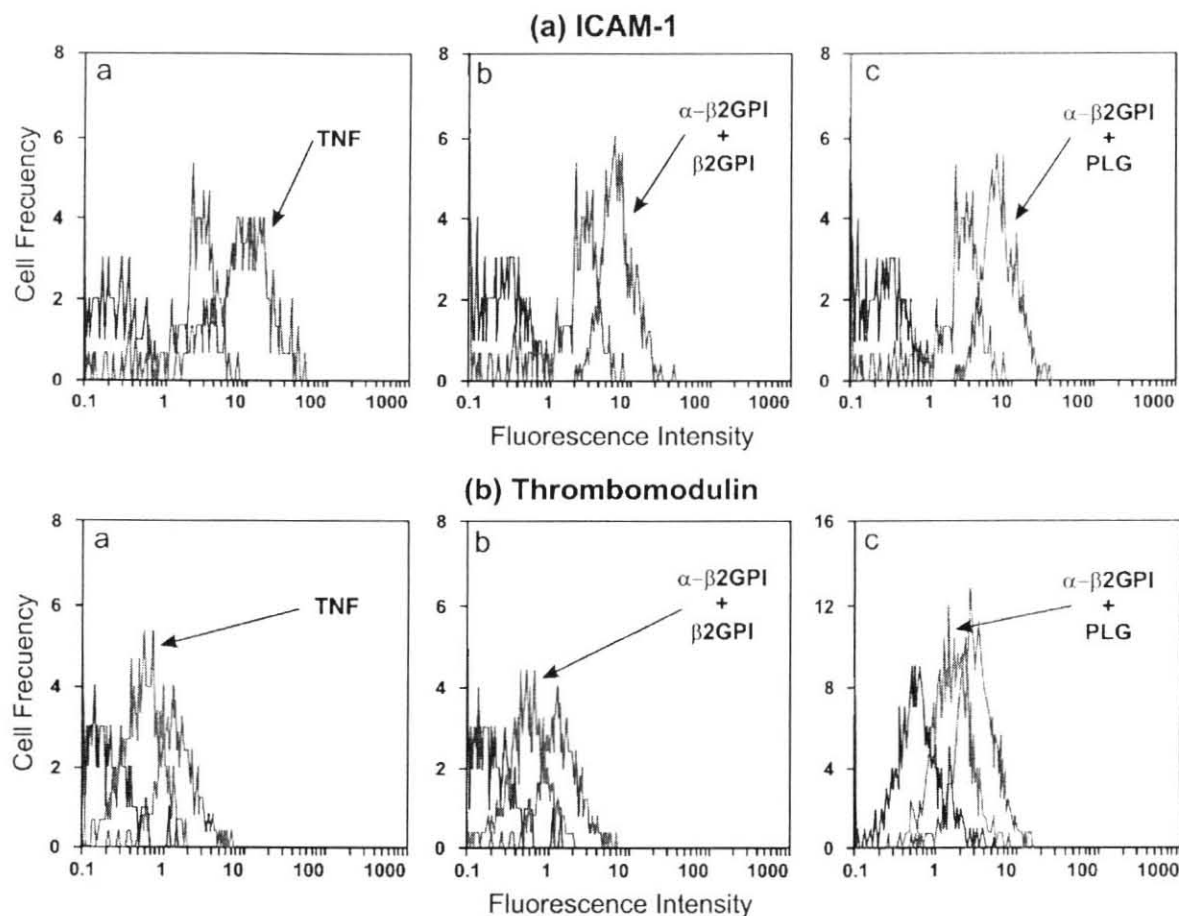


Fig. 5. ICAM-1 and thrombomodulin presence at the surface of activated endothelial cells. Measured fluorescence intensity by flow cytometry of HMEC-1 endothelial cells activated with anti- β_2 GPI antibodies in the presence of Glu-Plasminogen or β_2 GPI. (a) Labeled HMEC-1 cells with anti-ICAM-1. Isotype control (blue), ICAM-1 under normal conditions (green) and ICAM-1 on activated endothelial cells (red). Left panel: ICAM-1 expression on TNF-activated HMEC-1, Center: HMEC-1 activated with anti- β_2 GPI in the presence of β_2 GPI. Right: HMEC-1 activated with anti- β_2 GPI in the presence of Glu-Plasminogen. (b) Labeled HMEC-1 endothelial cells with polyclonal anti-TM antibodies. Isotype control (blue) TM under normal conditions (green) and TM on activated endothelial cells (red). Left panel: TM expression on TNF-activated HMEC-1, Center: HMEC-1 activated with anti- β_2 GPI in the presence of β_2 GPI. Right: HMEC-1 activated with anti- β_2 GPI in the presence of Glu-Plasminogen.

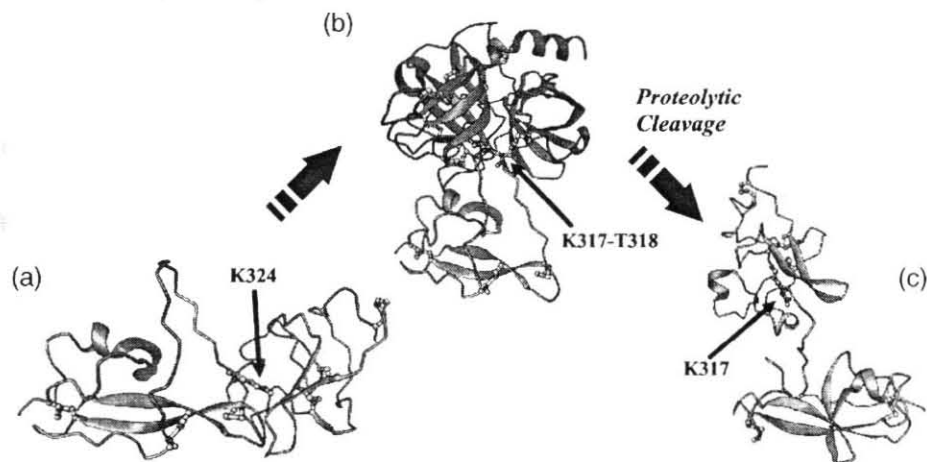


Fig. 6. Docking of the Glu-Plg- β_2 GPI complex. (a) Lysine-dependent interactions between plasminogen kringle I (green ribbon) and Lys324 residue (ball and stick) present in the fifth domain of β_2 GPI (blue ribbon). (b) Interactions between the catalytic domain of plasmin (red ribbon) and the fifth domain of β_2 GPI (blue ribbon) at the nick site between residues Lys317–Thr318 (ball and stick). (c) Lysine-dependent interactions between kringle I of plasminogen (green ribbon) and Lys317 (ball and stick) present in the fifth domain of N- β_2 GPI (blue ribbon).

316 formation of this complex on human microvascular endothelial
317 cells (HMEC-1), which constitutively express t-PA. We deter-
318 mined the interaction of β_2 GPI with HMEC-1 cells and found a
319 concentration-dependent increase in the binding of this protein
320 to the cellular surface (Fig. 3a). Therefore, to evaluate the plas-
321 min generation from Glu-Plasminogen bound to β_2 GPI on the
322 cell we performed different activation assays of Glu-Plasmin-
323 ogen as described in Materials and methods. We observed an
324 increase in plasmin generation at surface level as a function of
325 the concentration of β_2 GPI added (Fig. 3b) compared with
326 that obtained in the absence of this protein. This suggests that
327 β_2 GPI generates additional plasmin(ogen) binding sites at EC
328 surface.

329 3.4. Activation of Glu-Plasminogen in the presence of β_2 GPI 330 on a fibrin surface

331 To assess if Glu-Plasminogen can be activated by fibrin-
332 bound SK in the presence of β_2 GPI, we performed a plasmin
333 generation assay using constant amounts of Glu-Plasminogen
334 (0.5 μ M) and different concentrations of β_2 GPI (25–100 μ M).
335 The model of fibrin surface used in these experiments allows
336 the determination of plasmin formation by measuring the prog-
337 ress of hydrolysis of a chromogenic substrate for plasmin. Ini-
338 tially, we explored if β_2 GPI could bind to the fibrin surface.
339 Results obtained showed that β_2 GPI binds specifically to fibrin
340 in a concentration-dependent manner (Fig. 4a). On the other
341 hand, we observed an increase in plasmin generation dependent
342 on the amount of β_2 GPI added to the assay (Fig. 4b), which
343 suggests a possible function of this protein as a cofactor of the
344 plasminogen–plasmin system.

345 3.5. Activation of HMEC-1 cells in the presence of IgG 346 anti- β_2 GPI antibodies

347 The reactivity of IgG anti- β_2 GPI antibodies towards either
348 Glu-Plasminogen or β_2 GPI was evaluated by its effect on the
349 activation of HMEC-1 cells in the presence of each protein,
350 detecting the expression of the adhesion molecules ICAM-1 or
351 thrombomodulin (TM) in the cellular surface by cytofluorome-
352 try analysis. To discard any non-specific cell activation by
353 contaminating endotoxin, all the assays were also performed in
354 the presence of polymyxin B (5 μ g/mL; Sigma, USA). Results in
355 the presence or absence of inhibitor were similar. We observed
356 (Fig. 5a–b) that Glu-Plasminogen and β_2 GPI were recognized at
357 the cellular surface level of HMEC-1 cultures by anti- β_2 GPI
358 antibodies inducing their activation by increasing the production
359 of ICAM-1 (Fig. 5a) and decreasing the expression of
360 thrombomodulin (Fig. 5b) which plays a key role in the anti-
361 coagulant regulation.

362 3.6. Docking of the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex

363 Molecular modeling analysis was carried out to characterize
364 the lysine-dependent interaction between β_2 GPI and Glu-
365 Plasminogen. Our data revealed that only residues Lys268
366 and Lys324 fulfilled the necessary requirements for a lysine–

LBS interaction according to data obtained from the homo-
367 dimeric complex formed between two kringle 2 domains of t-
368 PA. In addition, an evaluation of the interface in the μ Plm– β_2 -
369 GPI complex indicated that the Lys268 residue forms part of the
370 molecular interface, which leaves the Lys324 as the only residue
371 capable of interacting with kringle 1 of plasminogen without
372 causing a steric impediment during cleavage between residues
373 Lys317 and Thr-318 (Fig. 6a). Based on the experimental
374 results that show the presence of ionic interactions (Fig. 1d) in
375 the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex, and on the description
376 of a susceptible nick site at domain V of β_2 GPI by plasmin [22],
377 we performed a second docking assay to characterize the
378 residues that interact in the microplasmin– β_2 GPI complex (Fig.
379 6b). The formation of the interface requires a conformational
380 modification of the β_2 GPI between residues 309–322. Due to
381 the proximity of the interfaces, it is possible that the initial
382 interactions between Lys324 and the plasminogen kringle I
383 facilitate and stabilize the docking of β_2 GPI domain V with
384 plasmin, in the generation of N- β_2 GPI. Once the peptide bond
385 between Lys317–Thr318 is cleaved, the resulting C-ter lysine
386 in β_2 GPI can interact with the plasminogen kringle domains
387 (Fig. 6c).
388

4. Discussion 389

In the present study, we characterized the interaction between
390 β_2 GPI and Glu-Plasminogen and evaluated its possible role in
391 plasmin generation both at cellular level and at the fibrin surface.
392 Likewise, we evaluated endothelial cell activation by IgG anti-
393 β_2 GPI in the presence of Glu-Plasminogen. β_2 GPI is a plasma
394 glycoprotein of unknown physiological function [1]. Never-
395 theless, one of the most studied properties of this protein is its
396 interaction with negatively charged phospholipids such as car-
397 diolipin or phosphatidylserine, creating novel antigenic epitopes
398 recognized by certain antiphospholipid antibodies [4]. However,
399 although β_2 GPI binds with high affinity to purified anionic
400 phospholipids, its affinity for phospholipid preparations with a
401 composition resembling that of cell membranes is low [8]. Inter-
402 estingly, Kochl et al. reported that β_2 GPI may bind to distinct
403 kringle domains of apo (a) –the glycoprotein of Lp(a)– in a
404 specific manner [10]. Apo (a) shares structural homology with
405 plasminogen [11]. Fleury and Anglès-Cano demonstrated that
406 apo(a) prevents the binding of Glu-Plasminogen to cells and
407 fibrin, inhibiting fibrinolysis and pericellular proteolysis [23].
408 Impaired fibrinolysis has been reported in patients with APS
409 [24], however, few data regarding antiphospholipid antibody
410 interaction and fibrinolysis are available. In this regard, one
411 of the most important and relevant cofactors involved in APS
412 is β_2 GPI [2]. Here, we report that β_2 GPI interacts with Glu-
413 Plasminogen in a saturable and specific manner similar to the
414 reported for the binding of plasminogen to partially degraded
415 fibrin [1]. The Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex was inhibited
416 by EACA, which suggests the participation of both intracatenary
417 and C-ter lysines in the binding (Fig. 1b), however, ionic inter-
418 actions also proved to be important (Fig. 1c) perhaps stabilizing
419 the complex. To support our data on lysine participation, we
420 performed docking assays [22] with intact β_2 GPI according to
421

the structure reported by Schwarzenbacher et al. [25] determining which of the 29 lysines present in the β_2 GPI molecule could mediate the lysine-dependent binding. Our analyses revealed that only residues Lys268 and Lys324 possess the molecular characteristics to interact with plasminogen throughout the LBS of kringle domains. However, further evaluations indicated that Lys268 forms part of the molecular interface which leaves the Lys324, localized in the lysine cluster on the fifth domain of β_2 GPI, as the only residue able to interact with the kringle domains. Recently, Yasuda et al. [26] reported that nicked β_2 GPI, but not intact β_2 GPI, binds to Glu-plasminogen with a $K_d=0.37 \mu\text{M}$, suggesting that this interaction may be mediated by the lysine cluster on the fifth domain of nicked β_2 GPI and the lysine binding site on the K5 domain of Glu-Plasminogen, which agrees with our docking data. However, the possibility that the interaction reported by Yasuda was carried out by the C-terminal lysine 317, present in the nicked β_2 GPI, cannot be discarded. On the other hand, to identify the region of Glu-Plasminogen that binds to β_2 GPI and evaluate other type of interactions, we performed different association–dissociation assays using elastase-derived plasminogen fragments and observed that miniplasminogen (K5-sp fragment) binds to β_2 GPI similar to that obtained with the full-length protein, suggesting that Glu-Plasminogen mediates the interaction with β_2 GPI mainly by the K5-p region. The naturally circulating form of plasminogen has a globular or “closed” conformation. To maintain its closed form, the kringle 5 domain of plasminogen interacts with lysine 50 of the preactivation peptide, which is a likely site for anchoring the N-terminal of the zymogen to the LBS in the kringle 5 [27,28]. LBS in K5-p has higher affinity for intact fibrin and cellular surface and is an essential event to initiate fibrinolysis reactions. This initial binding induces a conformational change from a closed to an open form, promoting accessibility to activators such as t-PA, and generating plasmin. This active form of the protein simultaneously degrades fibrin, and makes C-ter Lys of fibrin more accessible to plasminogen via kringles 1–2–3, thus accelerating fibrinolysis [29].

These interactions may be of pathophysiological relevance in APS if the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex is the trigger of decreased fibrinolytic activity. Binding of the Glu-Plasminogen– β_2 GPI complex to fibrin and cells may also favor the localization of β_2 GPI in these surfaces where it may be cleaved between residues Lys317–Thr318 by plasmin, which would explain the recently described proteolytic effect of plasmin on β_2 GPI [26]. The resulting C-ter lysine 317 can interact with other plasminogen molecules through kringle domains favoring the generation of more plasmin. Autoantibodies produced against β_2 GPI may interfere with this process, thereby predisposing individuals to a procoagulant state, which may lead to the development of thrombotic disorders as observed in APS. In this sense, we demonstrated that, at cellular surface level, β_2 GPI can increase the generation of plasmin in the presence of t-PA which is constitutively produced by HMEC-1 cells (Fig. 3c), suggesting the generation of new binding sites for Glu-Plasminogen at the cellular surface due to the interaction with β_2 GPI. Likewise, plasmin formation in the presence of fibrin is favored (Fig. 4b), which suggests that β_2 GPI can hold an important physiological

function as a cofactor in the activation of plasminogen by the formation of the trimolecular complex β_2 GPI-Plasminogen–tPA, similarly as that reported for fibrin [30], since the complex Plg-tPA-fibrin is very efficient in the generation of plasmin. This event represents a regulatory step in the positive feedback mechanism for extrinsic fibrinolysis and in antithrombotic regulation.

On the other hand, we found that IgG anti- β_2 GPI can recognize both molecules (β_2 GPI and Glu-Plasminogen) in the endothelial surface and induce their activation (determined by the increase in expression of adhesion molecules such as ICAM-1, Fig. 6a). Likewise, superficial thrombomodulin (a modulating molecule of the protein C anticoagulant pathway that regulates blood clotting) expression is decreased (Fig. 6b) which can favor a pro-thrombotic state. Low levels of protein C have been associated with the generation of thrombosis in APS [31]. Antiphospholipid antibody binding to β_2 GPI on endothelial cells has been shown to cause cellular activation, which induces the expression of proinflammatory and proadhesive molecules [32].

In conclusion, we have demonstrated that the interaction between intact β_2 GPI and Glu-Plasminogen can participate in plasmin generation both at fibrin and cellular surface level. Plasmin conversion is a key event in extrinsic fibrinolysis for the thrombolysis against intravascular blood clots, thus the regulation of plasmin generation is important for the maintenance of the hemostatic balance in vivo, since β_2 GPI may be cleaved in vivo by plasmin during thrombolysis. These phenomena represent a novel regulation mechanism in extrinsic fibrinolysis where the β_2 GPI can play a key role. Anti- β_2 GPI antibodies could interfere with the fibrinolytic process generating a pro-thrombotic state as observed in APS.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Postgraduate Studies Department of Biomedical Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for the support granted to the Ph.D. student Francisco López-Lira for an Ad-hoc stay.

We wish to thank Ms. Isabel Pérez Montfort for English correction and Ms. Eva María Reyes for preparation of the manuscript.

References

- [1] D.A. Kandiah, S.A. Krilis, β_2 -glycoprotein I, *Lupus* 3 (1994) 207–212.
- [2] J.E. Hunt, R.J. Simpson, S.A. Krilis, Identification of a region of β_2 -glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2141–2145.
- [3] H.P. McNeil, R.J. Simpson, C.N. Chesterman, S.A. Krilis, Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that induces a lipid-binding inhibitor of coagulation: β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 4120–4124.
- [4] D.A. Kandiah, A. Sali, Y. Sheng, E.J. Victoria, D.M. Marquis, S.M. Coutts, S.A. Krilis, Current insights into the “antiphospholipid” syndrome: clinical, immunological, and molecular aspects, *Adv. Immunol.* 70 (1998) 507–563.
- [5] G.R.V. Hughes, The antiphospholipid syndrome: ten years on, *Lancet* 342 (1993) 341–344.
- [6] I. Schousboe, β_2 -glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact

179
180
181
182
183
184
185
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534

- 535 activation of the intrinsic blood coagulation pathway. *Blood* 66 (1985) 1086–1091.
- 536
- 537 [7] T. Mori, H. Takeya, J. Nishioka, E.C. Gabazza, K. Suzuki, β_2 -glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Thromb. Haemost.* 75 (1996) 49–55.
- 538
- 539
- 540 [8] E. Polz, G.M. Kostner, The binding of β_2 -glycoprotein I to human serum lipoproteins. Distribution among density fractions. *FEBS Lett.* 102 (1979) 183–186.
- 541
- 542
- 543 [9] H. Wurm, E. Beubler, E. Polz, A. Holasek, G. Kostner, Studies on the possible function of β_2 -glycoprotein I: influence in the triglyceride metabolism in rat. *Metabolism* 31 (1982) 484–486.
- 544
- 545
- 546 [10] S. Kochl, F. Fresser, E. Lobentanz, G. Baier, G. Utermann, Novel interaction of apolipoprotein (a) with β_2 -glycoprotein I mediated by Kringle IV domain. *Blood* 90 (1997) 1482–1489.
- 547
- 548
- 549 [11] J.W. McLean, J.E. Tomlinson, W.J. Kuang, D.L. Eaton, E.Y. Chen, G.M. Fless, A.M. Scanu, R.M. Lawn, cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330 (1987) 132–137.
- 550
- 551
- 552 [12] H.R. Lijnen, Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902 (2001) 226–236.
- 553
- 554 [13] M. Blank, D. Faden, A. Tincani, J. Kopolovic, I. Goldberg, B. Gilburd, F. Allegri, G. Balestrieri, G. Valesini, Y. Shoenfeld, Immunization with anti-cardiolipin cofactor (beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *J. Autoimmun.* 7 (1994) 441–445.
- 555
- 556
- 557
- 558 [14] V. Monroy, B.H. Ruiz, Participation of the dengue virus in the fibrinolytic process. *Virus Genes* 21 (2000) 197–208.
- 559
- 560
- 561 [15] L. Sottrup-Jensen, H. Claeys, M. Zajdel, T.E. Petersen, S. Magnusson, The primary structure of human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one "mini" plasminogen (MW, 38,000) by elastase-catalysed-specific limited proteolysis. *Prog. Chem. Fibrinol. Thromb.* 3 (1978) 191–209.
- 562
- 563
- 564
- 565 [16] D. Alarcón-Segovia, J. Sanchez-Guerrero, Primary anti-phospholipid syndrome. *J. Rheumatol.* 16 (1989) 482–488.
- 566
- 567 [17] NACCESS, version 2.1.1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London 1996.
- 568
- 569 [18] J.D.A. Tyndall, D.P. Fairlie, Conformational homogeneity in molecular recognition by proteolytic enzymes. *J. Mol. Recognit.* 12 (1999) 363–370.
- 570
- 571 [19] B. Selisko, A.F. Licca, B. Beceril, F. Zamudio, L.D. Possani, E. Horjales, Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins* 37 (1999) 130–143.
- 572
- 573
- 574
- [20] A.T. Brünger, J. Kuriyan, M. Karplus, Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics. *Science* 235 (1987) 458–460.
- 575
- 576
- [21] InsightII, version 95.0.5, Biosym/MSI, San Diego, California 1995.
- 577
- [22] I.A. Vakser, Low-resolution docking: prediction of complexes for under-determined structures. *Biopolymers* 39 (1996) 455–464.
- 578
- 579
- [23] V. Fleury, E. Anglés-Cano, Characterization of the binding of plasminogen to fibrin surfaces: the role of carboxy-terminal lysines. *Biochemistry* 30 (1991) 7630–7638.
- 580
- 581
- 582
- [24] R. Takeuchi, T. Atsumi, M. Ieko, Y. Amasaki, K. Ichikawa, T. Koike, Suppressed intrinsic fibrinolytic activity by monoclonal anti- β_2 glycoprotein I autoantibodies: possible mechanism for thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Br. J. Haematol.* 119 (2002) 781–788.
- 583
- 584
- 585
- [25] R. Schwarzenbacher, K. Zeth, K. Diederichs, A. Gries, G.M. Kostner, P. Laggner, R. Prassl, Crystal structure of human β_2 -glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J.* 18 (1999) 6228–6239.
- 586
- 587
- 588
- 589
- 590
- [26] S. Yasuda, T. Atsumi, M. Ieko, E. Matsuura, K. Kobayashi, J. Inagaki, H. Kato, H. Tanaka, M. Yamakado, M. Akino, H. Saitou, Y. Amasaki, S. Jodo, O. Amengual, T. Koike, Nicked β_2 -glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis. *Blood* 103 (2004) 3766–3772.
- 591
- 592
- 593
- 594
- 595
- [27] S.S.A. An, C. Carreño, D.N. Martí, J. Schaller, F. Albericio, M. LLinas, Lysine-50 is a likely site for anchoring the plasminogen N-terminal peptide to lysine-binding kringles. *Protein Sci.* 7 (1998) 1960–1969.
- 596
- 597
- 598
- [28] C.S. Cockell, J.M. Marshall, K.M. Dawson, S.A. Cederholm-Williams, C.P. Ponting, Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. *Biochem. J.* 333 (1968) 99–105.
- 599
- 600
- 601
- 602
- 603
- [29] D.A. Horbach, E.T. van Oort, T. Lisman, J.C. Meijers, R.H. Derksen, P.G. de Groot, β_2 -glycoprotein I is proteolytically cleaved in vivo upon activation of fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 81 (1999) 87–95.
- 604
- 605
- 606
- [30] M. Nesheim, J. Walker, W. Wang, M. Boffa, A. Horrevoets, L. Bajzar, Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936 (2001) 247–260.
- 607
- 608
- 609
- [31] C.T. Esmon, The protein C pathway. *Chest* 124 (2003) 36S–32S.
- 610
- [32] R. Simantov, J.M. LaSala, S.K. Lo, A.E. Gharavi, L.R. Sammaritano, J.E. Salmon, R.L. Silverstein, Activation of cultured vascular endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 2211–2219.
- 611
- 612
- 613
- 614
- 615