

BIOLOGÍA Y PATOBIOLOGÍA HUMANA DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN LA ESTABILIZACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y LA INFLAMACIÓN

GREGORY A. GARCÍA¹, SERGIO HERNÁNDEZ V^{1-2*}, ÓMAR R. MEJÍA¹⁻³, SEGUNDO A. BAEZ¹ Y ANANÍAS GARCÍA C.³

Resumen

El Inter-Alfa-Inhibidor (IAI) es un complejo proteico sanguíneo con actividad anti-inflamatoria que consiste de una cadena liviana del interinhibidor llamada bikunina (ITIL) y dos cadenas pesadas del inter inhibidor (ITIHs). La bikunina es una serpina (Serina-Proteasa Inhibidora) y las ITIHs posiblemente son cistininas (Cisteína-Proteasa Inhibidoras). Las ITIHs pueden ser transferidas desde IAI a moléculas de ácido hialurónico y unirse a estas covalentemente para formar complejos de ácido-hialurónico-ITIHs en la matriz extracelular, requeridos para garantizar su estabilidad. Este artículo de revisión considera la información actual relacionada a IAI.

Palabras clave: ácido hialurónico, alfa-1-microglobulina, bikunina, CD44, cistininas (cisteína-proteasas inhibidores), matriz extracelular, HAS (ácido hialurónico-sintetasas), hialuroadherinas, hialuronidasas, inflamación, inmunidad, inter-alfa-inhibidor (IAI), ITIL (cadena liviana del interinhibidor), ITIH (cadena pesada del inter inhibidor), lipocalinas, proteasas, serpinas (serina-proteasa-inhibidores), TSG6 (den 6 regulado por factores de necrosis tumoral).

HUMAN BIOLOGY AND PATHOBIOLOGY OF HYALURONIC ACID ON THE STABILIZATION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX AND INFLAMMATION

Abstract

The Inter-alpha-inhibitor (IAI) is a complex blood protein that consists of a light chain ITIL (Interinhibitor light chain) called bikunin and two heavy chains ITIHs (Inter inhibitor heavy chains). The bikunin is a serpin (Serine-proteinase inhibitors) and ITIHs are possibly cistinins (Cistein-proteinase inhibitors). The ITIHs can be transferred from IAI to hyaluronic acid molecules and become covalently linked, forming complexes of hyaluronic acid-ITIHs in the extracellular matrix, required to guarantee the stability. In addition, IAI has anti-inflammatory activity. This review article considers the current information about IAI.

Key words: hyaluronic acid, alpha-1-microglobulina, bikunin, CD44, cistin (cistein-proteinase inhibitor), extracellular matrix, HAS (hyaluronan-synthetases), hialuroadherin, hialuronidasas, inflammation, IAI (inter-alpha-inhibitor), immunity, inflammation, ITIH (inter inhibitor heavy), ITIL (inter inhibitor light), lipocalin, proteases, serpins (serine-proteinase inhibitor), TSG6 (tumor necrosis factor regulated gen 6).

¹ Facultad de Medicina. Escuela Colombiana de Medicina. Universidad del Bosque.

² Facultad de Medicina. Universidad Militar Nueva Granada.

³ Facultad de Medicina y Facultad de Rehabilitación, Terapia y Desarrollo Humano. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad del Rosario.

* Dirección electrónica para correspondencia: sergio.hernandez@umng.edu.co

Dirección postal: Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada. Tr. 3 No. 49-00, Bogotá, Colombia.

Recibido: Mayo 18 de 2006. Aceptado: Junio 14 de 2006.

Introducción

En los organismos multicelulares, el espacio extracelular es el sitio de “socialización” de las células. Este espacio, constituido por un parénquima en especies animales, muestra una mayor diversificación en las células alta y significativamente más funcionales de la economía sistémica; a su vez, requiere de la existencia de un estroma organizado con células, que proporciona los sustratos y el soporte necesario para el mantenimiento estructural del parénquima, y por ende la permanencia tiempo-espacial a tejidos y órganos que la contengan^{1,2}.

En el estroma se encuentran células denominadas fibrocitos, los cuales se evidencian constante y fenotípicamente como fibroblastos, encargados de la producción de los componentes la matriz extracelular, la cual a su vez está embebida en su propio medio interno, “líquido hístico, tisular, o fluido intersticial”, originado a partir del ultrafiltrado de sangre capilar^{1,2}.

Desde el punto de vista químico, la matriz extracelular está conformada por glicoconjugados organizados en dos grandes categorías: Glicoproteínas y proteinglicanos. Estos glicoconjugados interactúan específica y selectivamente entre sí y son reconocidos por moléculas de adhesión celular presentes en las células tanto estromales como parenquimatosas. Sin embargo, un elemento clave dentro de la constitución de la matriz extracelular es el ácido hialurónico, el cual ayuda a configurar la trama tridimensional de la matriz extracelular junto con los glicoconjugados^{1,2,3,4}.

El ácido hialurónico o hialuronato es una molécula filogenéticamente conservada, formada por repeticiones de disacáridos, pertenece estructuralmente a los amino-azúcares denominados glicosaminoglicanos (GAGs) no sulfatados. Otros GAGs son fundamentales en la biosíntesis de las versiones sulfatadas de los proteinglicanos de la matriz extracelular^{1,2}. Algunas bacterias lo poseen como componente de sus cápsulas y en ciertas especies es un componente vital para el mantenimiento de las funciones de los tejidos cartilagosos y en particular en la variedad superespecializada de los discos de crecimiento. Además, es un componente del líquido sinovial, del humor vítreo y es esencial en los procesos de fertilización, pues los distintos fluidos del tracto genital femenino son ricos en él⁵.

Tanto el estroma como la matriz extracelular son primordiales para funciones de morfogénesis, ya sea ontogénica, de recambio, o neoplásica. La morfogénesis de recambio a su vez puede ser constitutiva en el caso de la remodelación tisular normal, o inducible cuando se requiere de la regeneración y/o cicatrización luego de una lesión traumática, en este último caso se instaura además el proceso inflamatorio, como mecanismo de defensa, tolerancia e inducción de la morfogénesis. El ácido hialurónico como componente de esa matriz extracelular, cumple roles definitivos en la génesis, mantenimiento y resolución de la inflamación subyacente^{1,2,3,4}.

Recientemente ha surgido información proveniente de observaciones del papel anti-inflamatorio y estabilizador de la matriz extracelular de esta molécula, por medio de un complejo proteico denominado Inter-Alfa-Inhibidor⁵.

Estructura, biosíntesis y recambio del ácido hialurónico

El ácido hialurónico es un polisacárido lineal formado por unidades de disacáridos (GAGs) constituidas por ácido glucorónico y N-Acetil-Glucosamina (NAcGlu). Aunque otros GAGs sulfatados como los proteinglicanos se sintetizan en el aparato de Golgi, no sucede lo mismo con el ácido hialurónico, el cual es ensamblado por unas enzimas de la membrana plasmática o plasmalema, denominadas Ácido Hialurónico-Sintetasas (HAS), de las cuales existen tres 3 isoenzimas: HAS1, HAS2 y HAS3^{6,7,8}.

Las proteínas que reconocen el ácido hialurónico están interrelacionadas entre sí y se denominan hialuroadherinas. Algunas son catalogadas como proteínas solubles del tipo TSG6 (del inglés-Tumor Necrosis Factor-stimulated gene 6) y CTRL1 (Proteínas de unión a los tejidos cartilagosos) y otras funcionan como moléculas de adhesión celular como RHAMM, denominada también en nomenclatura especializada como CD168; RHAMM es un receptor para ácido hialurónico, cuya activación induce la quimiotaxis. Muchas hialuroadherinas son proteinglicanos solubles, como el versicán y el agregán y otras se acoplan a la membrana como los CD44s^{6,7,8}. De las CD44 se producen por corte y empalme alternativo del ARNm más

de 20 versiones proteicas, incluidas algunas aquellas no asociadas a GAGs. Se considera también que CD44 puede ser una ruta de recaptación para degradación lisosomal^{9,10}.

Dentro de las enzimas que degradan específicamente el ácido hialurónico se encuentran las hialuronidasas o hialuronoglucosaminidasas (HYAL), conservadas filogenéticamente desde las bacterias y que a algunos gérmenes Gram positivos como el *Staphylococcus aureus* les confiere capacidad invasiva. En los seres humanos se han encontrado hasta la fecha, 6 genes codificantes de hialuronidasas, una de ellas expresada por los lisosomas, otras membranales y otras consideradas como productos de secreción. Dentro de las membranales se encuentran las expresadas por la membrana de los espermatozoides y otra que corresponde a un antígeno expresado por células neoplásicas de meningiomas^{9,10,11}. En la tabla 1 se recopila la información correspondiente a las HAS, las HYAL y algunas hialuroadherinas.

Aislamiento del Inter-Alfa-Inhibidor (IAI)

En 1961 Seibuch y Loeb y posteriormente en 1965 Heide y cols., identificaron un inhibidor de la proteasa con actividad de antitripsina, aislada a partir del plasma sanguíneo y una concentración estimada de 0,5-mg/mL. Subsecuentes estudios electroforéticos determinaron un patrón concordante con una alfa-2-globulina y la denominaron Inter-Alfa-Tripsina-Inhibidor. Posteriormente y acorde con el hecho de que la Tripsina solo está en plasma bajo circunstancias patológicas como la pancreatitis, se le reasignó el nombre de Inter-alfa-Inhibidor (IAI)^{12,13}.

Estructura del Inter-Alfa-Inhibidor (IAI)

El IAI es producido primordialmente por los hepatocitos, posee una variedad de alto peso molecular organizada a manera de 3 proteínas, con dos cadenas pesadas homólogas de 75kDa y una cadena

TABLA 1. Algunas ácido hialurónico- sintetas, hialuronidasas e hialuronoadherinas recientemente caracterizadas.

PROTEÍNA	OTROS NOMBRES	CÓDIGO MIM	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	ENTIDAD PATOLÓGICA ASOCIADA
HAS1 (Hialuronato-Sintetasa)		601463	19q13.3.-13.4	?
HAS2		601636	8q24.12	?
HAS3		602428	16q22	?
HYAL1 (Hialuronidasa)		607071	3p21.3-21.2	Mucopolisacaridosis tipo IX
HYAL2	LUCA2	603551	3p21.3	?
HYAL3	LUCA3	604038	3p21.3	?
HYAL4		604510	7q31	?
SPAM1 (Adhesion molecule 1)	PH20	600930	7q31	?
MGEA5 (Meningioma expressed antigen 5 hyaluronidase)		No definido	10q24.1-24.3	?
RHAMM (Hyaluronan-mediated motility receptor)	CD168	600936	5q33.2	?
LYVE1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1)		605702	11	?
CD44		107269	11p13	?
CRTL1 (Cartilage link protein)		115435	5q13-q14.1	?
TSG6 (Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 6)	TNFAIP6		2	?
Versican	CSPG2 (Condritin-Sulfato Proteinglicano 2)	118661	5q12-14	?

liviana de 16kDa, denominada como bikunina. También posee una variedad de bajo peso molecular detectable en el plasma y formada por una sola cadena¹⁴.

Para la función de acoplamiento extracelular, el ácido hialurónico participa a través de la hialuroadherina TSG6¹⁴. En la tabla 2 se ponen de manifiesto los diversos componentes de esta proteína.

Cadena Liviana (ITIL) y Cadenas Pesadas (ITIHs) del IAI

Existe un solo gen que codifica la cadena liviana (ITIL) y al menos 4 tipos distintos de cadenas pesadas (ITIH) identificadas, de las cuales HC1 y HC2 hacen parte de la isoforma de alto peso molecular, mientras que HC3 se encuentran en la isoforma de bajo peso molecular, denominada como pre-alfa inhibidor¹⁴⁻²².

TABLA 2. Composición estructural del inter-alfa-inhibidor

PROTEÍNA	NOMBRES ACCESORIOS	CÓDIGO MIM	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	ENTIDAD PATOLÓGICA ASOCIADA
AMBP (Alfa-1-microglobulina/bikunina precursor)	Proteína HC, ITIL (Cadena liviana del Inter-Alfa-Inhibidor)	176870	9q32-33	?
ITIH1 (Cadena pesada isotipo 1 del Inter-alfa-Inhibidor)		147270	3p21.2-21.1	Polimorfismos génicos no fenotípicos, generadores de 3 alelos: ITI*1, ITI*2 e ITI*3. Han sido también detectados otras variantes alélicas en Irán y Korea del Sur.
ITIH2 (Cadena pesada isotipo 2 del Inter-alfa-Inhibidor)		146640	10p15	?
ITIH3 (Cadena pesada isotipo 3 del Inter-alfa-Inhibidor)		146650	3p21.2-21.1	?
ITIH4 (Cadena pesada isotipo 4 del Inter-alfa-Inhibidor)	PK120 (Proteína sensitiva a la calicreína plasmática) ITIH1 (Similar a la cadena pesada) IHRP (Proteína relacionada a la cadena pesada)	600564	3p21.2-p14.1	Polimorfismos génicos en Japón ligados a Susceptibilidad a Hipercolesterolemia
TSG6 (Gen 6 regulado por TNF)	TNFAIP6 (Proteína inducida por TNF)	600410	2	?

HC4, otra de las cadenas pesadas, también denominada PK120 no participa de la estructura del Inter-Alfa-Inhibidor, sino que es un blanco altamente específico para la proteasa plasmática calicreína (KLK3), una serina-proteasa que participa en los procesos fisiológicos de coagulación, fibrinólisis y activación del complemento. Sin embargo, no se conoce con certeza el papel de HC4, a pesar de su maduración proteolítica por KLK3²³⁻²⁶.

La bikunina (ITIL), posee actividad anti-proteasa, su estructura y función está determinada por dos dominios del tipo Kunitz, los cuales neutralizan proteasas con distinta especificidad. Por lo anterior, la bikunina se clasifica dentro del grupo de las Serpinas (Serina-proteasa inhibidores)^{27,28}.

Tanto la bikunina como las cadenas pesadas del IAI son sintetizadas a partir de un precursor común. El gen codificante de esta proteína posee 10 exones y 9 intrones, de los cuales se escinden los exones 6 y el 7, involucrados en la síntesis del extremo carboxi-terminal de la alfa-1-microglobulina y amino-terminal de la bikunina, respectivamente. Sobre los precursores generados ocurren escisiones proteolíticas dentro del retículo endoplásmico rugoso, resultando relevante en este proceso, el clivaje en el extremo carboxi-terminal de las cadenas pesadas²⁹⁻³⁴.

En el aparato de Golgi, los extremos carboxi-terminales de las cadenas pesadas clivadas son esterificados y la esterificación sucede en forma tal, que dentro del complejo se observan extremos alfa-carboxilo (carbono 6) carboxi-terminales de cadenas pesadas esterificadas, con el mismo GAG en el carbohidrato GalNAc (N-Acetil-Galactosamina)²⁹⁻³⁴.

En su proceso de síntesis la bikunina sigue también la ruta endomembranal secretoria de exportación del aparato de Golgi, siendo N-glicosilada con un oligosacárido de 2kDa, o bien O-glicosilada, para posteriormente ser liberada en forma aislada, o acoplada a un GAG tipo coindritín-sulfato de 7kDa. La bikunina madura se denomina dominio HI-30 del precursor común²⁹⁻³⁴.

Alfa-1-microglobulina

Es una proteína filogenéticamente conservada, perteneciente a la familia de las lipocalinas, con una masa molecular es de 31kDa y aislada originalmente a partir de la orina de pacientes con envenenamiento crónico con cadmio. Normalmente se encuentra en bajas concentraciones, ya sea libre, o formando complejos con la inmunoglobulina A (IgA), en sangre, líquido cefaloraquídeo, orina y en el estroma de tejidos conectivos. Abundantemente se encuentra en el espacio extracelular o interfase celular de los pulmones, intestino, riñones y placenta. Sus niveles se incrementan en pacientes con síndrome nefrótico, proteinuria tubular y en la sangre y orina de pacientes sometidos a diálisis renal^{35,36}.

En ranas y en peces se correlaciona con la coloración críptica, debido a que une cromóforos amarillo-café de pequeña talla, generados por grupos prostéticos unidos a los residuos aminoácidos en ella. Las lipocalinas son un grupo de más de 150 proteínas relacionadas estructuralmente, de expresión predominantemente extracelular, presentes en eubacterias, con una masa molecular promedio de 18-20kDa y que poseen una homología menor al 20% entre sí. Están capacitadas para acarrear pequeñas moléculas lipofílicas tales como vitaminas, agentes inmunogénicos y moléculas odorantes, minimizando el contacto de éstas con solventes^{35,35}.

En el aparato de Golgi o en vesículas cargoexocítica, la alfa-1-microglobulina o proteína plasmática HC se libera del extremo aminoterminal del precursor de la bikunina por clivaje proteolítico^{35,36}.

Proteína TSG6

Es una proteína de 277 aminoácidos y masa molecular de 35-9kDa, secretada por varias células en respuesta al estímulo de citoquinas pro-inflamatorias como la Interleuquina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). En su extremo carboxiterminal reside su actividad de hialuroadherina y teniendo en cuenta su actividad anti-inflamatoria, es evidente que se constituye en un mecanismo de retroalimentación negativa generado a partir de las citoquinas sintetizadas y liberadas en la fase aguda de la inflamación³⁷⁻⁴¹.

Integración: inter-alfa-inhibidor y el ácido hialurónico

Estabilización Estructural de la Matriz Extracelular

La formación de un complejo formado por el inter-alfa-inhibidor (IAI) y el ácido hialurónico se esbozó por primera en la matriz extracelular del cúmulo oóforo de oocitos, procedentes de la fase ovulatoria menstrual normal. El proceso se inicia con la producción de una matriz rica en ácido hialurónico, el cual se acopla al IAI para constituir un complejo relativamente estable que pueda desacoplarse e inducir la liberación del oocito hacia las fimbrias oviductales del tracto genital femenino. Este complejo, descrito en la literatura como SHAP-AC (Serum derived Hyaluronan Associated Protein-Acid Hialuronic) se puede encontrar de igual manera en el plasma sanguíneo circulante⁴²⁻⁴⁴.

Las especificaciones precisas del proceso no se conocen en su totalidad pero se ha demostrado que el ácido hialurónico libre, o unido a la hialuroadherina CD44, se une covalentemente a las cadenas pesadas del IAI, con la consecuente liberación de la bikunina; posteriormente la hialuroadherina TSG6 es reclutada y estabiliza la matriz resultante. TSG6 también puede participar en la transferencia de las cadenas pesadas a partir del IAI hacia el ácido hialurónico⁴²⁻⁴⁴.

En las cadenas pesadas se ha detectado un dominio vWFA (von Willebrandt Factor tipo A) que reconoce y une colágenos, lo que promovería una mayor estabilidad del complejo (45-47). Otra forma de estabilización del complejo se relaciona con los potenciales sitios de unión al calcio contenidos en las cadenas pesadas y aún más importante, con la presencia de regiones homólogas a dominios inhibidores de cisteína-proteinasas (cistininas⁴⁵⁻⁴⁷).

Efectos anti-inflamatorios

Con base en lo descrito, los efectos anti-inflamatorios, evidentes tanto a nivel sanguíneo como a nivel tisular estromal, pueden explicarse por 5 mecanismos:

1. La liberación de la bikunina, ejerce un efecto de anti-proteasa serpina^{37,40}.
2. La actividad anti-proteasa, potenciada adicionalmente por el efecto anti-proteasa frente a la plasmina de la TSG6, evita directa o indirectamente un exceso de quimiotaxis leucocitaria, especialmente neutrofílica, asociada a la degradación de la membrana basal endotelial y de la matriz extracelular vascular, inducida previamente por el sistema plasminógeno-plasmina y las metalo-proteinasas (MMPs), en particular la MMP9. De la misma manera, también es neutralizada la actividad proteolítica de las elastasas del neutrófilo⁴⁸⁻⁵¹.
3. Las cadenas pesadas ligadas al ácido hialurónico protegen al TSG6 del daño potencial ocasionado por radicales libres⁴²⁻⁴⁴.
4. La alfa-1-microglobulina, una lipocalina con propiedades inmunosupresoras de los leucocitos sanguíneos, muestra además actividad anti-inflamatoria y protectora. El efecto inmunosupresor deriva de la capacidad inhibitoria del complejo alfa-1-microglobulina-IgA, en la quimiotaxis de neutrófilos⁴⁸⁻⁵¹.
5. La posible actividad cistanina (cisteína proteasa-inhibidor) de las cadenas pesadas, permitiría neutralizar calpaínas y catepsinas intracelulares leucocitarias⁴⁵⁻⁴⁷.

Conclusiones

El IAI es un complejo molecular con actividad de antiproteasa, serpina y cistanina, que ejerce funciones estabilizantes en la estructura de la matriz extracelular, al permitir la formación de complejos con el ácido hialurónico. Por su actividad antiproteasa ejerce efectos anti-inflamatorios, bloqueando la actividad inmunológica de enzimas tanto plasmáticas, como liberadas por inmunocitos tipo neutrófilos.

Un mayor conocimiento de su estructura y función permitirá abrir un nuevo campo de acción inmunoterapéutica e inmunofarmacológica para las enfermedades inflamatorias.

Referencias

1. Badylak SF. Regenerative medicine and developmental biology: the role of the extracellular matrix. *Anat Rec B New Anat.* 2005; 287:36-41.
2. Labat-Robert J, Robert L. Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function. *Pathol Biol. (Paris)* 200; 53:369-71.
3. Spicer AP, Tien JY. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72:89-108.
4. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Apr; 12(2):79-87. Review.
5. Fries E, Kaczmarczyk A. Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50; 735-42.
6. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997; 242:27-33.
7. Knudson W, Chow G, Knudson CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biol.* 2002; 21:15-23.
8. McDonald JA, Camenisch TD. Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. *Glycoconj J.* 2002; 19:331-9.
9. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13:105R-115R.
10. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83:317-25.
11. Stern R, Jedrzejas MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006; 106:818-39.
12. Steinbluch M, Loeb J. Isolation of an alfa2-globulin from human plasma. *Nature* 1961; 192: 116-203.
13. Heide K, Heimburger N, Haupt H. An inter-alpha-trypsin inhibitor of human serum. *Clin Chim Acta* 195; II: 82-5.
14. Bost F, Bourguignon J, Martin JP et al. Isolation and characterization of the human inter-alpha-trypsin inhibitor heavy-chain H1 gene. *Europ J Biochem.* 1993; 218: 283-291.
15. Bourguignon J, Diarra-Mehrpour, M Thiberville et al. Human pre-alpha-trypsin inhibitor-precursor heavy chain cDNA and deduced amino-acid sequence. *Europ J Biochem* 1993; 212: 771-776.
16. Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesboue R et al. Human Plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *Europ J Biochem.* 1989; 179: 147-154.
17. Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sarafan N et al. Tandem orientation of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1 and H3 genes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1219: 551-554.
18. Diarra-Mehrpour M, Sarafan N, Bourguignon J et al. Human inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 gene: genomic organization, promoter analysis, and gene linkage. *J Biol Chem.* 1998; 273: 26809-26819.
19. Enghild JJ, Thogersen IB, Pizzo et al. Analysis of inter-alpha-trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre-alpha-trypsin inhibitor, from human plasma: polypeptide chain stoichiometry and assembly by glycan. *J Biol Chem.* 1989; 264: 15975-15981.
20. Salier JP, Diarra-Mehrpour M, Sesboue R et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding the heavy chain of human inter-alpha-trypsin inhibitor (I-alpha-TI): unambiguous evidence for multipolypeptide chain structure of I-alpha-TI. *Proc Nat Acad Sci. USA* 1987; 84: 8272-8276.
21. Salier JP, Simon D, Rouet P et al. Homologous chromosomal locations of the four genes for inter-alpha-inhibitor and pre-alpha-inhibitor family in human and mouse: assignment of the ancestral gene for the lipocalin superfamily. *Genomics* 1992; 14: 83-88.
22. Traboni C, Tosini F, Covone A et al. The gene coding for proteins HC and HI-30 of inter-alpha-trypsin inhibitor maps to 9q22.3-q33. *Cytogenet Cell Genet.* 1989; 50: 46-48.
23. Fujita Y, Ezura Y, Emi M et al. Hypercholesterolemia associated with splice-junction variation of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITI4) gene. *J Hum Genet.* 2004; 49: 24-28.
24. Nishimura H, Kakizaki I, Muta T et al. cDNA and deduced amino acid sequence of human PK-120, a plasma kallikrein-sensitive glycoprotein. *FEBS Lett.* 1995; 357: 207-211.
25. Saguchi K, Tobe T, Hashimoto K et al. Cloning and characterization of cDNA for inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein (IHRP), a novel human plasma glycoprotein. *J Biochem.* 1995; 117: 14-18.
26. Tobe T, Saguchi K, Hashimoto K et al. Mapping of human inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein gene (ITIHL1) to human chromosome 3p21-p14. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71: 296-298.
27. Wachter E, Hochstrasser K. Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter-alpha-trypsin inhibitor IV: the amino acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography. *Hoppe-Seyley's Z Physiol Chem.* 1981; 362: 1351-5.
28. Xu Y, Carr PD, Guss JM et al. The crystal structure of bikunin from the inter-alpha-inhibitor complex: a serine proteinase inhibitor with two Kunitz domains. *J Mol Biol.* 1998; 276: 955-66.
29. Blom AM, Thuvenson M, Fries E. Intracellular coupling of bikunin and the heavy chain of rat pre alpha-inhibitor in COS-1 cells. *Biochem J.* 1997; 328: 185-91.
30. Bratt T, Olsson H, Sjöberg EM et al. Cleavage of the alfa-1-microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1157: 147-54.
31. Enguild JJ, Salvensen G, Hefta SA et al. Choindritin-4-sulfate covalently cross-links the chains of the human blood protein pre-alpha-inhibitor. *J Biol Chem.* 1991; 266: 747-51.
32. Kaczmarczyk A, Thuvenson M, Fries E. Intracellular coupling of the heavy chain of pre-alpha-inhibitor to chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* 2002; 277: 13578-82.
33. Morelle W, Capon C, Balduyck M et al. Chondrotin-sulphate covalently cross-links the three polypeptide chains of inter-alpha trypsin inhibitor. *Eur J Biochem.* 1994; 221: 881-8.
34. Thuvenson M, Fries E. Intracellular proteolytic processing of the heavy chain of rat pre-alpha inhibitor. The COOH-terminal propeptide is required for coupling to bikunin. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6741-6.
35. Fries E, Bloom AM. Bikunin-nos just a plasma proteinase inhibitor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32: 125-37.
36. Vetr H, Gebhard W. Structure of the human alpha-1-microglobulin-bikunin gene. *Hoppe-Seyley's Biol Chem.* 1990; 371: 1185-1196.
37. Klampfer L, Lee TH, Hsu W et al. NF-IL6 and AP-1 cooperatively modulate the activation of the TSG-6 gene by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Molec Cell Biol.* 1994; 14: 6561-6569.

38. Lee TH, Klampfer L, Shows TB et al. Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor- and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem.* 1993; 268: 6154-6160.
39. Lee TH, Wisniewski HG, Vilcek J. A novel secretory tumor necrosis-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol.* 1992; 116: 545-557.
40. Wisniewski HG, Vilcdek J. TSG-6: an IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 143-56.
41. Wisniewski HG, Burgess WH, Oppenheim JD et al. TSG-6, an arthritis-associated hyaluronan binding protein, forms a stable complex with the serum protein inter-alpha-inhibitor. *Biochemistry* 1994; 33: 7423-9.
42. Blom A, Pertoft H, Fries E. Inter-alpha-inhibitor is required for the formation of hyaluronan-containing coat on fibroblasts and mesothelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 270: 9698-701.
43. Bork P, Rohde K. Move von Willebrand factor type A domains) sequence similarities wit malaria thrombospondin-related anonymous protein, dihydropyridine-sensitive calcium channel and inter-alpha-trypsin inhibitor. *Biochem J.* 1991; 279: 908-10.
44. Chen L, Wert SE, Hendrix EM et al. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 236-47.
45. Chen L, Mao SJ, Larsen WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. *Mol Reprod Dev.* 1993; 34: 87-93.
46. Chen L, Mao JT, Mc Lean LR et al. Proteins of the inter-alpha-inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J Biol Chem* 1994; 269: 28282-7.
47. Jenssen TEC, Odum L. Role of tumour necrosis factor stimulated gene 6(TSG-6) in the coupling of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. *Reproduction* 2003; 125: 37-31.
48. Getting SJ, Mahoney DJ, Cao T et al. The link module from human TSG-6 inhibits neutrophil migration in a hyaluronana- and inter-alpha-inhibitor-independent manner. *J Biol Cehm* 2002; 277: 51068-76.
49. Hutadilok N, Ghosh P, Brooks PM. Binding of haptoglobin, inter-alpha-trypsin inhibitor and alfa-1-proteinase inhibitor to synovial fluid hayluronate and the influence of these proteins on its degradation by oxygen derived free radicals. *Ann Rheum Dis.* 1988; 47: 377-85.
50. Mendez E, Fernandez-Luna JL, Grubb A et al. Human protein HC and its IgA complex are inhibitors of neutrophil chemotaxis. *Proc Nat Acad Sci. USA* 1986; 83: 1472-1475.
51. Wisniewski HG, Hua JC, Popper DM et al. TNF/IL-1-inducible protein TSG-6 potentiates plasmin inhibition by inter-alpha-inhibitor and exerts a strong anti-inflammatory effect in vivo. *J Immunol.* 1996; 156: 1609-15.