



Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias

<http://rccp.udea.edu.co>

RCCP

Comparación de la activación y la cinética de la plasmina bufalina con la humana[✉]

Comparative activation and kinetic of plasmin bufaline with the human one

Ativação e cinética comparativa da plasmina bufalina e a humana

Omaira Cañas Bermúdez¹, BSc; Alfonso Quijano Parra², BsC, PhD; Luis F Arbeláez Ramírez^{1*}, MD, PhD.

¹Grupo de Investigación en Biomoléculas, ²Grupo de Investigación en Química, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Km 1 vía Bucaramanga. Pamplona-Colombia.

(Recibido: 14 febrero, 2008; aceptado: 26 enero, 2010)

Resumen

El plasminógeno es el zimógeno de la plasmina, enzima activada a nivel fisiológico por el activador tisular del plasminógeno y la urokinasa, la plasmina es la enzima encargada de disolver el coágulo sanguíneo. En este estudio se compararon la plasmina humana con la bufalina en su forma de activación de zimógeno a enzima y en la afinidad hacia el sustrato cromogénico. Los plasminógenos fueron purificados por el mismo método de cromatografías de afinidad y cambio iónico. De igual manera las activaciones se hicieron utilizando urokinasa humana en ambos casos. La plasmina bufalina demostró mayor activación y afinidad (1.35mM) que la plasmina humana (2.16 mM), siendo la bufalina 1.5 veces mas afin al sustrato cromogénico que la humana. Este estudio demuestra que el método de purificación de los plasminógenos puede ser el mismo para muchas especies, se demuestra una vez más que las plasminas animales al parecer son más eficientes en la disolución del coágulo o degradación de sustratos, que la plasmina humana. Este estudio indica que la plasmina bufalina puede ser utilizada en los parámetros que se determinan clínicamente en pacientes con problemas cardiovasculares, reduciendo el tiempo de determinación de estos parámetros fibrinolíticos, que pueden dar al médico un margen de tiempo superior para actuar.

Palabras clave: cinética, fibrinólisis, glu-plasminógeno, plasmina, urokinasa.

Summary

The Plasminogen is the zymogene of the Plasmin, enzyme which physiologically is activated by two different enzymes, the tissue plasminogen activator and the urokinase, the plasmin is the enzyme that

✉ Para citar este artículo: Cañas O, Quijano A, Arbeláez LF. Comparación de la activación y la cinética de la plasmina bufalina con la humana. Rev Colomb Cienc Pecu 2010; 23:47-54

* Autor para correspondencia: Luis Fernando Arbeláez Ramírez. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona. Km 1 vía Bucaramanga. Pamplona-Colombia. Correo electrónico: luifer@unipamplona.edu.co

dissolves blood clots. In this study the human plasmin was compared to the bufaline plasmin, in the activation from the zymogene to the enzyme form as well as in the affinity to the chromogenic substrate. The two plasminogens were purified by the same chromatographies methods: affinity and ion-exchange. Furthermore, both plasminogens were activated by human urokinase. The bufaline plasmin showed more activation and affinity (1.35 mM) than the human plasmin (2.16 mM), in addition, the bufaline plasmin demonstrated a 1.5 times more affinity to the chromogenic substrate than the human plasmin. This study demonstrated that the plasminogens of several species can be purified by this method. Besides, one more time the animal's plasmins probably to be more efficient in the dissolution of blood clots or degradation of substrates than the human plasmin. More over this study indicated that the bufaline plasmin can be used in clinical determinations of patients with cardiovascular diseases. This also reduces the determination time of fibrinolytic parameters that physicians can give, having more time to take appropriate treatment.

Key words: fibrinolysis, glu-plasminogen, kinetics, plasmin, urokinase.

Resumo

O plasminogênio é o zymogen da plasmina, enzima ativada a nível fisiológico pelo ativador tissular do plasminogênio e uroquinase, plasmina é a enzima responsável de dissolver o coágulo de sanguíneo. neste estudo foi comparada a plasmina humana com a plasmina búfalina em seu modo de ativação de zymogen a enzima e na afinidade substrato cromogênico. Os plasminogênio foram purificados com o mesmo método de cromatografia de afinidade e de troca iônica, e as ativações foram feitas usando uroquinase humana nos dois casos. A Búfalo plasmina mostrou maior ativação e afinidade (1.35 mM) que a plasmina humana (2.16 mM), sendo a bufalina 1.5 vezes mais afim ao substrato Cromogênico que a humana. Este estudo mostrou que o método de purificação do plasminogênios pode ser o mesmo para muitas espécies, além disso, que as plasminas animais são mais eficientes na dissolução do coágulo o degradação de substratos que a plasmina humana. Este estudo indicou que a plasmina búfalo pode ser utilizada nos parâmetros determinados clinicamente em pacientes com problemas cardiovasculares, diminuindo o tempo de determinação destes parâmetros fibrinolíticos, que podem dar ao médico um intervalo de maior tempo para atuar.

Palavras chave: fibrinólise, glu-plasminogênio, plasmina, uroquinase.

Introducción

El sistema de coagulación comprende cuatro eventos básicos, adhesión, activación, agregación plaquetaria y formación de la fibrina, que interactúan con las paredes de los vasos sanguíneos, en casos patológicos pueden obstruir la circulación (Spronk *et al.*, 2004).

La coagulación inicia por la exposición del factor tisular, formando complejo con los factores VIIa y X activado (a), generando pequeñas cantidades de trombina la cual convierte el fibrinógeno en fibrina. Dentro de los anticoagulantes que regulan la coagulación están las proteínas C y S, que degradan el factor Va, el cual en complejo con el factor Xa potencian la producción de trombina. El trombo sirve además en el desarrollo del mecanismo fibrinolítico que activa el plasminógeno (Plg) a

plasmina (Pli) esta última degrada la acumulación de fibrina, formando los productos de degradación de la fibrina y facilitando el correcto flujo sanguíneo (Walsh y Ahmad, 2002).

El Plg, está en la circulación sanguínea, su concentración plasmática es 2 μM (Wallen, 1980). La conversión del Plg a Pli involucra un corte proteolítico del enlace Arg₅₆₁-Val₅₆₂, el cual es mediado por los activadores, tisular del Plasminógeno (t-PA) y el tipo Urokinasa (u-PA). Estos activadores en la circulación son regulados por los Inhibidores de los activadores del Plg tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI 2), la Pli por la α_2 -antiplasmina (α_2 -AP) y la α_2 -macroglobulina (Hernández y Marrero, 2005; Hyldgaard *et al.*, 1993).

La pro-uroquinasa tiene 54 kDa su activación ocurre por la acción de la Pli que hidroliza el enlace

Lis₁₅₈-Ile₁₅₉ formando cadenas polipeptídicas de 20 y 34 kDa unidas por un puente disulfuro. (Bajaj y Castellino, 1977; Hernández y Marrero, 2005).

El complejo formado entre enzima-sustrato y la cinética fue propuesto por Michaelis-Menten (Michaelis y Menten, 1913), ha sido estudiada en otros Plgs de otras especies por Cañas *et al.* (Cañas *et al.*, 2006; Cañas *et al.*, 2007) Plg bovino (Schaller *et al.*, 1985), Equino (Marcum *et al.*, 1982), Canino (Leytus *et al.*, 1981), Ovino (Paoni *et al.*, 1977), porcino (Brunisholz y Rickli, 1981), algunas de estas especies comparadas con el humano por varios autores (Wolh *et al.*, 1983), pero hasta la fecha la literatura no ha reportado evidencia sobre el estudio del Plg bufalino.

En este estudio se compara la activación y cinética de la Pli bufalina con la humana, lo que ampliara los conocimientos sobre el sistema fibrinolítico de especies mamíferas que contribuirá a un mejor entendimiento y manejo de los problemas cardiovasculares que agobian sobre todo al ser humano.

Materiales y métodos

Reactivos

Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), ϵ -amino ácido caprioico (ϵ -ACA) y ácido clorhídrico de (Fabroquim), cloruro de sodio (NaCl), dimetilsulfoxido (DMSO) y acetato de sodio anhidro de (Riedel-de-Haën), N,N'-Metilen-bisacrilamida, persulfato de amonio, β -mercaptoetanol, sodio dodecyl sulfato (SDS), di-hidrógeno fosfato de sodio dihidratado de (Merck), lisina-sefarosa-4B de (Amersham Biosciences), ácido acético concentrado de (Baker), sustrato cromogénico para Pli Spectrozyme y u-PA (110.000 UI/ml) de (Amdia).

El volumen utilizado de sustrato fue el mismo para todas las pruebas (60 μ l) a una concentración de 0.3 mM, el estándar de peso molecular usado fue: 180 KDa (α_2 -macroglobulina), 92 KDa (Glu-Plg), 66 KDa (cadena- α , fibrinógeno humano), 52 KDa (cadena- β , fibrinógeno humano), 46 KDa (cadena- γ , fibrinógeno humano), 23.8 KDa (Tripsina), y el agua tipo 3, ambos de los laboratorios de Investigación en Biomoléculas (Universidad de Pamplona).

Toma y procesamiento de las muestras

La muestra del plasma humano fue suministrada por el Hospital Erasmo Meoz de la ciudad de Cúcuta-Colombia, analizado y certificado libre de antígenos como hepatitis, VIH, Chagas y otras enfermedades infecciosas.

La muestra del plasma bufalino fue tomada con la autorización del comité de ética de la Universidad de Pamplona, aprobada el 13 de julio de 2004. Dicha muestra se tomó bajo la supervisión de un médico veterinario, siguiendo las recomendaciones contempladas en el título V del decreto 08430, en la Granja experimental Villa Marina, propiedad de la Universidad de Pamplona, utilizando bolsas para extracción sanguínea con solución anticoagulante de citrato, fosfato, dextrosa y adenina (CPDA-1) de (BAXTER). A la sangre obtenida, se le añadió PMSF disuelto en DMSO, a una concentración final de 1 mM, con el fin de inhibir la actividad de las serino proteasas. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y el plasma separado por centrifugación a 7.000 r.p.m. durante 15 min. a 4 °C.

Purificación de los Plasminógenos

Los Plgs de las dos especies mamíferas fueron purificados por cromatografía de afinidad en Lisina-sefarosa, en un cromatógrafo Biologic LP (Biorad Laboratories, Hercules) según el método de Deutsch and Mertz (Deutsch y Mertz, 1970), la concentración fue determinada utilizando el coeficiente absorción de $(\epsilon^{1\%})_{1\text{cm}} = 1.6$ (Appel *et al.*, 1994), los Plgs fueron concentrados en una celda Amicon (Millipore, Bedford) utilizando membranas de celulosa regenerada de 10 kDa, hasta aproximadamente 1 mg/ml, luego se dializaron toda la noche a 4°C con buffer 0.06M Tris, 0.06M NaCl, 0.02M HCl pH 8.5. Buffer (A) en una manguera de diálisis de 25 mm (Fisherbrand).

Posteriormente los Plgs obtenidos, fueron separados por cromatografía de cambio iónico según el método de Cañas (Cañas *et al.*, 2006), la concentración del Plg fue determinada y las muestras fueron concentradas como se realizó en la cromatografía de afinidad y almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

Análisis electroforético

Las electroforesis SDS-PAGE se realizaron de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras de Plgs de 5 µg fueron mezcladas con el buffer de muestra en un volumen 1:1 (vol/vol), fueron tratadas térmicamente por cinco minutos a 100 °C y fueron visualizadas por tinción de Azul brillante de Coomassie. El marcador de peso molecular que se utilizó se describe en materiales y métodos.

Activación de los Plasminógenos

Se utilizó 1 mg para cada uno de los Plgs a una concentración de 1mg/ml y a una temperatura constante de 37 °C, a los cuáles se les adicionó 6.72 µl de u-PA para una concentración final de 739.2 UI/ml “Solución activada”. Se monitoreó espectrofotométricamente A_{405} , así: se tomaron ocho tubos con 60 µl de sustrato equivalentes a los diferentes tiempos de incubación (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 15 minutos) a los cuales se les adicionaron 3 µl de la “solución activada”, se dejaron reaccionar por 12 segundos, deteniendo la reacción con la adición de 10 µl de buffer acetato (BA) 4 M pH 3.8.

Al minuto 15, la activación de los Plgs se detuvo adicionando a las soluciones del “Plg activado”, 323 µl de glicerol al 100%, de tal manera que la concentración de glicerol final fue de 25%. La muestra activada, se homogenizó y se marcó con el número de lote correspondiente. Posteriormente, se porcionó y se almacenó a -20 °C.

Adicionalmente, se determinó la absorbancia A_{405} de las ocho incubaciones, y se gráfico la A_{405} Vs. el tiempo de incubación.

Determinación de la concentración de Plasmina

De acuerdo al proveedor del sustrato cromogénico, la hidrolización con 10 (mA_{405}) a 37 °C corresponde a 1nM de Plis (Vinazzer, 1988).

A los tubos con sustrato, se les agregó 3 µl de la solución final activada y se incubaron por 0, 1 y 2 minutos respectivamente, la reacción se detuvo

adicionando 10 µl de BA. La A_{405} se determinó para cada tubo y se convirtió en mA_{405}/min .

Cinética de la Pli

Se estudió la cinética de las dos especies de Pli partiendo de una concentración común para ambas Plis de 2.7 µM, a una temperatura de 37 °C y un pH 7.3. Su actividad se determinó por la velocidad de transformación del sustrato espectrofotométricamente a 405 nm utilizando las siguientes concentraciones de sustrato: 0.05, 0.08, 0.10, 0.13, 0.18, 0.25, 0.30 mM, a los cuales se les adiciono 3 µl de cada Pli. La reacción se detuvo con 10 µl de BA.

La absorbancia se determinó y se gráfico según la ecuación de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934).

Transferencia directa de los Plgs humano y bufalino a una membrana de (PVDF)

Para determinar la secuencia del N-terminal de los dos Plgs se realizó el método de transferencia como sigue: Se tomaron 2 µl de la proteína y se diluyó en 500 µl de ácido acético (CH_3CH_2OH), en agua desionizada tipo I al 0.1 % en un tubo para microcentrifuga. A continuación se tomaron varios trozos de membrana PVDF de un tamaño no mayor a 3 X 3 mm, y se humedecieron con metanol al 99% durante 15 segundos. A la solución proteica diluida se añadió un trozo de membrana PVDF totalmente húmeda con metanol, se agitó suavemente durante tres minutos y se mantuvo a una temperatura de 5 - 8 °C agitando de igual manera cada 8-12 horas, luego de 2 días, se secó, se lavó 2 veces con metanol en agua tipo I al 20%. A la proteína se le determinó la secuencia del N-terminal según el método de Edman (Edman, 1970), por el doctor Per-Invarg Ohlsson de la Universidad de Umeå (Suecia).

Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de la banda del Plg bufalino se realizó en un escáner (Image Quant TL, Healthcare, Buckinghamshire-Inglaterra) y se verificó el grado de pureza usando el software Image análisis software v 2003.

Resultados

Análisis electroforético

La pureza del Plg bufalino se determinó mayor al 95% (Figura 1, carril 2), esta banda migra aproximadamente a la misma altura que el Plg humano utilizado en el marcador de peso molecular carril 1 banda 2 de 92 kDa.

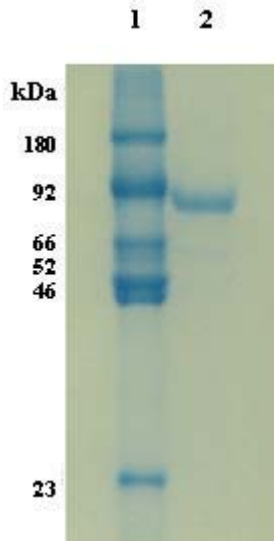


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, carril 1 marcador de peso molecular (ver materiales y métodos) carril 2 Plg Bufalino.

Análisis densitométrico

El análisis densitométrico de la banda del Plg bufalino (Figura 2), estableció un pico de 98%, con un 1.46% de impurezas, confirmando la alta pureza de esta proteína.

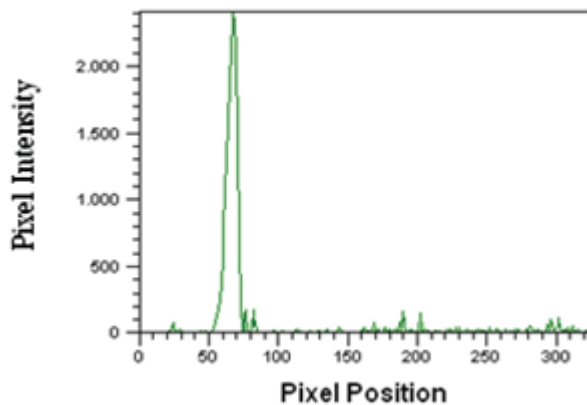


Figura 2. Análisis Densitométrico del Plg bufalino (Pico 1), teñido con azul de coomassie.

Activación de los Plasminógenos

Se demostró la clásica forma de activación del Plg humano a Pli, formando las típicas bandas, pesada (A) y liviana (B) a los 6 y 15 minutos de incubación, carriles 3 y 4 respectivamente, donde se señaló a los 6 minutos que aún queda Plg por activar e inclusive a los 15 minutos no se ha activado a un 100%, al comparar con el carril 2 del zimógeno (Figura 3A).

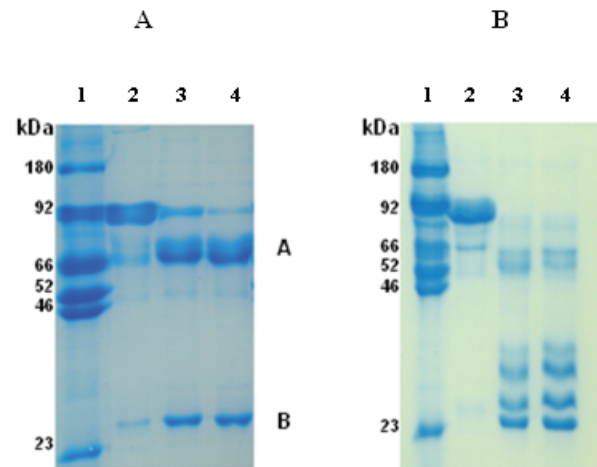


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE, activación del Plg humano (Gel A) 10% y bufalino (Gel B) 12.5%, a Pli. Carriles 1, marcador de peso molecular, carriles 2, zimógenos, carriles 3 y 4, activación de los Plgs, minutos 6 y 15 respectivamente. Se indica la migración de la cadena pesada (A) y liviana (B).

Al hacer el mismo análisis al Plg bufalino (Figura 3B) se observó que al minuto 6 carril 3, ya no hay Plg para activar, además la cadena pesada A, mostró una degradación severa que al compararla con el Plg humano tiende a desaparecer y formar una serie de bandas de degradación (Figura 3B, carriles 3 y 4) y (Figura 3A, carriles 3 y 4).

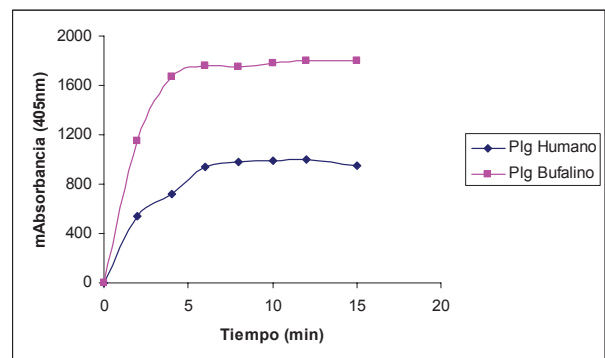


Figura 4. Monitoreo espectrofotométrico A_{405} de la activación de los Plgs bufalino y humano a Pli por la u-PA Vs tiempo de incubación.

La conversión de los Plgs bufalino y humano a Pli por activación con u-PA fue monitoreada por la hidrólisis del sustrato que se detectó espectrofotométricamente a 405 nm (Figura 4).

Cinética de la Plasmina

Los parámetros cinéticos para la Pli bufalina fueron determinados de acuerdo al método de Michaelis-Menten, en las coordenadas de Lineweaver-Burk (Figura 5), donde se observó el comportamiento de esta Pli. La velocidad de hidrólisis del sustrato por la Pli fue estudiada a una concentración de enzima constante y concentraciones ascendentes de sustrato. Los resultados de los parámetros cinéticos de los Plgs humano y bufalino se comparan y resumen en la tabla 1, columnas 2 y 3, respectivamente. Los parámetros de importancia cinética de las dos especies de Plis se determinan y se comparan en la tabla 2.

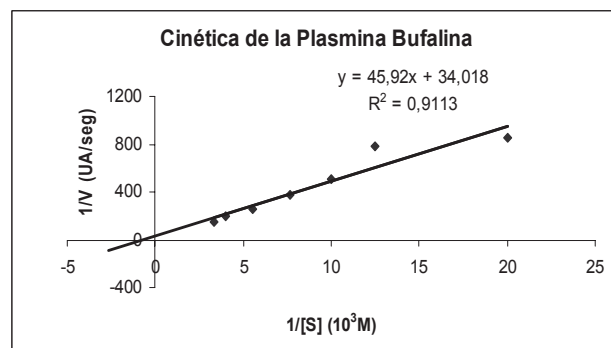
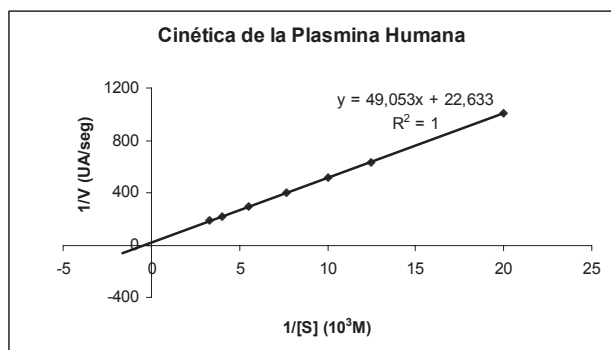


Figura 5. Dependencia de la velocidad de transformación del sustrato a producto por las Plis humana y Bufalina en las coordenadas de la ecuación de Lineweaver-Burk.

Tabla 1. Velocidades de las Plis humana y Bufalina en función de concentraciones ascendentes de sustrato.

1/V seg/UA		
1/[S] 10 ³ M	Pli Humana	Pli Bufalina
20	1003	754
12.5	636	780
10	513	511
7.7	400	378
5.5	293	260
4	219	198
3.33	185	148

Tabla 2. Parámetros determinados según la ecuación de Lineweaver-Burk para las dos especies de Plis.

Pli	V _{máx} UA/seg	K _M mM	K _{cat} UA seg ⁻¹ /μM
Humana	44X10 ⁻³	2.16	0.08
Bufalina	29X10 ⁻³	1.35	0.01

Secuenciamiento del N- terminal de los Plasminógenos humano y bufalino

El N-terminal de los Plgs, se determinaron, las letras en negrilla, son los aminoácidos (a.a.), que difieren al comparar las secuencias (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia del N-terminal del Plg Humano y Bufalino.

Plg	Secuencia N-terminal
Glu-Plg (humano)	EPLDDY
D-Plg (bufalino)	DPIDDY

Discusión

El Plg de búfalo, fue purificado, por el método de Cañas *et al.*, demostrando una vez más, que este método puede ser utilizado para el aislamiento de esta molécula en muchas especies (Cañas *et al.*, 2006; Cañas *et al.*, 2007), contribuyendo así a la unificación del método de purificación, que facilitara el estudio homogéneo de esta molécula en muchas especies. Los parámetros cinéticos del Plg bufalino, fueron determinados por primera vez, ampliando los conocimientos de esta molécula en diferentes especies mamíferas, lo que permitirá la comparación de la misma entre especies, así mismo

de los sistemas de coagulación y fibrinólisis en estos mamíferos. Conocimientos científicos que comparados con las dietas de las diferentes especies nos pueden dilucidar alguno de los motivos por los cuales el ser humano es aparentemente el más propenso a sufrir problemas cardiovasculares.

El Plg bufalino alcanza su máxima actividad antes del minuto tres, superando las demás especies estudiadas hasta ahora (Cañas *et al.*, 2006; Cañas *et al.* 2007). A partir de este minuto se observó una clara tendencia a estabilizarse evidenciándose en la electroforesis realizada a los minutos 6 y 15 que mostró una clara degradación sobre todo de la cadena pesada (A), al compararla con la humana y las otras especies antes estudiadas donde no se distinguió la degradación a estos tiempos de incubación (Cañas *et al.*, 2006; Cañas *et al.*, 2007).

La Pli bufalina manifestó notablemente una mayor afinidad por el sustrato con una K_m de 1.35 mM superando la del humano de 2.16 mM. Podría afirmarse que los riesgos de problemas cardiovasculares por formación de trombos en el bufalino serían muy inferiores a los del humano y otras especies estudiadas por Cañas (Cañas *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio, indicaron que el Plg bufalino hidrolizó eficientemente el sustrato humano, hecho que facilitaría la utilización de éste para determinar los parámetros relacionados con problemas cardiovasculares (t-PA, PAI-1, PAI-2, α_2 -AP entre otros) (Topol, 2000).

La importancia de este estudio radica en que la alta afinidad que presentaron las Plis animales por el sustrato sintético utilizado, se puede interpretar en la misma forma, accionando sobre sustratos

naturales que componen el trombo como la fibrina, lo que indicaría que estas Plis animales y sobre todo la bufalina, identificarían y degradarían la formación de los trombos de una manera más temprana y eficiente que la Pli humana, lo que traería como beneficio la rápida degradación del trombo. Esto facilitaría además las determinaciones en el diagnóstico clínico, en los laboratorios donde se determinan estos parámetros relacionados con problemas cardiovasculares, reduciendo el tiempo de determinación que puede ser vital para la toma de medidas por parte del médico. De otro lado, el secuenciamiento del N-terminal del Plg humano y bufalino difiere en dos a.a., datos que se asemejan a resultados obtenidos anteriormente (Brunisholz y Rickli, 1981; Schaller *et al.*, 1985; Wiman, 1973), en los cuales las especies estudiadas tenían una diferencia exactamente en estos mismos a.a. Estos datos, fundamentan aún más la importancia que posee la identificación plena de la composición de a.a. de los diferentes Plgs y sus diferentes degradaciones a nivel fisiológico para su posterior uso clínico y terapéutico.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Esperanza Paredes rectora de la Universidad de Pamplona por su apoyo económico, al Dr. Torgny Stigbrand de la Universidad de Umeå por el soporte económico para la determinación de la secuencia del N-terminal de los Plasminógenos Humano y Bufalino, realizado muy amablemente por el Dr. Per-Ingvar Olhson en esta misma universidad. Por último agradecen la donación del plasma humano al hospital universitario Erasmo Meoz de Cúcuta, Colombia.

Referencias

Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF. A new generation of information retrieval tools for biologist. *Biochem Sci* 1994; 19:258-260.

Bajaj AP, Castellino FJ. Activation of human Plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J Biol Chem* 1977; 252:492-498.

Brunisholz RA, Rickli EE. Primary Structure of Porcine Plasminogen Isolation and Characterization of CNBr-Fragments and Their Alignment within the Polypeptide Chain. *Eur J Biochem* 1981; 119:15-22.

Cañas O, Quijano A, Arbeláez LF. Activación y cinética comparativa de dos especies de plasminógenos: Humano y Bovino. *Rev Bistua* 2006; 4:3-12.

- Cañas O, Quijano A, Arbeláez LF. Activación y comparación cinética del Plasminógeno Equino con el plasminógeno humano. *Rev Bistua* 2007; 5:43-52.
- Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 1970; 962:1095-1096.
- Edman P. Sequence Determination Review. *Mol Biol Biochem Biophys* 1970; 8:211-255.
- Hernández L, Marrero MA. Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado en cuba. *Biocología aplicada* 2005; 22:182-190.
- Hylgaard JPE, Hagglof EM, Arbeláez LF, Stigbrand T, Shanbhag VP. Comparison of conformational changes of pregnancy zone protein and human α_2 -macroglobulin, a study using hydrophobic affinity partitioning. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1164:152-158.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Leytus SP, Bowvles LK, Konisky J, Mangel WF. Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:1485-1489.
- Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants *J Amer Chem Soc* 1934; 56:658-666.
- Marcum JA, Highsmith RF, Kline DL. Streptokinase-dependent delayed activation of horse plasminogen. *Biochim Biophys Acta* 1982; 79:19-27.
- Michaelis L, Menten ML. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem* 1913; Z 49:333-369.
- Paoni NF, Violand BN, Castellino FJ. Isolation and characterization of native and lower molecular weight forms of sheep Plasminogen. *The journal of biol chem* 1977; 252:7725-7732.
- Schaller J, Moser PW, Danegger Muller GA, Rosselet SJ, Kampfer U, Rickli. Complete amino acid sequence of bovine plasminogen, comparison with human plasminogen. *Eur J Biochem* 1985; 149:267-278.
- Spronk MHH, Van der Voort D and Ten CH. Review Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Tromb J* 2004; 2:1-10.
- Topol JE. Coronary disease, Acute myocardial infarction thrombolysis. *Heart* 2000; 83:122-126.
- Vinazzer H. Basic and practice in evaluating plasminogen. *Haem* 1988; 1:41-45.
- Walsh PN, Ahmad SS. Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* 2002; 38:95-111.
- Wallen P. In: *Biochemistry of Plasminogen. Fibrinolysis*. eds Kline, D. L. And Reddy; 1980. p.2-25.
- Wiman B. Human Plasminogen, Studies on its properties and mechanism of activation. University of Umeå. Medical disertation No 13 1973; 1-22.
- Wolh RC, Sinio I, Summaria L, Robbins KC. Comparative activation kinetics of mammalian plasminogens. *Biochim Biophys Acta* 1983; 745 :20-31.