

Degradación autolítica de la plasmina e isoformas de 5 plasminogenos animales. (Humano, Bovino, Equino, Canino, Ovino de Pelo).

Daniel Iván Barrera V.^{1, 3}, Amalia Muñoz Gomez.², Mauricio Corredor², Luis Fernando Arbeláez R.³

- 1 Escuela de Química, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia-Tunja, Colombia.
- 2 Unidad de Genética y Bioquímica de los Microorganismos CIB-Unipamplona, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Universidad de Pamplona, Colombia.
- 3 Grupo de Investigación en Biomoléculas, Universidad de Pamplona, gibbioquimica@unipamplona.edu.co.

ABSTRACT

Plasminogen is the pivotal protein of fibrinolytic system and its isoforms never have been analyzed by 2D-PAGE. In this work samples of plasminogen taken from five different animal species were purified by affinity chromatography on a sepharose-Lys matrix and characterized by SDS-PAGE electrophoresis. This analysis shown similarities in the proteolytic degradation of plasminogens between species, however different plasminogen isoforms were found on the 2D-PAGE analysis.

KEY WORDS

Plasminogen, affinity chromatography, SDS-PAGE, 2D-PAGE.

RESUMEN

La principal proteína del sistema fibrinolítico es el plasminógeno, cuyas isoformas nunca han sido analizadas en 2D-PAGE. En este trabajo se han purificado los plasminógenos de cinco especies animales por cromatografía de afinidad (sefariosa-Lisina) caracterizándose posteriormente por electroforesis. En el análisis SDS-PAGE, se ha encontrado una gran similitud en cuanto a la degradación proteolítica del plasminógeno de las cinco especies, no obstante se observa variación en cuanto a las isoformas presentes en los plasminógenos de cada especie por medio del análisis en electroforesis bidimensional.

PALABRAS CLAVES

Plasminógeno, cromatografía de afinidad, SDS-PAGE, 2D-PAGE.

INTRODUCCION

En los animales superiores (mamíferos) se ha desarrollado un sistema fibrinolítico, que tiene como principal función degradar los coágulos de fibrina por parte de la enzima proteolítica plasmina (1, 2); no obstante, se ha encontrado que este sistema también es de gran importancia en eventos tales como movimiento, reorganización celular y de matrices (ovulación, implantación de trofoblastos, embriogénesis, angiogénesis y metástasis) (3, 4).

La fibrina formada, después de jugar su papel biológico en el Sistema de Coagulación (SC), se convierte en el primer sustrato de la plasmina (Pli), produciendo los llamados Productos de Degradación de la Fibrina (PDF), los cuales han sido intensamente estudiados e identificados (5, 6, 7); los PDF son el fragmento-X, con una cadena α y β parcial y simétricamente hidrolizadas, reduciendo el peso molecular original del fibrinógeno a 240 kDa, el fragmento-Y, con un peso molecular de 145 kDa (7), el fragmento-E de 50 kDa; el fragmento-D1, es formado tanto de la degradación del fragmento-X como del fragmento-Y, con un peso molecular de 92 kDa. La continua degradación por la Pli sobre el fragmento-D1, producen

los fragmentos D2 y D3, con pesos moleculares de 86 y 82 kDa respectivamente (7).

La reacción más importante en el sistema fibrinolítico es la conversión del cimógeno plasmático plasminógeno (Plg), a la serina proteasa Pli, mediante la hidrólisis del enlace peptídico Arg⁵⁶⁰-

Val⁵⁶¹ (8), efectuada por los diferentes activadores del Plg (9-11).

El Plg es una glicoproteína de una sola cadena polipeptídica, compuesta por 791 residuos de aminoácidos (92 kDa) (12) y un 2 % de carbohidratos (13). La molécula es estabilizada por 24 puentes de disulfuro derivados de enlaces entre cisteínas y contiene cinco estructuras homólogas denominadas "kringles", cada una de las cuales es estabilizada por un arreglo específico de tres puentes de disulfuro (14). Se conoce que la primera kringle presenta afinidad por la fibrina así como por la α_2 -antiplasmina (15, 16); las kringles comprendidas entre los aminoácidos 357-434 presentan afinidad por agentes similares al ácido ϵ -aminocapróico (17, 18).

Se han encontrado y aislado dos formas de Plg dependiendo del grado de degradación proteolítica. El Plg humano nativo tiene el ácido glutámico como terminal-N y es conocido como Glu-Plg; la Pli, puede romper un enlace en la parte del terminal-N de la molécula liberando un péptido de 8 kDa; generando de esta manera el Lis⁷⁷-Plg; modificando las propiedades fisicoquímicas y enzimológicas, si bien, ambos Plgs son inactivos y enlazan la fibrina, el Lis-Plg presenta una mayor afinidad por esta (19, 20, 21).

La Pli, es una molécula de dos cadenas unidas por dos puentes de disulfuro; la cadena pequeña pesa 24 kDa y contiene el sitio activo enzimático, la otra cadena pesa 68 kDa; esta corresponde a la parte original del terminal-N del Plg, la cual contiene las cinco kringles y los carbohidratos (22).

Hay dos tipos de deficiencias hereditarias del Plg, la hipoplasminogenemia, que se caracteriza por una reducción paralela del Plg antígeno y su actividad cercana al 50%, y la displasminogenemia, producida por una anomalía molecular; no obstante, ambas se encuentran relacionadas con el desarrollo de trombosis venosa (23, 24).

Si bien, el Plg es una proteína que ha sido intensamente estudiada en varias especies, hace ya varias décadas, en la cual se han realizando investigaciones sobre sus isoformas tanto en animales como en humanos, ningún trabajo ha realizado estudios de isoformas en electroforesis bidimensional. En este estudio nos proponemos encontrar cual es el comportamiento de degradación del Plg en las cinco especies y determinar el perfil de isoformas en cada uno de ellos.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El ácido e-amino caprónico y el marcador de peso molecular de alto rango fueron de Sigma. El cloruro de sodio, fosfato ácido de sodio dihidratado, citrato de sodio y ácido cítrico, proveídos por Merck; los reactivos necesarios para los geles mono y bidimensionales, así como los anfólitos en rango de pH 5-8 marca BioRad y la matriz insoluble sefarosa-Lisina de la compañía Amersham Biosciences. Todos los reactivos y demás sustancias usadas fueron grado analítico.

Purificación de los plasminógenos

Las muestras de sangre de cada una de las especies en estudio se recogieron

en tampón citrato pH, 2.3 (25), sin ningún inhibidor de proteasas. El plasma se obtuvo por centrifugación refrigerada a 4°C. La purificación de los Plgs se realizó por cromatografía de afinidad de acuerdo a Deutsch y Mertz (26). El plasma se mezcló con sefarosa-Lisina durante dos horas, luego la matriz se empacó en una columna y se lavó con tampón PBS ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.3), hasta que la absorbancia fuera menor o igual a 0.001. El Plg se eluyó con 0.05 M de ácido e-aminocaprónico en PBS pH 7.3. La concentración del Plg se determinó por espectrofotometría utilizando un coeficiente de extinción de 16.8 (26).

Electroforesis Monodimensional SDS-PAGE.

De las fracciones que contenían el Plg, en cada una de las purificaciones se tomaron 10 μL ; antes de colocarlas en los pozos, se llevaron a Speed Vac (Eppendorf) por 5 min y resuspendieron en 5 μL de H_2O destilada desionizada estéril; para su desnaturalización, se les adicionó un tampón de carga que contenía β -mercaptoetanol y se calentaron a 92 °C por 5 min. Se aplicaron 5 μL de marcador de peso molecular de alto rango, diluido y se procedió a correr de acuerdo al método de Laemli (27). La tinción de los geles (12.5%) se realizó por coloración con nitrato de plata (28).

Electroforesis Bidimensional 2D SDS-PAGE

En este caso la Urea se aplicó como agente denaturante en la primera dimensión; después de preparar y degasificar el gel, se aplicó y dejó

polimerizar por 1h aprox, tiempo en el cual se prepararon las muestras de igual manera que para SDS-PAGE monodimensional con anfólitos de pH en un rango entre 5 y 8 (isoelectroenfoco). Se tomaron 30 μ L de cada una de las muestras para la primera dimensión, corriéndose así cinco geles cilíndricos, indicando que cada uno de ellos tenía la proteína en estudio purificada de las especies estudiadas. Después de correr la electroforesis de la primera dimensión, se procedió a realizar la segunda dimensión, colocando los geles cilíndricos sobre el gel de poliacrilamida y adicionando en el pozo restante el marcador de peso molecular de amplio rango. Finalmente, se corrió la electroforesis y se realizó la tinción con nitrato de plata con el fin de evidenciar la presencia de proteínas en el gel.

RESULTADOS

El comportamiento de elusión con ácido ϵ -aminocaproico, de los Plgs de las cinco especies, se encuentra resumido en la figura 1, observándose que la concentración de Plg humano es cuatro veces mayor que el canino; no obstante se muestran concentraciones similares en el resto de especies animales.

La figura 2 muestra la separación electroforética de los Plgs humano y equino. En ambas figuras, se puede observar un comportamiento de separación similar de los diferentes Plgs, exhibiendo bandas características correspondientes al Plg nativo \sim 92 kDa, en la banda A; en la banda B se observa el Plg preactivado, es decir que el Plg nativo ha perdido un péptido de aproximadamente 8 kDa; las bandas C (68 kDa) y E (24 kDa), corresponden a las cadenas pesada y liviana de la Pli;

los dos Plgs presentan una banda (D), correspondiente a un péptido con un peso molecular cercano a los 35 kDa. Los Plgs, bovino, caprino y canino presentaron un perfil electroforético similar (figuras no publicadas).

La separación de los Plg bovino y caprino en geles bidimensionales (punto isoelectrico contra peso molecular, pH x PM), se observa la presencia de aproximadamente entre 9 y 8 isoformas respectivamente entre 92 y 75 kDa; en las figuras 3 y 4, se presentan dichos geles en el orden anteriormente nombrado. Se observa además una diferencia en los pHs, donde las diferentes isoformas del Plg canino son más básicas que las isoformas del Plg bovino, las cuales se alejan un poco más del pH 8, lo cual está demostrando una diferencia en composición ya sea en la parte peptídica o glicosídica. Llama la atención como la variación en peso molecular no es diferente. Incluso los cinco Plgs estudiados (humano, equino, bovino, caprino y canino) presentan un peso molecular bastante similar. Por el contrario se observo que en los cinco Plgs, hay una variación el número de isoformas y en los puntos isoelectricos (PI).

DISCUSION

La purificación de los Plgs, de todas las especies se realizó con un solo método (26), si bien en la literatura existen diferentes métodos (29, 30, 31, 32, 33), nunca se habían sometido a purificación, tantas especies de Plgs bajo el mismo método; queda pues claramente demostrado que los Plgs de muchas especies mamíferas pueden ser aisladas por el mismo método. Ello demuestra además una afinidad muy

parecida por el mismo tratamiento lo cual muestra una enorme similitud molecular en la composición estructural y de radicales, tanto de monómeros peptídicos como glicosídicos, sin ser por ello idénticos.

La utilización de plasma sin inhibidor contra las serina proteasas, demostró además que los Plgs de todas las especies estudiadas son degradadas de forma idéntica, dando todos ellos un prototipo electroforético similar, en la electroforesis monodimensional se presentan diferencias en cuanto a la presencia de bandas no identificadas entre los Plgs de las diferentes especies, corroborándose en el estudio electroforético bidimensional, donde en todas las especies se encontraron un número elevado de isoformas, siendo el bovino, el que más isoformas presento. Estos resultados nunca antes habían sido reportados en el estudio de esta molécula, lo que en la practica pone en duda la determinación cinética que se ha hecho, sobre todo del Glu-Plg o Plasminógeno nativo humano (20, 21, 34, 35). Además las diferencias en la determinación del pH de las diferentes isoformas de los Plgs, muestra variaciones en los PI de las cinco especies aquí analizadas, lo cual estaría estrechamente relacionado con la funcionalidad de estos Plgs: Posibles diferencias en actividad del sistema fibrinolítico entre estos mamíferos,

composición aminoacídica o glicosídica (diferencias estructurales).

Queda pues abierta de nuevo la necesidad de determinar la cinética del Plasminógeno humano, así como la determinación por primera vez de las cinéticas de algunas especies que aun están por determinar, y por ende ser comparadas con la actividad cinética del humano. Además se debe determinar la cinética de las isoformas presentes en las diferentes especies, hecho éste que contribuirá con mucha información científica que fortalecerá o ampliara la visión biológica que hoy tenemos del plasminógeno, sobre todo en el humano.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado con la ayuda económica de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona, Pamplona Colombia y la Corporación para Investigaciones Biológicas de Medellín Colombia.

Agradecemos además la colaboración técnica en la toma de muestras de los animales a Jhon Jairo Bustamente M.V. y a Jorge H. Giraldo estudiante de Medicina Veterinaria. Así también la elaboración de los geles bidimensionales a Jenny Dimelza Gómez estudiante de Microbiología.

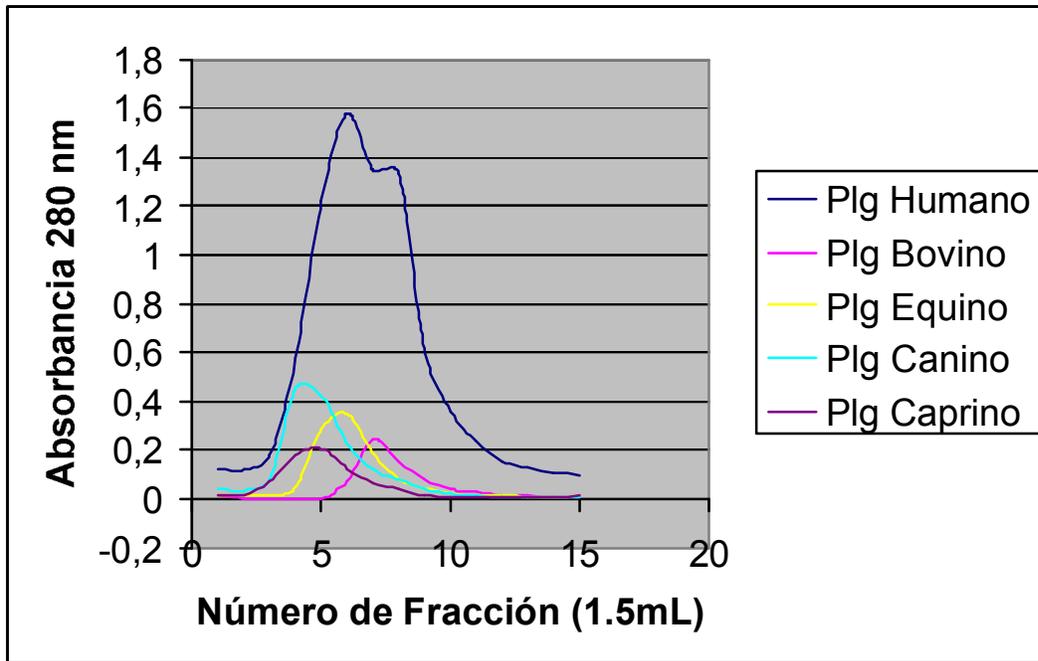


Figura 1. Superposición de los comportamientos de elución con ácido e-aminocaproico de los Plgs de 5 especies animales a partir de 50 mL de plasma normal fresco. La purificación se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad en sefarosa-lisina.

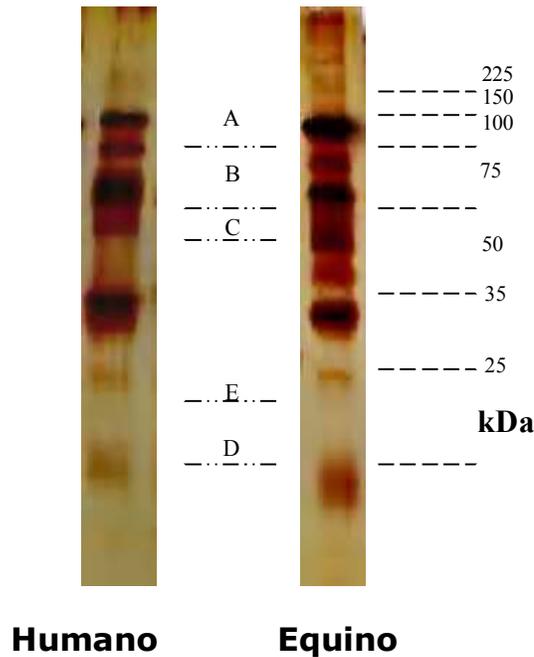


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE 12.5% de los Plgs humano y equino. Las bandas A, B, C y D, corresponden a el Plg nativo, Plg activado, cadena pesada y liviana de la Pli respectivamente; la banda E corresponde a degradaciones del Plg. No identificadas

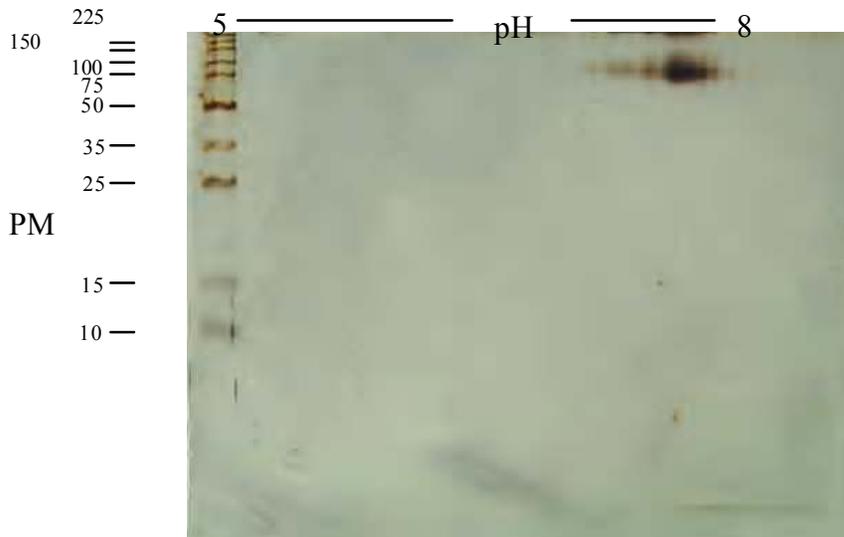


Figura 3. Electroforesis bidimensional del Plg bovino, donde se observa 9 isoformas con un peso aproximado de 92 kDa, en el extremo izquierdo se aprecia el marcador de peso molecular de alto rango.

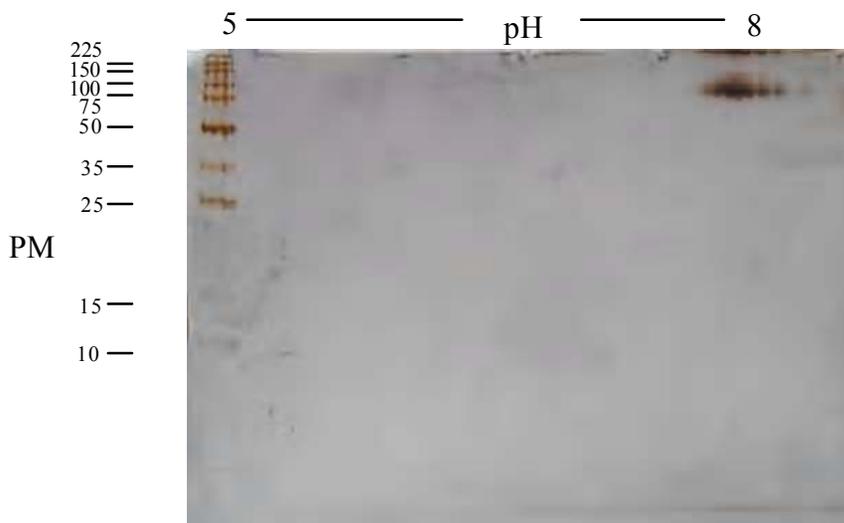


Figura 4. Electroforesis bidimensional del Plg canino, donde se observa 8 isoformas con un peso molecular de 92 kDa, en el extremo izquierdo se aprecia el marcador de peso molecular de alto rango

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. NILSSON TK, and WALLEN P. (1991) in: Clinical Aspect of Fibrinolysis (Almqvist & Wiksell International, eds. Stockholm)
2. DOBROVOLSKY AB, and TITAEVA EV. (2002) The fibrinolysis System: Regulation of Activity and Physiologic Functions of Its Main Components. Biochemistry (Moscow), 67, 99-108.
3. BOOTH NA, ROBBIE LA, CROLL AM, and BENETT AB. (1992) in: The Role of Plasminogen Activators in the Regulation of Connective Tissue Metalloproteinases (Brakman, P & Kluft, C., eds)

4. COLLEN D. (2001) Role of the Plasminogen System in Fibrin-Haemeostasis and Tissue Remodeling. *Haematology*, 1-9.
5. DOOLITTLE RF. (1981) Fibrinogen and Fibrin. *Sci. Am.* 92-101.
6. PIZZO S, SCHWARTZ LM, HILL RL, and McKEE P. (1973) The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin. *J. Biol. Chem.* 1574-83.
7. FERGUSON EW, FRETTO JL, and McKEE P. (1975) A re-examination of the cleavage of fibrinogen and fibrin by plasmin. *J. Biol. Chem.* 7210-8.
8. RÅNBY M. (1982) Studies on Kinetics of Plasminogen Activation by tissue Plasminogen Activator. *Biochim. Biophys. Acta* 704, 461-9.
9. NORRMAN B, WALLEN P, RÅNBY M. (1985) Fibrinolysis mediated by tissue Plasminogen Activator. Disclosure of a Kinetic Transition. *Eur. J. Biochem.* 149, 193-200.
10. PAONI NF, and CASTELLINO FJ. (1979) A Comparison of the Urokinase and Streptokinase Activation Properties of the Native and Lower Molecular Weight Forms of Sheep Plasminogen. *J. Biol. Chem.* 25, 2064-70.
11. DANO K, ANDREASEN PA, and GRONDHALHANSEN J. (1985) Plasminogen Activators, Tissue Degradation, and Cancer. *Adv. Cancer. Res.* 44, 139-266
12. PETERSEN TE, MARTZEN MR, ICHINOSE A, and DAVIE EW. (1990) Characterization of Gene for Human Plasminogen, Key Proenzyme in the Fibrinolytic System. *J. Biol. Chem.* 265, 6104-11.
13. SODETZ JM, BROCHWAY WJ, and CASTELLINO FJ. (1972) Multiplicity of Rabbit Plasminogen. Physical Characterization. *Biochem.* 11, 4441-58.
14. MAGNUSSON S, and SOTTRUP-JENSEN. L. (1976) in: Homologous Kringle Structures Common to Plasminogen and Prothrombin. Substrate Specificity of Enzymes Activating Prothrombin and Plasminogen (Brewk, K & Ribbons, DW., eds)
15. LUCAS MA, FRETTO L J, and McKEE PA (1983) The relationship of fibrinogen structure to plasminogen activation and activity plasmina during fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* 258, 4249-4256.
16. MARKUS G, DEPASCUALE JL, and WISSLER FC. (1978) Quantitative Determination of the binding of ϵ -aminocaproic acid to Native Plasminogen. *J. Biol. Chem.* 253, 727-732.
17. MOROI M, and AOKI N. (1976) Isolation and Characterization of Plasmin Inhibitor from Human Plasma. *J. Biol. Chem.* 251, 5956-5965.
18. MARTI D, SCHALLER J, OCHENBERGER B, and RICKLI E. (1994) Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for ϵ -aminocarboxylic acids. *Eur. J. Biochem.* 219, 455-62.
19. WALLEN P. (1980) in: *Biochemistry of Plasminogen* (Klein, DL & Reddy, KNN., eds)
20. WIMAN B. (1973) *Human Plasminogen: Studies on Its Properties and Mechanism of Activation.* Umeå University. Medical dissertation No 13.
21. RÅNBY M. (1982) Studies on Kinetics of Plasminogen Activation by tissue Plasminogen Activator.

- Biochim. Biophys. Acta 704, 461-9.
- 22.SOTRUPP-JENSEN L. (1978) Amino-Acid sequence of activation cleavage site in Plasminogen: Homology with "pro" part of Prothrombin. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2577-81.
- 23.ROBBINS KC. (1995) Dysplasminogenemias. Prog. Card. Dis. 4, 295-308.
- 24.AOKI N, MORI M, YOSHIDA N. (1978) Abnormal Plasminogen a Hereditary Molecular Abnormality Found in Patients with Recurrent Thrombosis. J. Clin. Invest. 61, 1186-95.
- 25.RÅNBY M., SUNDELL IB, and NILSSON TK. (1989) Blood Collection in Strong Acidic Citrate Anticoagulant Used in a Study of Dietary Influence on Basal t-PA Activity. Thromb. and Haemost. 62, 917-22.
- 26.DEUTSH DG, and MERTZ ET. (1970) Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. Science 1995-6.
- 27.LAEMMLI UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-5.
- 28.MORRISSEY C. (1981) Silver stain for protein in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhance uniform sensitivity. Anal. Biochem. 117, 307-10.
- 29.WIMAN B, and WALLÉN P. (1973) Activation of human Plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. Structural changes of Plasminogen in the course of activation to plasmin and demonstration of a possible intermediate compound. Europ. J. Biochem. 36, 25-31 .
- 30.RICKLI E, and CUENDET PA. (1971) Isolation of plasmin-free human plasminogen with N-terminal glutamic acid. Biochim. Biophys. Acta 250,447-51
- 31.LIU TH, and MERTZ ET. (1970) Studies on Plasminogen. IX. Purification of Human Plasminogen from Cohn Fraction III by Affinity Chromatography. Can. J. Biochem. 49, 1055-61.
- 32.SUMMARIA L, ARZADON L, BERNABE P, and ROBBINS KC. (1972) The primary structure of human plasminogen. I. The NH₂ -terminal sequences of human plasminogen and the S-carboxymethyl heavy (A) and light (B) chain derivatives of plasmin. J. Biol. Chem. 247, 4691- 702.
- 33.SUMMARIA L, ARZADON L, BERNABE P, and ROBBINS KC. (1973) Characterization of the NH₂ -terminal glutamic acid and NH₂ -terminal lysine forms of human plasminogen isolated by affinity chromatography and isoelectric focusing methods. J. Biol. Chem. 248, 2984-91.
- 34.VIOLAND BN, and CASTELLINO FJ. (1976) Mechanism of the Urokinase-catalized Activation of Human Plasminogen. J. Biol. Chem. 251, 3906-12.
- 35.SUMMARIA L, BOREISHA IG, ARZADON L, and ROBBINS K. (1977) Activation of Human Glu-Plasminogen to Glu-Plasmin by Urokinase in Presence of Plasmin Inhibitors. J. Biol. Chem. 252, 3945-51.