

## **Activación y cinética comparativa de dos especies de plasminógenos: Humano y Bovino**

Cañas Bermudez. O. <sup>1</sup>, Quijano Parra. A. <sup>2</sup>, Arbeláez Ramírez L. F. <sup>1</sup>

1. Facultad de Salud, Grupo de investigación en Biomoléculas, Universidad de Pamplona,

Email: [luifer@unipamplona.edu.co](mailto:luifer@unipamplona.edu.co)

2. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Química. Universidad de Pamplona

Recibido 04 Agosto de 2006

Aceptado 12 Octubre 2006

### **ABSTRACT**

The Plasminogen (Plg), is the zymogen of the Plasmin (Pli), the active protein of the fibrinolytic system; its activation was done using human and bovine Plg and activated through urokinase. The heavy and light chains of the Pli, were identified by SDS-PAGE for both Plis. The kinetics of these Plis were compared utilizing the chromogenic substrate for Pli Spectrozyme using the parameters determined as in the following: temperature, pH, and the enzyme concentration constant. The data presented here reveals the maximum activation ( $A_{405}$ ) at 6 minutes and the outstanding kinetic parameters for their differentiation. This determined the maximum velocity ( $V_{max}$ ) of the human Pli with  $303 \times 10^{-9}M/seg$  and for the bovine Pli with  $200 \times 10^{-9}M/seg$ . The bovine Pli showed a superiority in the affinity with  $K_M : 2.10 \text{ mM}$  compared to the human Pli having  $K_M : 2.22 \text{ mM}$ , and indicates that the blood clot formed in the circulation can be dissolved in a more efficient way in the fibrinolytic system of the bovine because of the superior affinity by the substrate shown.

### **KEY WORDS**

Plasminogen, Urokinase, Fibrinolytic system, Kinetics.

### **RESUMEN**

El Plasminógeno (Plg) es el zimogeno de la Plasmina (Pli), proteína activada del sistema fibrinolítico, su activación fué realizada al humano y el bovino por la urokinasa, identificando las cadenas pesada y liviana de la Pli por electrofóresis SDS-PAGE. Se comparo la cinética de las dos Plis, utilizando el sustrato sintético Spectrozyme, bajo parámetros determinados como: Temperatura, pH con la concentración de la enzima constante.

Los datos presentados en este estudio revelan que la máxima activación de la enzima ( $A_{405}$ ) se presentó a los 6 minutos de la activación y los parámetros cinéticos relevantes de las dos Pli fueron la  $V_{máx}$   $303 \times 10^{-9}M/seg$  para la Pli humana y  $200 \times 10^{-9}M/seg$  para la bovina.

La Pli bovina mostró una mayor afinidad por el sustrato  $K_M : 2.10 \text{ mM}$  que la Pli humana  $K_M : 2.22 \text{ mM}$ , lo que indica que el coágulo formado puede ser disuelto de forma más eficiente en el sistema fibrinolítico de las dos especies por el bovino dada la afinidad superior por el sustrato que esta muestra.

### PALABRAS CLAVES

Plasminogen, Urokinasa, Sistema fibrinolítico, Cinética.

### INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un mecanismo fisiológico que mantiene la sangre en un estado fluido dentro de la circulación (MANN et al; 1999), la coagulación sanguínea es mediada por componentes celulares y proteínas solubles del plasma, en respuesta a un daño vascular. La adhesión de plaquetas circulantes y agregados proveen una superficie celular para el ensamblaje de complejos enzimáticos del coágulo sanguíneo. La vía extrínseca de la coagulación sanguínea es iniciada cuando la sangre es expuesta al factor tisular en el espacio subendotelial o presentado en otras células sanguíneas (NEMERSON et al; 1988), el factor tisular une a el factor activado VII (FVIIa) y el resultado del complejo enzimático activa los factores IX y X de la vía común y extrínseca de la coagulación respectivamente. El factor IX activado (FIXa) por la vía del factor tisular, activa adicionalmente al factor X, en una reacción que es acelerada por el factor VIII (MANN et al; 1999), una vez activado, el factor X convierte la protombina a trombina (Factor IIa) en una reacción que es acelerada por el factor V activado (FVa).

En el paso final de la vía común de la coagulación (extrínseca e intrínseca), la trombina hidroliza los fibrinopéptidos AA y BB de las cadenas  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  del fibrinógeno para generar monómeros de fibrina, los cuales polimerizan formando la malla de fibrina que estabiliza el coágulo, los cuales a su vez son estabilizados por el factor XIIIa (LORAND; 2000). El sistema del Plasminógeno/plasmina (fibrinolítico) está compuesto por la proenzima Pli, la cual es activada a Pli, que degrada la

fibrina en productos de degradación de la fibrina (FDP). Dos activadores distintos del Pli han sido identificados: el activador tisular del Plasminógeno (t-PA) y el activador del Plasminógeno tipo-urokinasa (u-PA). El t-PA interviene en la activación del Pli a Pli, en presencia de la fibrina, formando un complejo trimolecular (fibrina-Pli-t-PA) contribuyendo en la disolución del coágulo que se forma en el endotelio, el u-PA unido a un receptor celular específico (u-PAR) aumenta la activación del Pli celular, pero el principal rol de u-PA parece estar en la inducción de la degradación de componentes de la matriz vía activación de proteinasas latentes como las matriz metaloproteinasas o factores de crecimiento. La inhibición del sistema fibrinolítico puede ocurrir al nivel de los dos activadores t-PA y u-PA por inhibidores del activador del Plasminógeno tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2), o bien a nivel de la Pli por la  $\alpha_2$ -antiplasmina ( $\alpha_2$  AP), que es su inhibidor natural (LIJNEN and COLLEN; 1995). Como la mayoría de las proteínas plasmáticas, el Pli es sintetizado en el hígado, y su concentración plasmática en el ser humano es de  $2 \mu M$  (WALLÉN; 1980), su peso molecular incluyendo los carbohidratos (CASTELLINO et al; 1973), ha sido determinado en 92.000 y 82.000 Da para Glu y Lis-Pli respectivamente (WALLÉN; 1980).

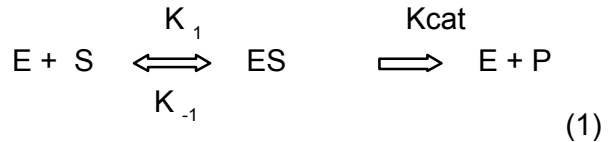
El Pli está constituido por una sola cadena glicoproteica con aminoácido glutámico en su terminal-N para el Pli humano (WALLÉN and WIMAN; 1970), motivo por el cual se denomina Glu-Pli. Por hidrólisis de una sola unión peptídica ( $Arg_{560}-Val_{561}$ ), el Pli es activado a Pli

(ROBBINS et al, 1967), dicho rompimiento es equivalente a la activación de otras serino proteasas. Las dos cadenas A y B que se forman en la hidrolización son sostenidas por puentes de disulfuro (SOTTRUP-JENSEN et al; 1978). El Plg a nivel fisiológico es degradado por la Pli formada en la secuencia Lis<sub>76</sub>-Lis<sub>77</sub>, liberando un péptido de 8 KD que lo convierte de Glu-Plg a Lis<sub>77</sub>-Plg (WIMAN and WALLEN; 1975). La longitud total cDNA del Plg humano ha sido clonada (FORSGREN et al; 1987) y la secuencia del DNA revela que contiene 791 residuos de aminoácidos, así mismo se le han determinado "sitios de unión a la lisina" o análogos de la lisina los cuales llevan un grupo amino y un grupo carbonilo, como la arginina y el epsilon ácido amino caproico ( $\epsilon$ -ACA). Un sitio fuerte y cinco débiles de unión a la lisina fueron determinados (MARKUS et al; 1978), asumiendo que uno de los sitios de baja afinidad representa el sitio activo, los otros cinco corresponden bien con los cinco dominios Kringles en la cadena-A del Plg (SOTTRUP-JENSEN et al 1978). Las uniones del Plg a la fibrina,  $\alpha_2$ -AP, glicoproteínas ricas en histidina (HRGP) y trombospondina son mediadas por estos kringles (HOYLAERTS et al; 1981, LIJNEN et al; 1980, SILVERSTEIN et al; 1984, WIMAN and COLLEN; 1979, WIMAN And WALLEN; 1977), adicionalmente la existencia de otro sitio de unión débil, el sitio-AH, el cuál une cadenas de lisina, ha sido postulado (CHRISTENSEN; 1984).

La activación del Plg a Pli es de vital importancia biológica para la disolución del coagulo y su estudio cinético de gran utilidad en la catálisis enzimática, por esta razón la medición de la velocidad de la reacción ocupa una parte sustancial en la metodología de investigación de las enzimas (DIXON and WEBB 1999).

El proceso enzimático comprende muchas etapas y está constituido por una serie de etapas sucesivas de las cuales en primer lugar se puede señalar el proceso de unión del sustrato con el centro activo de la Pli, con la formación de un complejo no covalente

Sustrato-Enzima y la posterior transformación química de este complejo, con la formación de los productos de reacción y regeneración de la enzima libre. De esta manera, el esquema sencillo del proceso enzimático es un esquema en dos etapas:



La noción de que la enzima forma inicialmente un complejo con el sustrato es central para todas las concepciones modernas sobre el mecanismo de acción de las enzimas. Una teoría sencilla basada en esta concepción fue propuesta por primera vez por Michaelis y Menten (MICHAELIS and MENTEN 1913).

Con ayuda de la ley de acción de masas se puede escribir la expresión general para la velocidad de la reacción. Si el mecanismo de la reacción es conocido, es fácil encontrar la expresión para la velocidad de procesos aislados de formación de productos de la reacción y calcular la velocidad general de la reacción. Para el esquema sencillo del proceso enzimático con participación de un compuesto intermedio (esquema de Michaelis Menten), la cinética de la reacción describe el sistema de ecuaciones, que incluye dos ecuaciones diferenciales y dos ecuaciones de balance material (BEREZIN and MARTINEK 1997). La ecuación de Michaelis-Menten (MICHAELIS and MENTEN 1913) es muy conocida en enzimología. En el marco de esta ecuación se explican muy bien los fenómenos que experimentalmente se observan para las reacciones enzimáticas, por ejemplo el fenómeno de saturación

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

En donde:

V es la velocidad de la reacción enzimática

$V_{m\acute{a}x}$  es la máxima velocidad de la reacción enzimática

[S] concentración del Sustrato  
 $K_M$  Constante de Michaelis-Menten  
 La  $V_{m\acute{a}x.}$  se puede expresar como:

$$V_{m\acute{a}x.} = k_{cat} [E] \quad (3)$$

[E] concentración de la enzima  
 $K_{cat}$  número de recambio de una enzima (Boyer R, 2004)

El gran significado de la ecuación de Michaelis-Menten consiste en que muchas de las reacciones enzimáticas complejas, generalmente se describen por ecuaciones tipo (2), que se diferencian solo por el sentido físico de las constantes que forman parte de esta ecuación.

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar en las coordenadas de Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} [S]} \quad (4)$$

En este estudio se determinó la activación y cinética de la Pli de dos especies mamíferas (humana y bovina) para determinar la más apropiada para uso clínico en la determinación de parámetros plasmáticos en pacientes con problemas de coagulación o fibrinólisis.

## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS

Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF),  $\epsilon$ -ACA, ácido clorhídrico (Fabroquim), cloruro de sodio (NaCl), Acetato de sodio anhidro (Riedel-de-Haën), N,N'-Metilen-bisacrilamida, persulfato de amonio,  $\beta$ -mercaptoetanol, sodio dodecyl sulfato (SDS), Urea (Biorad), di-hidrógeno fosfato de sodio dihidratado (Merck), Lisina-sefarosa-4B (Amersham Biosciences), ácido acético concentrado (Baker), sustrato cromogénico para plasmina Spectrozyme

(Amdiaq), el volumen utilizado fue constante (60  $\mu$ l) para todos los experimentos, Urokinasa (UK) (110.000 UI/ml), estándar de peso molecular: 92KDa (Glu-PIg), 66 KDa (cadena-alfa, fibrinógeno humano), 52 KDa (cadena-beta, fibrinógeno humano), 46 KDa (cadena-gama, fibrinógeno humano), 6.5 KDa (Aprotinina) y agua tipo 1 y 3 (Laboratorio de investigación en Biomoléculas-Universidad de Pamplona).

## TOMA Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El plasma Humano fue suministrado 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 bovino se tomó en la Granja Experimental Villa Marina, propiedad de la Universidad de Pamplona, por un médico veterinario, utilizando bolsas para extracción sanguínea con solución anticoagulante de citrato, fosfato, dextrosa y adenina (CPDA-1) (BAXTER), a la sangre obtenida de esta manera, se le añadió PMSF disuelto en DMSO, a una concentración final de 1mM, con el fin de inhibir la actividad de las serino proteasas. Las muestras se mantuvieron refrigeradas y fueron centrifugadas.

Los plasmas fueron separados después de la centrifugación a 7.000 r.p.m. durante 15 min. a 4°C.

## PURIFICACION DE LOS PLASMINOGENOS

Los PIGs de las dos especies mamíferas fueron purificados por cromatografía de afinidad en Lisina-sefarosa según el método de Deutsch y Mertz (DEUTSCH and MERTZ; 1970), en una columna de 8x2.5 cm (Biorad), equilibrada con tres volúmenes del buffer 0.1 M fosfato 0.15 M de NaCl pH 7.3 (PBS), a una rata de flujo de 2 ml/min. Se aplicaron 200 ml de plasma para cada una de las dos especies, posteriormente la columna se lavo con 75 ml de PBS, hasta

que la absorbancia  $A_{280}$  fue  $\leq 0.01$ , se eluyó con 100 ml de PBS que contenían 0.05M ( $\epsilon$ -ACA) y colectado en fracciones de 3 ml en cada tubo, la concentración fue determinada utilizando  $(\epsilon^{1\%})_{1\text{cm}} = 1.6$  (APPEL et al; 1994), los Plgs fueron concentrados en una celda Amicon utilizando membranas de celulosa regenerada de 10 kDa, a aproximadamente 1 mg/ml.

### ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10% (LAEMMLI; 1970). Las muestras de Plg de 5  $\mu\text{g}$  fueron mezcladas con el buffer de muestra en un volumen 1:1 (vol/vol), fueron tratadas térmicamente por 5 minutos a 92°C y fueron visualizadas por tinción de Azul brillante de Comassie. El marcador de peso molecular que se utilizó se describe en materiales y métodos.

### ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINÓGENOS

Para la activación de los dos Plgs, humano y bovino, se utilizó una concentración de 1 mg/ml para cada uno a una temperatura constante de 37°C, a los cuáles se les adicionó 6.72  $\mu\text{l}$  de UK para una concentración final de 739.2 UI/ml. Se monitoreó espectrofotométricamente  $A_{405}$  así: se tomaron 8 tubos equivalentes a los diferentes tiempos de incubación (0, 1, 3, 6, 9, 15, 25 y 35 minutos) con su correspondiente sustrato reconstituido en agua tipo 1, a continuación se les adicionó 3  $\mu\text{l}$  de solución activada, esta preparación se dejó reaccionar por 12 segundos y se detuvo adicionando 10  $\mu\text{l}$  de buffer acetato (BA) 4 M pH 3.8.

Al minuto 35, la activación de los Plgs se detuvo adicionando las soluciones de los Plg activados en glicerol al 100%, de tal manera que la concentración de glicerol final fue de 25%. La muestra activada, se homogenizó, se marcó con el número de lote correspondiente y se almacenó a -80°C.

Se determinó la absorbancia  $A_{405}$  de las 8 incubaciones, y se gráfico la  $A_{405}$  Vs tiempo de incubación.

### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE Pli

De acuerdo al proveedor del sustrato cromogénico, la hidrólisis del sustrato que de 10 mA a  $A_{405}$  corresponde a 1nM de Pli a una temperatura de 37°C.

A los tubos que contenían el sustrato, se les agregó 3  $\mu\text{l}$  de cada solución activada y se incubaron por 0, 1 y 2 minutos respectivamente, la reacción se detuvo adicionando 10  $\mu\text{l}$  de BA 4 M pH 3.8. La  $A_{405}$  determinada para cada tubo y cada una de las dos activaciones, fue determinada en mA<sub>405</sub>/min. La concentración de Pli promedio obtenida para las dos especies fue de 3.85  $\mu\text{M}$ .

### CINÉTICA DE LA PLI

Se estudia la cinética de las dos especies de Plis con una concentración promedio de 3.85  $\mu\text{M}$ , a una temperatura de 37°C, 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, seguidamente se le adicionó 3  $\mu\text{l}$  de cada Pli y se detuvo la reacción con 10  $\mu\text{l}$  de BA.

Se determinó la absorbancia y se gráfico según la ecuación de Lineweaver-Burk.

### RESULTADOS

#### ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO

Las dos preparaciones de los Plgs de los mamíferos muestran una alta pureza, al no presentar bandas adicionales en su electroforesis, figura 1, carriles (2-3).

La banda del Plg bovino tiene el mismo peso molecular que el Plg-humano o Glu-Plg comercial utilizado como control en el marcador de peso molecular figura 1, carril 1 primera banda

#### ACTIVACIÓN DE LOS PLASMINOGENOS

La conversión del Plg a Pli por activación con UK fue monitoreado por la hidrólisis del sustrato que se detectó



espectrofotométricamente a  $A_{405}$  como se demuestra en la figura 2 para las dos especies estudiadas. Después del minuto 6 ambas especies muestran una tendencia a estabilizarse hasta el minuto 35.

La activación del Plg a Pli se determinó por electroforesis SDS, la figura 3 muestra en el gel (A) Plg humano y (B) Plg bovino, los carriles 2 y 3 corresponden a las activaciones de 15 y 35 para cada especie, la banda a la altura del Plg desaparece en los carriles 2 y 3 y aparecen bandas de menores pesos moleculares correspondientes a la cadena A y B de la Pli y se observan otros péptidos de menores pesos moleculares.

### CINETICA DE LA PII

Los parámetros cinéticos de la Pli, fueron determinados de acuerdo a la transformación de la ecuación de Michaelis-Menten, a las coordenadas de Lineweaver-Burk, como se demuestra en la figura 4 para la Pli humana. La velocidad de hidrolización del sustrato por las diferentes Plis fueron estudiadas a una concentración de enzima constante y concentraciones ascendentes de sustrato, los resultados de las velocidades se resumen en la tabla 1, para las Plis: humana y bovina.

El análisis de la cinética de las dos especies de Plis en las coordenadas de la ecuación (4) nos permite encontrar los parámetros cinéticos de las dos especies de Plis, como se muestra en la tabla 2.

### DISCUSION

El método de purificación de los Plgs de las dos especies por cromatografía de afinidad, demostró ser muy eficiente para las dos especies, sin muestra de contaminantes que puedan interferir en el estudio cinético de la Pli.

Los datos presentados en la activación sugieren que la UK genera un claro rompimiento de la molécula de Plg (92.000 Da), generando dos bandas características que hacen referencia a la cadena (A) pesada con aproximadamente 64kDa y liviana (B) con

23kDa respectivamente, analizadas después de su activación a los 15 y 35 minutos en la electroforesis SDS-PAGE, demuestran que al mismo tiempo que la cadena del Plg (92.000) desaparecía de la posición en la electroforesis SDS, se puede visualizar que aparecen las bandas correspondientes a las cadenas (A) y (B) y además péptidos de bajo peso molecular que son autodegradaciones dado el largo tiempo de incubación (15 y 35 minutos), ya que después del minuto 6, la activación alcanza su máximo punto de activación, donde hidroliza la mayor cantidad de sustrato.

La cinética de las dos especies, muestra diferencias en la  $V_{m\acute{a}x}$ , así como en parámetros similares determinados como la  $K_M$ , siendo la afinidad del Plg bovino superior a la del humano. queda determinar si la afinidad del Plg bovino es también superior para la fibrina que los otros Plgs, lo que indicaría que el Plg bovino en la formación del complejo trimoléculas (Fibrina-t-PA-Plg) sería activado a Pli de una forma más rápida, lo que facilitaría la disolución o degradación del coagulo de una forma más eficiente, si bien el Plg bovino no se puede aplicar a pacientes con problemas cardiovasculares, esta molécula se puede utilizar en la determinación de los parámetros fibrinolíticos involucrados en los riesgos de problemas cardiovasculares, redundando en beneficio del paciente ya que acorta el tiempo de espera para diagnosticarlo y tratarlo, así como en el médico ya que podría tomar medidas inmediatas y salvar la vida del paciente.

### CONCLUSIONES

\*La electroforesis SDS-PAGE muestra claramente la activación del Plg.

\*La Pli bovina muestra una mayor afinidad por el sustrato cromogénico.

\*Se observa que la mayor  $V_{m\acute{a}x}$  corresponde a la Pli del humano.

\*La UK demostró ser una enzima que activa los Plgs de las dos especies.

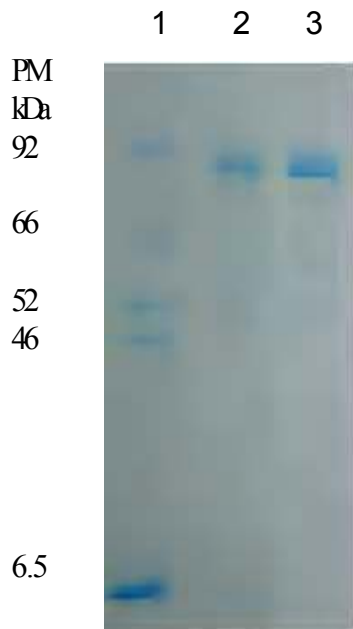


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, carril 1 marcador de peso molecular (ver materiales y métodos) carril 2 Plg humano, carril 3 Plg bovino,

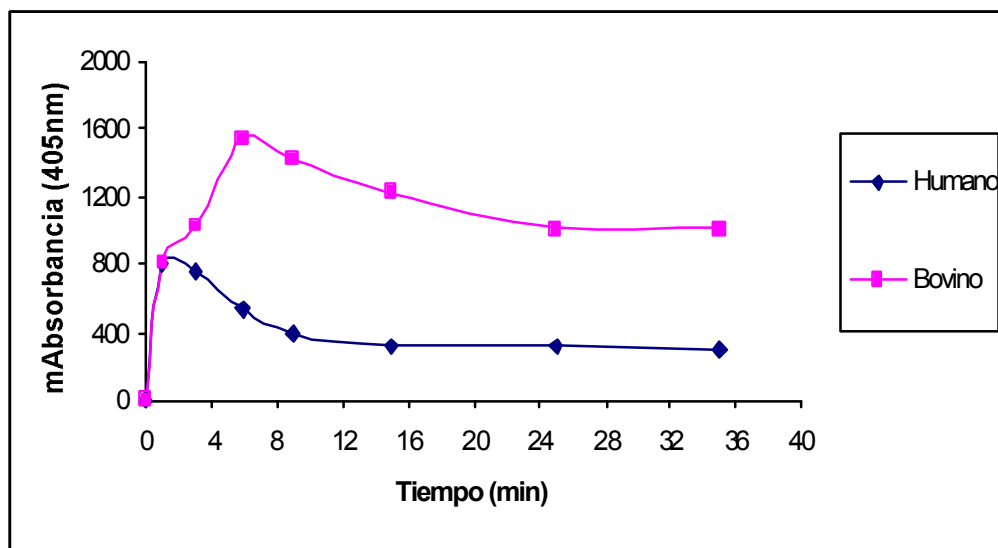


Figura 2. Desarrollo de la activación del Plg a Pli de dos especies Humana y Bovina.

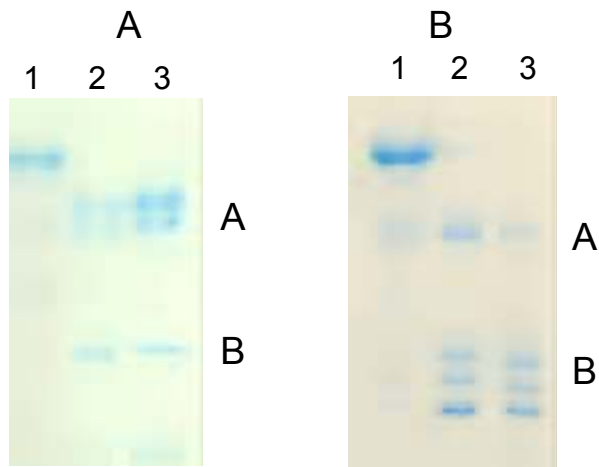


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE de la activación, monitoreado a los 0, 15 y 35 minutos. Gel A, Plg humano, gel B, Plg bovino respectivamente, se observa la migración de la cadena pesada (A) y liviana B.

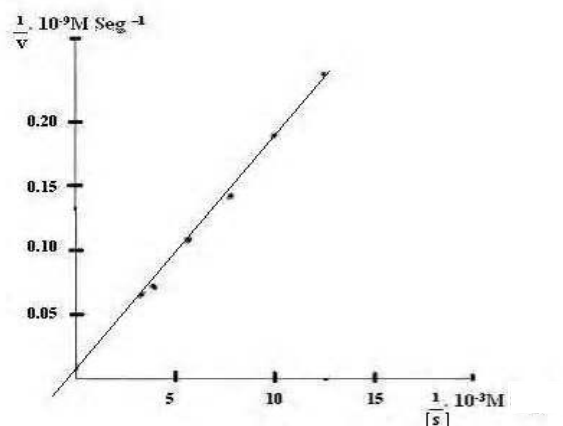


Figura 4. Dependencia de la velocidad de transformación de la Pli Humana en las coordenadas de la ecuación de Lineweaver-Burk.

Tabla 1. Velocidad de las Plis humana y bovina en función de las concentraciones de sustrato.

[S] 10 <sup>-6</sup> M	V 10 <sup>-9</sup> M/seg	
	Pli Humana	Pli Bovina
0.05	4.43	4.62
0.08	7.77	6.36
0.10	10.19	6.64
0.13	14.12	12.40
0.18	18.34	13.05
0.25	28.22	18.90

Tabla 2. Parámetros determinados de la ecuación 4 (humano) para las dos especies de Plg.

Plasmina	V <sub>máx</sub> 10 <sup>9</sup> Mseg <sup>-1</sup>	K <sub>M</sub> 10 <sup>2</sup> mM	K <sub>cat</sub> seg <sup>-1</sup>
Humana	303	2.22	0.11
Bovina	200	2.10	0.04



**REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS**

Appel RD, Bairoch A, ochstraser DFA (1994) A new generation of information retrieval tools for biologist. *Biochem Sci* 19: 258-260

Berezin IV, Martinek K (1977) *Bases Físicoquímicas de la Catálisis Enzimática*. Edit Buish Shkola Moscú

Boyer R (2004) *Conceptos de Bioquímica*, Edit Thomson pag 151

Castellino FJ, Siefring GE, Sodetz JM, Bretthauer RK (1973) Amino terminal amino acid sequences and carbohydrate of the two major forms of rabbit plasminogen. *Biochem Biophys Res Com* 53: 845-851

Christensen U (1984) The Ah-site of plasminogen and two C-terminal fragments. A weak lysine-binding site preferring ligands not carrying a free carboxylate function. *Biochem J* 223: 413-421

Deutsch DG, Mertz ET (1970) Plasminogen purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 962: 1095-6

Dixon M, Webb E C (1999) *Enzimas*. Tom 1 Edit Mir Moscú

Forsgren M, Råden B, Israelson M, Larsson K, Heden LO (1987) Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. *F E B S* 213: 254-260

Hoylaerts M, Lijnen HR, Collen D (1981) Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochim Biophys Acta* 673: 75-85

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5

Lijnen HR, Collen D (1995) Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Bailliere's clinical Haematology* 8: 277-90

Lijnen HR, Hoylaerts M, Collen D (1980) Isolation and characterization of a human plasma protein with affinity for the lysine binding sites in plasminogen. *J Biol Chem* 255: 10214-10222

Lineweaver H.,Burk D (1934) *J Am Chem Soc* 56:658

Lorand L (2000) Research on clot stabilization provides clues for improving thrombolytic therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2-9

Mann K, Edelberg JM, Rosenberg RD, Chien KR, Breslow JL, Leiden JM, Leiden JM, Seidman C, Braunwald (1999) Blood coagulation in cardiovascular disease. In: *Molecular Basis of heart Disease. A comparison to Braunwald's Heart Disease*. eds Philadelphia: WB Saunders 505-36

Markus G, DePasquale JL, Wissler FC (1978) Quantitative determination of the binding of  $\epsilon$ -aminocaproic acid to native plasminogen. *J Biol Chem* 253: 727-732

Michaelis L, Menten M L (1913) Biochem 49: 333

Nemerson Y, Giensen PL (1988) Some thoughts about localization and expression of tissue factor. Blood Coagul Fibrinolysis 1: S45-7

Robbins KC, Summaria L, Hsieh B, Shah RJ (1967) The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. J Biol Chem 242: 2333

Silverstein RL, leung LLK, harpel PC, nachman RL (1984) complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen: modulation of activation by tissue activator. j clin invest 74 : 1625-1633

Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, Petersen TE, Magnusson S (1978) The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"-plasminogen (Mw,38.000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. Progress in chemical Fibrinol thrombol 191-209

Wallèn P (1980) Biochemistry of plasminogen. Fibrinolysis 2-25

Wallèn P , Wiman B (1970) Characterization of human plasminogen I On the relationship between different molecular forms of plasminogen demonstrated in plasma and found in purified preparations. Biochim Biophys Acta 221: 20-30

Wiman B, Collen D (1979) On the mechanism of the reaction between human  $\alpha$ 2-antiplasmin and plasmin. J Biol Chem 254: 9291-9297

Wiman B, Lijnen HR, Collen D (1979) On the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in  $\alpha$ 2-antiplasmin and in fibrinogen. Biochim Biophys Acta 579: 142-154

Wiman B, Wallèn P (1975) On the primary structure of human plasminogen and plasmin. Eur J Biochem 57: 387-394

Wiman B, wallèn P (1977) The specific interaction between plasminogen and fibrin, A physiological role of the lysine binding site in plasminogen. Thromb Res 10: 213-222