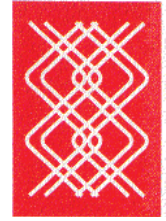




REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
Laboratorio de biología y Medicina Experimental
(LABIOMEX)



Trabajo Especial de Grado (TEG) para
optar al título de Licenciado en Biología

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA QUIMERA
PLASMINOGENO (N-TERMINAL DEL KRINGLE 1) :: ESTREPTOKINASA,
EXPRESADA EN LA LEVADURA *PICHIA PASTORIS***

Realizada por:
Br. Balbino Antonio Perdomo Díaz
Tutor: Prof. Marcos Bastidas V.

Mérida – 2006

INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL (LA) BACHILLER

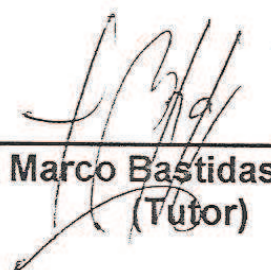
En Mérida a los 7 días del mes de Diciembre del 2006, a las 10:00 a.m. se reunieron los Profesores: Marco Bastidas, Jhon Cruz y Juan Puig de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado que sobre el tema: "Purificación y caracterización de la quimera Plasminogeno (N-Terminal del kringle 1) :: Estreptoquinasa, expresada en la levadura *Pichia pastoris*", presentado por el Bachiller Balbino A. Perdomo D. Titular de la Cédula de Identidad N° V- 11.586.113, para optar al título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

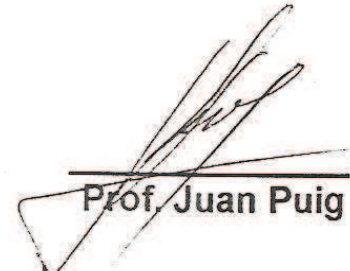
en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó el Bachiller Balbino A. Perdomo D.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró Aprobado con la Calificación de Veinte (20) PUNTOS y recomendado para su publicación.


Prof. Marco Bastidas
(Tutor)


Prof. Jhon Cruz


Prof. Juan Puig

*Al Dios Todopoderoso, Jehová,
Mi Dios y Amigo.*

AGRADECIMIENTOS

- Al Dios todopoderoso, Jehová, quien dio la existencia a todo lo que existe, incluyéndome y desde luego a la SK y al Kringle 1 del Plg. (Salmo 139: 14).
- A la Universidad de los Andes por la instrucción que me impartió en sus aulas.
- A LABIOMEX, por aceptarme y mostrarme la realidad de la ciencias.
- Al Ministerio de Sanidad y Desarrollo Social (MSDS), por el financiamiento al proyecto Estreptoquinasa.
- A mi amada esposa, Paula, por su amor y fidelidad incondicional, la amo.
- A mi madre, Carmen, que con su tenacidad y amor no solamente moldeó el barro (Ella es Alfarera) sino también a mí.
- A mi difunto padre, Rito, que me dejó como legado su sabiduría práctica.
- A mis 7.000.000 de Hermanos en la fe que aunque muchos no me conocen estoy seguro que al igual que yo nos tenemos tiernos cariños.
- Al profesor Puig por demostrarme que los sueños nacen por un motivo y se hacen realidad con los dedos.
- Al profesor Marcos, mi tutor y amigo, por enseñarme, por su paciencia, y ser mi guía en el camino de la ciencia.

- A mis profesores Jhon y Militza, quienes con su manera de tratarme, demostraron que todo somos iguales, por eso son mis amigos.
- Al equipo técnico del laboratorio, Eucaris, Dora, Arias, Juan C. y Nereida, por su preocupación y ser la barra que tenía para llegar a la meta.
- A mis compañeros de laboratorio:
 - Héctor, por sus oportunas sugerencias e ideas para realizar este trabajo.
 - Marisé, por ser mi asesora informática.
 - Reinaldo por preocuparse que los equipos que usé funcionaran
 - Carolina, por su ánimo y mí asesora Jurídica.
 - Lusmary y Alejandra A., por demostrarme que el fashion y la ciencia pueden convivir juntos.
 - Liliana, por demostrarme que el dicho, no deje para mañana lo que puedes hacer hoy, es la máxima.
 - Arévalo y Juan Víctor, me demostraron que no hay que correr, hay que caminar.

RESUMEN

La estreptokinasa (SK) es un potente activador de plasminogeno (Plg) y su uso clínico es ampliamente aceptado. Naturalmente es secretada por cepas de streptococcus hemolíticos, sin embargo la SK tiene como desventajas que es un fibrinolítico no específico, es decir no solo activa al Plg unido a la fibrina sino también al plasmático, induciendo así hiperplasminemia. Por ello en el laboratorio de biología y medicina experimental (LABIOMEX) de la Universidad de los Andes se desarrollo una SK hibrida extendida con el N-terminal del dominio Kringle 1 (K1) del Plg con el fin de purificarla en un solo paso por una columna de afinidad y además aumentar su especificidad al ser enlazada por la fibrina que forman los coágulos, esta es expresada por la levadura *Pichia pastoris*. Tras su caracterización la cual no había sido hecha se encontró que efectivamente la SK-K1 es purificada en un solo paso, eluyéndose con urea 4 M de una columna Lys-Sepharosa, su peso es de 52100 D, teniendo una K_{Plg} de 0,479 una V_{max} de 0,0027 $\mu\text{M}/\text{min}$. y una k_{cat} de 231,6 seg^{-1} . Tiene afinidad por la fibrina, siendo su K_D de 0,9 μM , además es potenciada con fibrinogeno por debajo de 0,3 μM , su máxima actividad se evidencia entre pH 7,5 a 8,0 y en presencia de NaCl por debajo de 50 mM su actividad no presenta modificación.

Palabras Claves: Estreptokinasa, Plasminogeno, Kringle 1, *Pichia pastoris* y SK-K1

INDICE	
1.- INTRODUCCION	1 - 37
1.1.- Homeostasis.....	3
1.2.- Homeostasis Primaria.....	4
1.3.- Hemostasis secundaria o coagulación.....	7
1.4.- Fibrinolisis.....	15
1.5.- Activadores de Plasminogeno.....	19
1.5.1.- t – pA (Activador tisular del Plasminogeno).....	19
1.5.2.- u – pA (activador de Plg tipo Uroquinasa).....	20
1.5.3.- Estreptoquinasa (SK).....	21
1.6.- Terapia Fibrinolítica.....	22.
1.6.1.- APSAC (Complejo activador SK – Plg acetilado).....	24
1.6.2.- Estafiloquinasa (SAK).....	24.
1.6.3.- Urokinasa.....	24
1.6.4.- Prourokinasa (r – Scupa).....	25
1.6.5.- Alteplasa (rt – pA).....	25
1.6.6.- Reteplase (r pA).....	25
1.6.7.- Tecneplase (TNK – t-pA).....	26
1.6.8.- Lanoteplase (n pA).....	26
1.6.9.- Activador de Plg de murciélago Vampiro (bat-pA, vpA).....	27
1.6.10.- Estreptoquinasa (SK).....	27
1.7.- Cinética de activación del plasminogeno.....	28

1.8.- <i>Pichia pastoris</i>	33
1.8.1.- Metabolismo del metanol.....	34
1.8.2.- Promotor AOXI.....	37
2.- OBJETIVOS.....	38
3.- HIPOTESIS.....	39
4.- MATERIALES.....	40 - 45
4.1.- Organismo.....	40
4.2.- Anticuerpos y sueros.....	40
4.3.- Medios de cultivos.....	40
4.4.- Tampones para la purificación de Plaminogeno humano.....	41
4.5.- Tampones para la transferencia de proteínas e inmunoblot.....	42
4.6.- Tampones y soluciones para Zismografía.....	42
4.7.- Tampones y soluciones para SDS-PAGE.....	42
4.8.- Tampones y soluciones para tinción de SDS-PAGE con Azul de Comassie.....	43
4.9.- Tampones y soluciones para tinción de SDS-PAGE con Nitrato de Plata.....	43
4.10.- Tampones y soluciones para la preparación de fibrina acoplada en fase sólida.....	44
4.11.- Tampones para determinar pH optimo.....	45
4.12.- Sustrato sintético.....	45
4.13.- Membranas.....	45
4.14.- Equipos.....	45

5.- METODOS.....	47 - 58
5.1.- Purificación de plasminogeno.....	47
5.2.- Determinación de la producción de STK-K1 en <i>Pichia pastoris</i> por overlay caseína plasminógeno.....	48
5.3.- Determinación del medio en el cual se obtiene mayor crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	49
5.4.- Determinación del tiempo en el cual se obtiene mayor producción de SK-K1 expresada por <i>Pichia pastoris</i>	50
5.5.- Ensayo de actividad en placas de caseína plasminógeno.....	50
5.6.- Purificación de SK-K1 producida por <i>Pichia pastoris</i> recombinante.....	51
5.7.- Transferencia de proteínas e inmunoblot.....	52
5.8.- Zismografía.....	53
5.9.- Determinación del peso molecular de SK-K1.....	54
5.10.- Determinaciones cinéticas, K_{Plg} , V_{Max} y k_{cat}	54
5.11.- Preparación del soporte de fibrina fase sólida y determinación de la K_D de SK-K1 por fibrina.....	56
5.12.- Potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de fibrinogeno.....	57
5.13.- Determinación del valor de concentración de NaCl (fuerza iónica) en la cual la SK-K1 expresada por <i>Pichia pastoris</i> tiene el máximo de actividad.....	58
5.14.- Determinación del valor de pH en el cual la SK-K1 expresada por <i>Pichia pastoris</i> tiene el máximo de actividad.....	58

6.- RESULTADOS.....	59 - 84
6.1.- Purificación del plasminogeno humano.....	59
6.2.- Determinación de la producción de STK-K1 en <i>Pichia pastoris</i> por overlay caseína plasminogeno.....	62
6.3.- Determinación del medio en el cual se obtiene mayor crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	63
6.4.- Determinación del tiempo en el cual se obtiene mayor producción de SK-K1 expresada por <i>Pichia pastoris</i>	64
6.5.- Purificación de SK-K1.....	65
6.6.- Western Blot.....	68.
6.7.- Zismografía en overlay.....	69
6.8.- Determinación del Peso molecular.....	70
6.9.-Cinéticas de SK-K1, determinación de K_{Plg} , V_{max} y k_{cat}	71
6.10.- Determinación de la K_D y el radio molar de enlace de SK-K1 por la fibrina.....	78
6.11.- Potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de Fibrinogeno.....	81
6.12.- Efecto de la activación del Plg por SK-K1 en presencia de NaCl.....	82
6.13.- Efecto de la activación del Plg por SK-K1 a diferentes pH.....	83
7.- DISCUSION.....	85
8.- CONCLUSIONES.....	93
9.- BIBLIOGRAFIA.....	94
10.- APENDICE.....	101

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Los múltiples papeles de las plaquetas en la Homeostasis.....	7
FIGURA 2: Estructura del fibrinogeno	14
FIGURA 3. Diagrama esquemático de la polimerización del fibrinogeno y fibrina	14
FIGURA 4: Cascada de la Coagulación y formación de fibrina por las vías Intrínsecas e Extrínsecas	15
FIGURA 5: Secuencia de Aminoácidos del plasminogeno humano y la posición de los 5 kringles (K) en la cadena A, el sitio de Pre-activación (PPA) entre Lys-77 y Val-562.....	18
FIGURA 6: Mecanismo de acoplamiento y activación proteolítica del plasminogeno por la Estreptoquinasa.....	33
FIGURA 7: Vía del metanol en <i>Pichia pastoris</i>.	36
FIGURA 8. Esquema de transferencia de proteínas por Western Blot.....	52
FIGURA 9: Perfil de elusión en L-lysine Sepharose 4B con ϵ-ACA.....	59
FIGURA 10: Perfil de elusión del Plg en Sepharose 6B.....	60
FIGURA 11: SDS-PAGE al 10%. Para Plg.....	61
FIGURA 12: Overlay de Caseína Plasminogeno. Sobre colonias crecida en placas de MM. Para determinar si <i>Pichia p.</i> produce SK.....	62
FIGURA 13: Crecimiento de <i>Pichia p.</i> en diferentes tipos de medios.....	63
FIGURA 14: Curva de actividad SK-K1 a diferentes tiempos de incubación.....	64
FIGURA 15: Perfil de elusión de SK-K1 en Sepharose 6B.....	66

FIGURA 16: Ensayo de actividad activadora de Plg de las fracciones eluidas de la columna Lys-Sepharose.....	66
FIGURA 17: SDS-PAGE al 12 % revelado con nitrato de plata. Para revelar la SK-K1.....	67
FIGURA 18: Western Blot del sobrenadante y el Purificado de SK-K1.....	68
FIGURA 19: Overlay de caseína-Plg, para SK-K1.....	69
FIGURA 20: Curva de calibración para determinar pesos moleculares.....	60
FIGURA 21: Curva de progreso de activación de Plasminogeno.	71
FIGURA 22: Gráfico DO_{405nm} versus T^2	72
FIGURA 23: Representación de concentración de sustrato frente a velocidad Inicial.....	74
FIGURA 24: representación de Lineweaver-Burk.....	75
FIGURA 25: Enlazamiento de la SK-K1 a fibrina.....	78
FIGURA 26: Enlazamiento de la SK-K1 a fibrina, Log(U de SK-K1) vs DO_{405} 120 min.....	79
FIGURA 27: Potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de fibrinogeno.	81
FIGURA 28: Efecto de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de NaCl....	82
FIGURA 29: Efecto del pH sobre la activación del Plg por SK-K1.....	83
FIGURA 30: Curva de calibración de proteínas, por Bradford.....	103
FIGURA 31: Curva de calibración de unidades de SK.....	104

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Comparación de diferentes agentes trombolíticos con respecto al t-Pa.	28
TABLA 2: Tabla de purificación.....	68

ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ADP	Adenosindifosfato
AHA	Acido aminohexanoico
Ala	Alanina
AOX	Alcohol Oxidasa
APSA	Complejo activador SK-Plg Acetilado
Arg	Arginina
Asp	Aspartico
Ca⁺²	Ion calcio
Cys	Cisteína
D. O	Densidad optica
DHAS	Dihidroxiacetona sintetasa
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FDA	Flavin Adenin Dinucleotido
FDA	Food and droga adminitration
Fg	Fibrinogeno
fl	fantolitros
Fn	Fibrina
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
Gp	Glicoproteinas
gr	Gramo
h	Horas
His	Histidina
Ile	Isoleucina
K	Kringle
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
l	litro
LACI	Inhibidor de la Coagulación
Lys	Lisina
M	Molar
mg	miligramos
min	Minutos
ml	mililitros
µgr	microgramos
µM	micromolar
n pA	Lanoteplase
PAI	Inhibidor del t-pA
Plg	Plasminogeno
Plm	Plasmina
PM	Peso molecular
PMSF	Floruro de fenil-metil sulfonilo
Pro	Prolina
PVC	polyvinyl cloro

PVG	polyglutaraldehydos
r-pA	Reteplase
RGD	Arginina-Glicina-Acido aspártico
rpm	Revoluciones por minutos
r-Scupa	Prourokinasa
rt-pA	Alteplasa
SAK	Estafilokinasa
seg	Segundos
Ser	Serina
Ser	Serina
SK	Estreptokinasa
TEMED	tetrametil etilen diamina
Tf	factor del tejido
Thr	Treonina
TNK-t-pA	Tecneplase
t-pA	Activador de Plasminogeno de tejido
U	Unidad
u-pA	Activador del plasminogeno tipo uroquinasa
Val	Valina

1.- INTRODUCCION

La importancia clínica de la estreptokinasa (SK) fue originalmente notada por Tillet y Garner (Tillet y Sherry 1949; Tillet y Garner, 1933), quien descubrió que esta proteína bacteriana causaba la lisis de los coágulos de sangre humana. Mas tarde se encontró que la SK no es una enzima *per se* si no mas bien un potente activador de plasminogeno (Plg), el precursor inactivo de la plasmina (Plm) (Schick y Castellino 1974; Bajaj y Castellino 1977). La Plm es el componente fibrinolítico activo del sistema circulatorio, solubiliza la red de fibrina (Fn) en los coágulos de sangre a través de una proteólisis limitada. La SK se usa corrientemente en la medicina clínica como un agente terapéutico en los tratamientos de bloqueo tromboembólico, incluyendo la trombosis coronaria.

La SK es producida naturalmente y secretada por varias cepas de estreptococos hemolíticos. Los estudios mas completos de la SK se realizaron sobre *Streptococcus equisimilis*, en él la secreción de SK al medio externo es liderizada por un péptido señal de 26 aminoácidos (a.a), que es eliminado durante el proceso de secreción. La proteína tiene un peso molecular de 47 kD y está compuesta de 415 residuos de a.a. Además de SK las cepas de estreptococos secreta deoxirribonucleasa, estreptolisina O, hialuronidasa y proteasas. Los mejoramientos de la cepa o modificaciones por ingeniería genética son limitados en el huésped natural debido a que se carece del desarrollo de metodología de transferencia de genes.

Alternativamente se han estudiado sistemas bacterianos para la expresión de SK. El gen fue clonado desde *S. Equisimilis* H46A como un inserto de 2,5 kb en el plasmido pBR322 y expresado en *Echerichia coli*, los niveles de producción fueron muy bajos, además la expresión fue inestable y con frecuencia hubo una inserción de un ADN extraño en la secuencia del gen de SK (Malke y Ferretti, 1984). El gen también fue clonado en *Streptococcus sanquis* resultando en la producción de una molécula cerca de 3 kD mas pequeña que la SK nativa (Malke y Col. 1984), su secuencia reveló que le faltaban 32 residuos de a.a en el extremo carboxilo Terminal, presumiblemente por modificaciones post-traduccionales (Jackson y Col. 1986).

Como una alternativa a los sistemas bacterianos, la SK ha sido expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. La producción de levadura puede alcanzar una densidad de 120 gr. /l peso seco usando metanol como única fuente de carbón. La principal enzima en la vía de la utilización del metanol es la alcohol oxidasa (AOX), la cual es inducida en presencia de metanol (Cerighino 2000). El promotor para la AOX ha sido incorporado en vectores de expresión y se ha usado para expresar genes heterologos en *P. pastoris*. En 1989 M. J. Hagenson y colaboradores expresaron en *P. pastoris* la SK obteniendo un rendimiento de 77 µgr. /ml., mas tarde L. Buela (2002) construyó una quimera, Kringle 1 :: Estreptokinasa insertada en el plasmido pHIL y expresada en *P. pastoris* de donde es exportada. En este trabajo se

realiza la caracterización y se estudia su comportamiento cinético y su rendimiento.

1.1.- Homeostasis

La ruptura de la integridad del circuito vascular origina una serie de procesos celulares y bioquímicos que involucran plaquetas, células del endotelio, glóbulos blancos y proteínas del plasma, que aseguran la reparación del daño y controlan la hemorragia. Dicho proceso se denomina homeostasis, mecanismo de defensa fundamental en todos los vertebrados (Gentry 2004). Este proceso está comprendido de tres etapas fundamentales, intrincadas e interdependientes:

-Homeostasis primaria: En esta etapa se procura detener la hemorragia mediante una vasoconstricción seguida de la formación de un trombo plaquetario. Esto dura de 3 a 5 minutos.

-Homeostasis secundaria o coagulación plasmática: El rol es consolidar el trombo plaquetario por la constitución de una red de Fibrina, proceso que dura de 5 – 10 minutos.

-Fibrinolisis: Una vez reparado el daño se produce la degradación enzimática de la masa fibrino-plaquetaria tras que dura entre 48 – 72 Horas (De Revel y Doghmi, 2004).

1.2.- Homeostasis Primaria

El endotelio vascular es una capa única de células, la mas interna de todo el sistema circulatorio, la cual cubre una gran superficie estimada en unos 3000 m² y tiene el peso en una persona adulta de 720 gr. (Víctor y van 2001), cubre todo el sistema cardiovascular, estratégicamente se localiza entre la interfaces de la sangre y el tejido, provee una barrera protectora que separa la sangre de elementos altamente reactivos en las capas mas profundas de las pared del vaso. Las células del endotelio están sometidas a una variedad de estímulos bioquímicos y biomecánicos. El hallazgo que fuerzas mecánicas propias del fluido, influyen sobre la estructura del endotelio, ha provisto un marco para entender la mecánica de los procesos dependientes de flujo en la homeostasis. Tanto plaquetas como los factores plasmáticos circulan normalmente en contacto estrecho con el endotelio. Bajo condiciones normales, las plaquetas no se adhieren a las células del endotelio, ni a proteínas adhesivas que se encuentran en el plasma (Andrews y Berndt, 2004; Pierce y col., 1999).

En caso de daño en el sistema vascular que involucre ruptura del endotelio o algún otro tipo de traumatismo, la activación de las plaquetas, que son células

anucleadas pequeñas en forma de disco con una dimensión aproximada de 2-4 x 0.5 μm , con un volumen de 7-11 fl. Las plaquetas son corpúsculos muy abundante (El segundo en importancia después de los hematíes) que circulan en la sangre entre 150-450 x 10⁹ célula/l, tienen un tiempo de vida media de 10 días, mientras que el de los factores de coagulación es casi instantáneo (Rasche 2001 y Harrison 2005). El daño del endotelio expone la matriz celular subyacente, dos receptores de adhesión, la glicoproteína (GP) Ib-IX-V y GPVI que enlazan al factor von willebrand (vWf) y colágeno respectivamente son las primeras responsables de la activación y adhesión de las plaquetas presentes en el torrente sanguíneo. Tras la adhesión se desencadena de manera violenta una serie de reacciones que conducen a la activación plaquetaria, esto está asociado con cambios en el citoesqueleto y cambios morfológicos, secretando y esparciendo diversas moléculas tanto dentro como fuera, entre estas se encuentran las integrinas que ayudan a la adhesión y agregación plaquetaria. La principal integrina es $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb-IIIa), que es un abundante receptor heterodimérico esparcido sobre la superficie de las plaquetas. Este se asocia a varios ligando tales como el fibrinogeno, fibronectina y vWf, el cual se enlaza vía péptido RGD (Arginina-Glicina-Acido aspártico) (Hillman y Col. 2002). La activación de las plaquetas que envuelve a GPI-IX-V o GPVI también conduce a la secrecion de agonistas plaquetarios, tales como Adenosin difofato (ADP), el cual actúa vía receptor acoplado a la proteína G, P2Y1 y P2Y12, las cuales refuerzan aun mas la agregación plaquetaria dependientes de la integrinas GPIIb-IIIa. La importancia crucial del GPIb-V-XI se debe a que mientras las integrinas median la adhesión

plaquetaria casi exclusivamente en condiciones baja de tensión, como en el caso de venas y arteria, la interacción de GPIb-V-XI con vWf toma lugar eficientemente bajo condiciones de flujo elevado como las que ocurren en arteriolas y pequeñas arterias. Por lo tanto bajo condiciones reológicas específicas, vWf es el único componente capaz de capturar eficientemente plaquetas del flujo sanguíneo al lugar donde la pared del vaso sufrió el daño e iniciar la disposición de las plaquetas y la formación del trombo (Canobio y Col. 2004). El agregado de plaquetas activas o trombo acelera la cascada de la coagulación, que conduce a la estabilización del coágulo por fibrina y la contracción dependiente de GPIIb-IIIa. Las plaquetas activas también expresan p-selectina, que es un contra receptor para GPIb-V-XI. Además del rol que juegan las plaquetas en la formación del trombo en la homeostasis normal, es esencial la misma secuencia de eventos que resulta en las enfermedades tromboticas tales como ataque al corazón. La ruptura de la placa atero esclerótica expone a la matriz fibrosa subyacente, la cual conduce a la formación del trombo mediado por la interacción GPIb-IX-V/vWf y (ó) GPVI/colágeno. Alternativamente una fuerte tensión patológica puede cerrar la arteria lo que puede inducir a GPIb-V-XI en las plaquetas enlazando a vWf iniciando la agregación plaquetaria dependiente de α IIb β 3. El resultado es que el trombo puede obstruir el lumen de la coronaria y obstruir la irrigación del miocardio provocándose un infarto (Figura 1).

Por un mecanismo similar la obstrucción de una arteria cerebral conduce al accidente Cerebro Vascular (ACV).

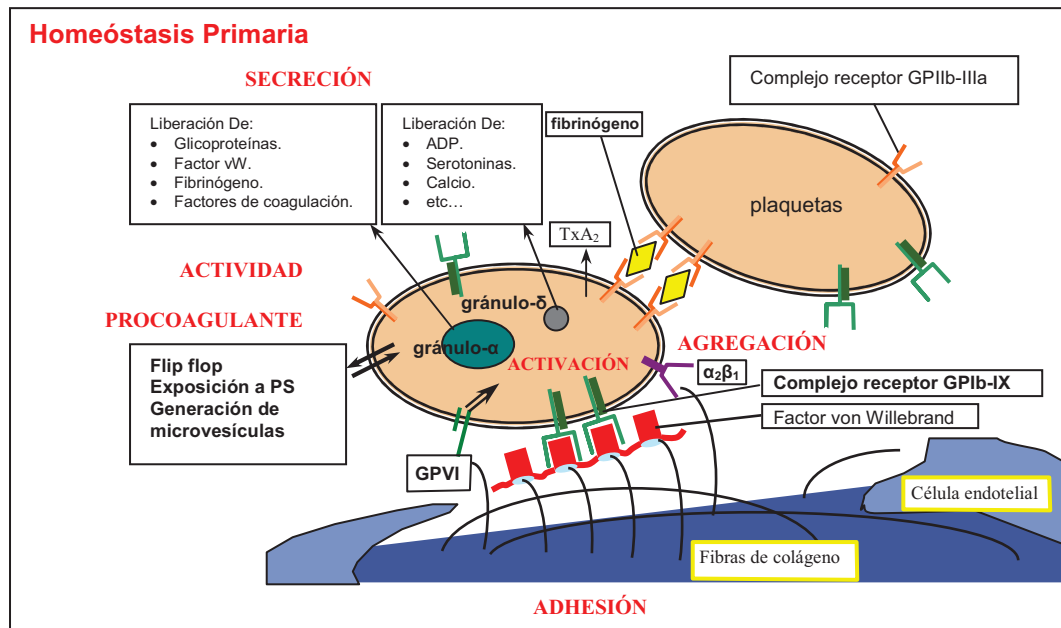


FIGURA 1: Los múltiples papeles de las plaquetas en la Homeostasis (tomado de Harrison 2005).

1.3.- Homeostasis secundaria o coagulación

Tras la agregación plaquetaria, es esencial la estabilización, lográndose esta por un entramado de Fn que enlaza a cada una de las plaquetas. Este es el resultado de una secuencia de reacciones, llevada a cabo por las glicoproteínas de la coagulación, estas son llamadas factores. Hay al menos 12 glicoproteínas distintas designadas con números romano desde el I al XIII (los números III, IV y VI no se usan), el orden de los números no refleja la secuencia de reacción. Aunque pueden haber otros sitios de

síntesis, las células del hígado probablemente sintetizan y secretan todas las proteínas envueltas en la coagulación. Las células del endotelio sintetizan y secretan el factor VIII : vWf, que forma un puente iónico con el factor VIII : C (VIII : V / VIII : vWf) en la circulación. La síntesis hepática de protrombina (factor II) y factor VII, IX y X es dependiente de vitamina K (Pierce y col., 1999).

Tradicionalmente, el sistema de coagulación se divide en dos vías, una vía extrínseca y otra intrínseca. La principal vía de iniciación en la coagulación sanguínea en vivo es la extrínseca. El evento central que desencadena la cascada de coagulación envuelve al factor tisular (Tf) que es una glicoproteína transmembranal lípido – dependiente, la cual en condiciones fisiológica normales no está expuesta en la circulación sanguínea. El Tf se encuentra secuestrado en las células quiescentes del endotelio y monocitos, y llega a estar en contacto con la sangre después del daño vascular (Gentry 2004; Pierce y col. 1999). El Tf tiene una alta afinidad por el factor VII que circula en la sangre, las dos proteínas forman un complejo uno a uno en presencia del Ion Ca^{+2} , esto facilita la conversión del factor VII a una serino proteasa (factor VII_a), debido a la eliminación de un péptido único, unido a la proteína precursora, el sitio de corte es el enlace Arg₁₅₂ – Ile₁₅₃. Esta reacción dependiente del Ion Ca^{+2} es catalizada por trazas de proteínas circulantes en sangre, tales como factor X_a, Trombina, factor VII_a o factor IX_a. El complejo factor VII_a – Tf, convierte al factor X a una serino proteasa por la ruptura de un enlace (Arg₅₂ – Ile₅₃) en el amino Terminal de la cadena pesada. Esto resulta en la liberación de un pequeño péptido de

52 a.a de la proteína precursora. La función del Tf como un cofactor en la activación del factor VII y X acelera estas dos reacciones, aparentemente por el cambio conformacional.

El nuevo factor generado (factor X_a) forma un complejo uno a uno con el factor V, en presencia del Ion Ca^{+2} y fosfolípidos, este complejo también es llamado protrombinasa, por convertir protrombina a trombina, una serino proteasa compuesta por dos cadena polipeptídica. La activación de protrombina se debe a la hidrólisis de dos péptidos ($Arg_{271} - Thr_{252}$ y $Arg_{320} - Ile_{321}$) que reduce su peso molecular (PM) de 71600 a 39000 dalton. Esto resulta en la generación de trombina una serino proteasa, de la porción del carboxilo Terminal de la protrombina que esta unida a los fosfolípidos.

El factor V_a participa como un cofactor en la activación de la protrombina, incrementando la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción cerca de 1000 veces mientras que los fosfolípidos provistos por las plaquetas reducen el Km para la protrombina cerca de 1400 veces. Es esencial que el factor V se active por proteólisis parcial para participar en esta reacción. Inicialmente es probable que esta activación sea catalizada por el factor X_a recién generado, en presencia del Ion Ca^{+2} y fosfolípidos. Después que la trombina es generada, también activa al factor V. En cada caso la activación se debe a la ruptura de dos péptidos, llevada a cabo en los

enlaces, Arg₇₁₀ – Ser₇₁₁ y Arg₁₅₄₅ – Ser₁₅₄₆, en la única cadena de la proteína precursora (Duga y col. 2004).

Cuando se forma la trombina, esta convierte al fibrinogeno (Fg) en fibrina por medio de una proteólisis limitada. El Fg tiene 2964 a.a y 4 carbohidratos, que le dan un peso total de 340000 dalton. Contiene 29 puentes disulfuro, seis cadenas y principalmente es sintetizado en el hígado aproximadamente de 1.7 a 5 gr. (9 μ M) (Errick y col., 1999). Es una glicoproteína con una inusual estructura, tiene propiedades de proteína globular y fibrosa, esta constituida por dos porciones idénticas de tres cadenas cada una, denominadas A α , B β y γ , el centro de la molécula, la región E, los aminos terminal de las seis cadenas. Desde allí las cadenas se entrelazadas y formando una estructura helicoidal, sostenida por puentes disulfuro, la cual lleva a la región mas distal del centro, denominada región D, donde las cadenas A α B β terminan (Figura 2). La formación de fibrina se debe a la eliminación de un péptido en cada una de las dos cadenas α (Arg₁₈ – Gly₁₉) y en cada una de las dos cadenas β (Arg₁₆ – Gly₁₇). Este corte resulta en la liberación de 4 fibrino péptidos, dando un monómero de fibrina con una nueva secuencia amino Terminal de Gly – Pro – Arg en la cadena α y Gly – His – Arg en la cadena β , dicha liberación cambia la solubilidad que provoca el agregado de las moléculas formándose las fibras de fibrina (Standeven y Col. 2005). La nueva secuencia generada en el amino Terminal, Gly – Pro – Arg, en la cadena α de un monómero enlaza al dominio D en el monómero de fibrina adyacente, conduciendo a la polimerización de la fibrina, de

manera similar, la nueva secuencia del amino Terminal, Gly – His – Arg de la cadena β se enlaza al dominio D del monómero de fibrina adyacente, resultando por ambos lados, tanto en la cadena α como β la polimerización de la fibrina. La reacción de polimerización genera la fibrina insoluble del coagulo. La red de fibrina se enlaza a las plaquetas por la Gp IIb – IIIa.

Cuando la fibrina se genera, también acelera la conversión del factor XIII a factor XIII_a por trombina en presencia del Ion Ca⁺². El factor XIII_a es una enzima que entrelaza los monómeros de fibrina, formando puentes por ϵ – (γ – Glutamil) Lisina entre dos moléculas adyacentes (figura 3). La reacción que entrelaza a los monómeros de fibrina, inicialmente involucra a la cadena γ , la cual permite el enlazamiento de las cadenas α , esto conduce a la formación de un fuerte coagulo de fibrina. Se crea un puente entre γ Lys₄₀₆ y γ Glu₃₉₈ o γ Glu₃₉₉ sobre la otra cadena, guiando a la formación de la estructura dimérica principal, creándose un puente entre el dominio D de una fibrilla con el dominio D de la otra (Standeven y col. 2005). El factor XIII, es un tetrámero compuesto de dos sub- unidades a y dos sub – unidades b, la sub – unidades a contiene el sitio catalítico, mientras que la b estabiliza y regula la sub – unidad a. La activación del factor XIII por trombina se debe a la eliminación de un péptido (Arg₃₇ – Gly₃₈), en cada una de las dos cadenas a, en el tetrámero (a₂b₂), guiando así a la formación del tetrámero (a' ₂b₂).

Cuando la cantidad del Tf es limitada, tras el daño vascular, la activación del factor IX, más que el factor X, juega un papel importante en la iniciación de la vía extrínseca de la coagulación. Esto se debe en parte al hecho que tanto la K_m y V_{max} para el factor IX y el factor X varía con la concentración del Tf, parece que el factor IX es mejor sustrato que el factor X. La activación del factor IX por el complejo factor VII_a – Tf, también involucra una proteólisis durante la cual dos péptidos internos, cuyo corte ocurre en los enlaces Arg₁₄₅ – Ala₁₄₆ y Arg₁₈₀ – Val₁₈₁, son eliminados. El nuevo factor V, factor IX_a, está compuesto por una cadena pesada y una liviana, entonces forma un complejo con el factor VIII_a en presencia del Ion Ca⁺² y fosfolípidos. Este complejo activa al factor X, de la misma forma que se lleva a cabo por el complejo factor VII_a – Tf. El factor VIII se activa por una proteólisis (Arg₃₇₂ – Ser₃₇₃ y Arg₁₆₈₉ – Ser₁₆₉₀) mediante la cual una gran región se elimina del precursor, el factor VIII_a. Se compone de dos fragmentos amino Terminal y un fragmento carboxilo Terminal, estos tres fragmentos se unen por medio del Ion Ca⁺².

La vía extrínseca de la coagulación es de vida corta, probablemente se debe a la presencia en sangre de un inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteínas (LACI). Esta proteína inactiva el complejo factor VII_a – Tf en la activación del factor X formando un complejo con el complejo ternario factor VII_a – Tf - factor X_a. Sorprendentemente, LACI no bloquea la activación del factor IX, por el complejo factor VII_a – Tf. Así que la activación de factor X puede continuar en parte, por la vía intrínseca en presencia de LACI.

La vía intrínseca de la cascada de coagulación requiere una glicoproteína del plasma, llamada factor XI. Este factor de coagulación también circula en sangre como un precursor de una serino proteasa, la activación es llevada a cabo por trombina en presencia de cargas negativas, tales como sulfátidos, heparina o sulfato dextrano, dicha activación se debe a la ruptura de un enlace ($\text{Arg}_{369} - \text{Ile}_{370}$) en cada una de las dos sub-unidades del factor XI; esto conduce a la formación de factor XI_a , una serino proteasa compuesta de dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, estas cuatro cadenas se mantienen unidas por puentes disulfuro. El factor XI_a propicia la activación de más factor XI en presencia del ión Ca^{+2} . Esto ocurre por la hidrólisis del mismo péptido en el factor IX hidrolizado por el complejo del factor $\text{VII}_a - \text{Tf}$. La trombina generada, también estimula la vía intrínseca por medio de la activación del factor V y factor IX. Estas dos reacciones que generan factor V_a y factor VIII_a adicional ocurren en ausencia del fosfolípidos y el ión Ca^{+2} (Davie y col. 1991) (figura 4)

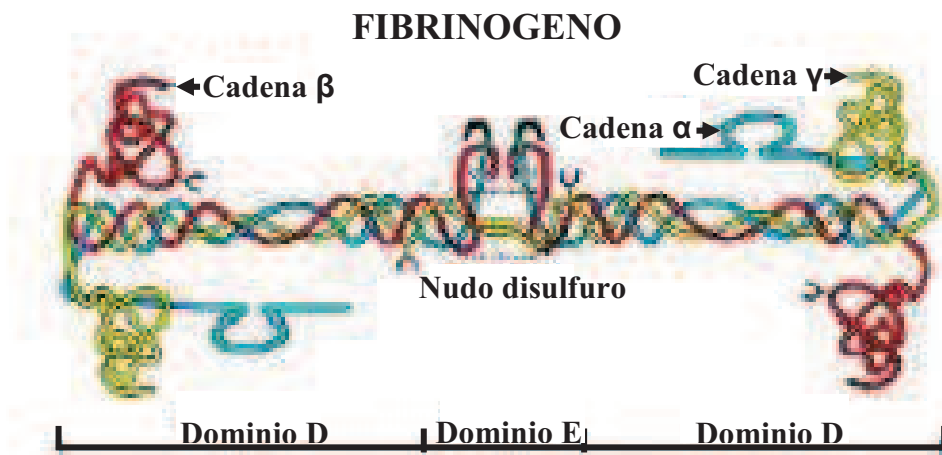


FIGURA 2: Estructura del fibrinogeno (tomado de Eric y Col. 1999)

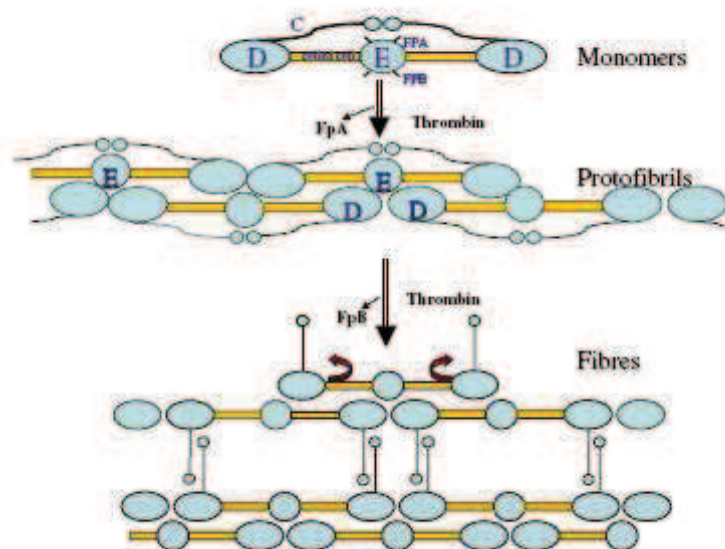


FIGURA 3. Diagrama esquemático de la polimerización del fibrinogeno y fibrina (Tomado de Standeven y Col. 2005)

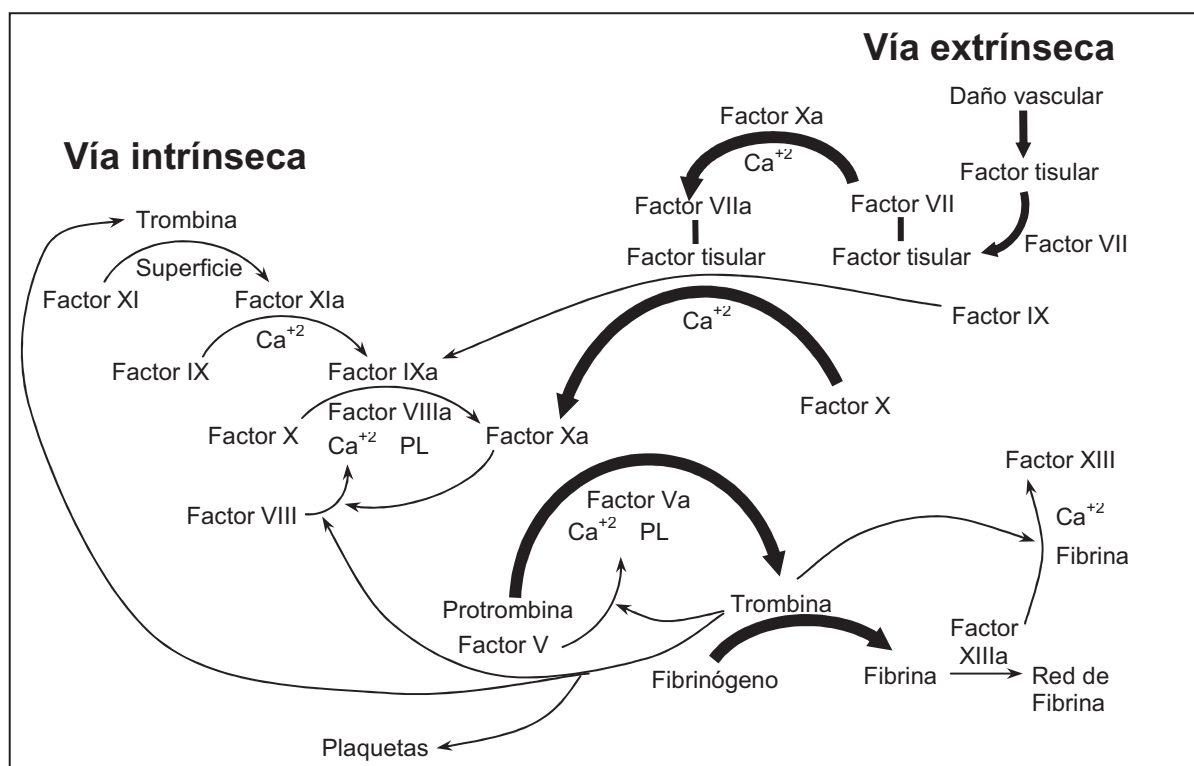


FIGURA 4: Cascada de la Coagulación y formación de fibrina por las vías Intrínsecas e Extrínsecas (tomado de Davie 2003).

1.4.- Fibrinolisis:

La función del sistema fibrinolítico es la degradación proteolítica de Fn y otras estructuras proteicas por medio de la Plm la cual es una serinoproteasa, cuyo precursor es el Zimógeno Plg.

La fibrinolisis se inicia por el enlace del Plg y activadores del Plg en sitios específicos sobre las moléculas de Fn y a receptores que se encuentra sobre la

superficie de las células del endotelio. Los activadores del Plg convierten al Plg en Plm la cual degrada la Fn (Chandler 1996).

El Plg esta presente en el plasma a una concentración de cerca de $2 \mu\text{M}$, es sintetizado principalmente en el hígado, sin embargo, se han identificado otras fuentes, tales como la glándula adrenal, riñón, cerebro, testículos, corazón, pulmón, útero, bazo, timo e intestino. Inicialmente es sintetizado como una proteína de 810 a.a, pero durante la secreción sufre la eliminación de 19 a.a, quedando así con 791 a.a y un peso molecular de 92.000 dalton (Ponting y Col. 1992; Castellino y Plopis 2005; Lijnen 1994). La molécula se organiza en 7 dominios estructurales, a saber un péptido de pre-activación, compuesto de 77 residuos de a.a (1-77), cinco secuencias homologas denominadas Kringles (K), que son estructuras en forma de gancho, con 3 puentes disulfuro, con 80 residuos de a.a cada una y el dominio proteolítico (a.a 562-791) (Collen 1999). El Plg de 791 residuos, por ser el amino Terminal el Glutámico, se le denomina Glu-Plg. La ocupación de uno o varios sitios por lisinas o acido ω – amino carboxílico, induce alteraciones conformacionales en la molécula de Glu – Plg de una estructura cerrada a una abierta, la Fn ejerce efecto sobre el Glu – Plg de modo que el enlace inicial induce el cambio conformacional, la diferencia entre la estructura cerrada y abierta comporta cambios espaciales en el dominio catalítico de la proteína.

La estructura abierta también puede ser inducida por la ruptura catalizada por Plm al remover un péptido N – Terminal (residuos 1 – 77), creando así al Lys – Plg. La afinidad del Plg por Fn y el grado de activación, es estimulada significativamente por esta estructura reversible, desde cerrada a la forma abierta. Consecuentemente, el enlace a lisina suministra una regulación cinética de la fibrinólisis (Christensen y Molgaard 1992)

Los Kringles juegan un papel importante en la regulación del Plg (Hoover y col. 1993). Se encuentran en la región no catalítica (Padmanabhan y col. 1994).

-Kringles 1 (Cys₈₄ – Cys₁₆₂): Posee alta afinidad por la lisina y análogos como la arginina. Se une a la fibrina fuertemente (Hoover y col. 1993, Wu y col. 1994).

- Kringles 2 y 3 (Cys₁₆₆ – Cys₂₄₃ y Cys₂₅₆ – Cys₃₃₃): No se sabe si tiene afinidad por la lisina, en vista que tiene un intra dominio proteolítico; sin embargo tiene una afinidad moderada por el ácido 6 – amino hexanoico (6 – AHA) (McCance y Castellano 1995).

- Kringles 4 (Cys₃₅₈ – Cys₄₃₅): Se enlaza a C – Terminal de la lisina y análogos como el 6 – AHA. Posee una afinidad débil por la fibrina.

- Kringle 5 (Cys₄₆₂ – Cys₅₄₁): Carece de afinidad para la lisina. Enlaza a la benzamidina, arginina y tiene una afinidad moderada por la fibrina (Ponting y col. 1992, Sottrup-Jensen y col. 1978) (figura 5).

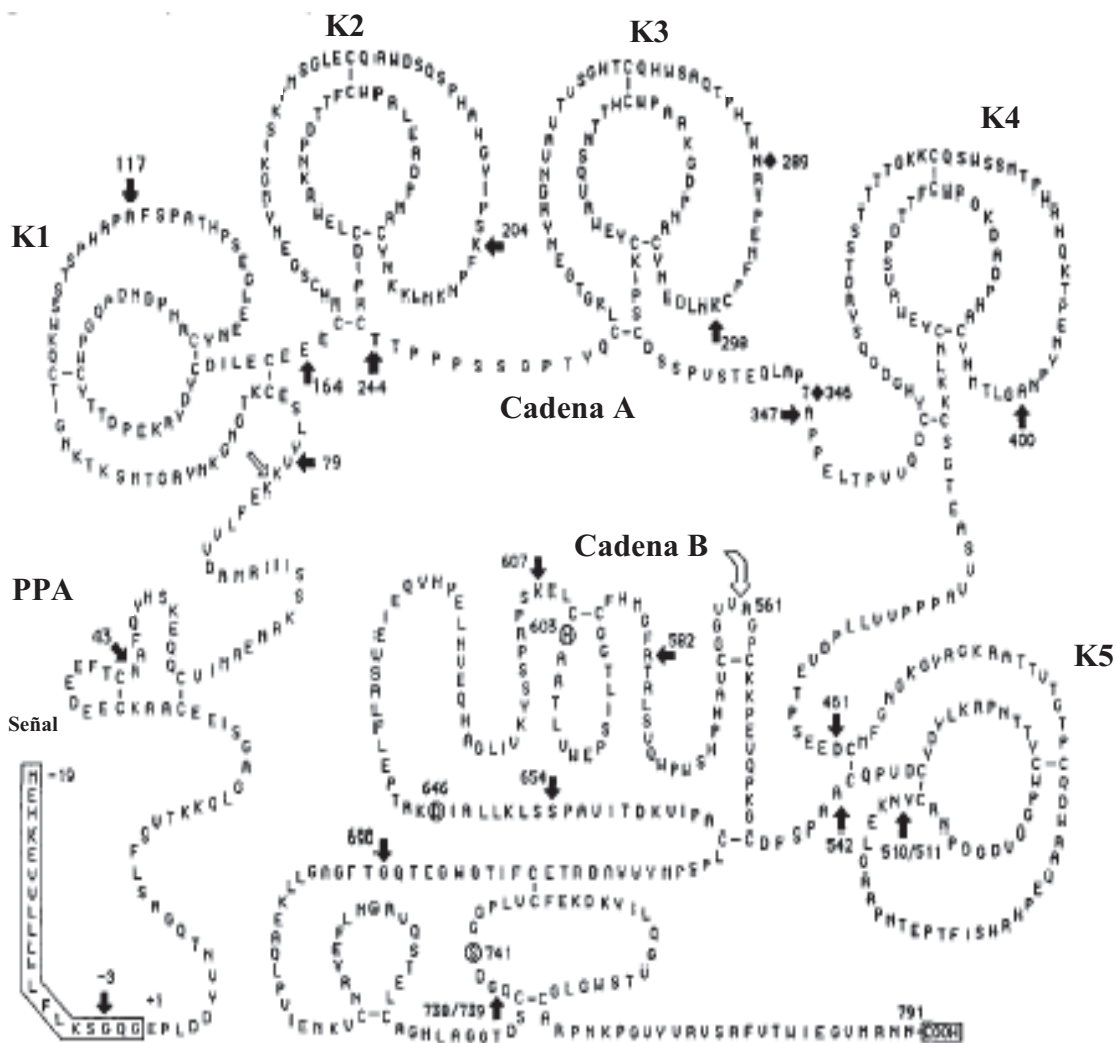


FIGURA 5: Secuencia de Aminoácidos de plasminógeno humano y la posición de los 5 kringles (K) en la cadena A, el sitio de Pre-activación (PPA) entre Lys-77 y Val-562. (Tomado de Petersen y col.1990)

1.5.- Activadores del plasminogeno:

Los activadores de Plg pueden ser divididos en dos grupos, endógenos (t-pA y u – pA), presente en sangre y otros fluidos y exógenos, como SK (www.chromogenix.se).

1.5.1.- t – pA (activador tisular del Plg):

Es el principal activador de Plg en sangre, se produce como una molécula de una sola cadena, de 530 a.a, en las células del endotelio vascular y es secretado al plasma continuamente. Contiene de 7 – 13 % de carbohidratos, resultando así una molécula de 68.000 D. El t – pA en sangre se encuentra formando un complejo con su inhibidor principal, PAI – 1. La única cadena de t – pA se convierte en una forma de dos cadena, como consecuencia de la proteólisis en la Arg₂₇₅ – Ile₂₇₆, esta es la forma activa del t – pA, aunque la simple cadena exhibe una débil actividad (www.chromogenix.se). La molécula del t – pA se compone de cuatro dominio distintos: (1) La región amino- terminal de 47 residuos de a.a (4 – 50), conocido como dominio tipo fibronectina o dominios en forma de gancho o dedo, (2) un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), (residuos a.a 50 – 87), (3) una región con dos Kringles (residuos 87 – 176 del Kringle I, residuos 177 – 262 Kringle 2) y (4) una región serino proteasa (residuos 276 - 527), con los residuos del sitio activo His₃₂₂ – Asp₃₇₁ y Ser₄₇₈. Los primero 3 dominios ejercen una actividad

moduladora de la enzima. El Kringle 2 es el principal responsable de la alta afinidad del t – pA por la fibrina y su activación (Irigoyen y col. 1999). El t – pA en ausencia de fibrina tiene una baja afinidad por el Plg ($K_m = 65 \mu M$), pero en presencia de fibrina tiene una elevada afinidad ($K_m = 0.15 \mu M$) (Collen 1999). El t – pA, convierte al Plg a plasmina por una proteólisis en la Arg₅₆₁ – Val₅₆₂.

1.5.2.- u – pA (activador de Plg tipo uroquinasa)

Es producido principalmente por el riñón como una molécula de cadena simple, de 53.000 D (ScupA o pro – u – pA). Cuando es secretado, pro – upA se convierte en una forma activa de doble cadena (u-pA), por la proteólisis de un péptido enlazante (residuos 158 – 1159) catalizado por Plm. Las dos cadenas peptídicas de u – pA están unidas por un puente disulfuro, la molécula contiene 3 dominios funcionales. En la región carboxilo Terminal, tiene un dominio serino proteasa (residuos 144 – 411), también llamado cadena B, el cual tiene una elevada actividad; el dominio no catalítico, denominado cadena A, contiene un Kringle (residuos 47 – 135) y el dominio tipo EGF (residuos 4 – 43). Así que la molécula u-pA tiene a los menos dos partes interdependientes, la cadena A y la B. u – pA solo puede activar Plg en presencia de fibrina. La activación del Plg a Plm se lleva a cabo en la misma región que el t – pA actúa.

1.5.3.- Estreptoquinasa (SK)

La SK es un activador de Plg secretado por streptococcus del grupo A, C y G. es una proteína compuesta de 414 a.a, teniendo un peso molecular de 47.000 D, exhibe su máximo de actividad a pH 7.5, no contiene cistina, cisteina, fósforo, carbohidratos conjugados o lípidos (Banerjee y col. 2004), su coeficiente de extinción molar $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ es de 9.49, un contenido de α hélice de 10 – 12% (Fletcher y col. 1970). Tiene 3 dominios estructurales: α (residuos 1 – 150), β (residuos 151 – 287) y γ (residuos 288 – 414) unidos por hebras flexibles (Tang y col. 1999, Lizano y Johnston 2005).

La SK forma un complejo equimolar con el Plg, cada dominio enlaza al Plg, aunque ninguno puede activar el Plg independientemente, estos tres dominios envuelven al μ Plg, el cual contiene el dominio catalítico del Plg (residuos 542 -791), formando un complejo en forma cóncava con el sitio activo de la plasmina, ubicado en el fondo de la concavidad. El dominio α de la SK enlaza cerca del sitio activo, en la región de los residuos 713 – 721, donde la Arg 719 forma un puente con Glu39 y Glu134 de la SK y además tiene una interacción tipo van der Waals en la Val 19 de la SK, también interactúa con el residuo His 603 y Asp 646. El dominio β contribuye sustancialmente a enlazar el sustrato en la concavidad del complejo, sugiriendo así que este dominio está envuelto en reconocer el sustrato Plg (Wang y Col. 1998). El dominio γ de la SK enlaza a μ Plm cerca del sitio activo, es mantenido con múltiples

interacciones iónicas e hidrofóbicas, este dominio determina la especie de Plg necesario para la activación, de allí que la SK active al Plg humano pero no al de conejo (Kim y col., 2002). Otras interacciones son las que ocurren en los residuos 622 – 628, 692 – 695 y 558 – 566, estando envuelto la Ala 342 de la SK (Wang y Col., 1998).

Los residuos 1 – 59 de la SK, que forman parte del dominio α juegan un papel crucial en la activación del Plg estabilizando los puentes de sal entre Ile1 de la SK y Asp 740 del Plg que se necesita para que la SK induzca la exposición del sitio activo del Plg por un mecanismo no proteolítico, también juega un papel en la activación del Plg en ausencia de fibrina una propiedad que distingue a la SK del t – pA.

1.6.- Terapia Fibrinolítica

Eventos tromboticos en venas y arterias propician infarto del miocardio, infarto isquémico, trombosis arterial periférica, trombosis en venas profundas y embolismo pulmonar, la mayoría son potencialmente mortales, lo que hace necesario el suministro de algún agente trombolítico.

Todos los agentes trombolíticos o fibrinolíticos corrientes son activadores del Plg, los cuales comparten a menor o mayor grado el potencial de inducir a la Plm a degradar la Fn en el trombo, la degradación de la Fn produce el efecto benéfico

reduciendo el tamaño del trombo, pero simultáneamente los activadores pueden inducir la degradación de coágulos plaquetarios en un sitio de daño vascular (Marder, 2001).

La terapia trombolítica había sido probada en pacientes con infarto agudo al miocardio desde la década de 1950, pero no hubo un progreso significativo sino hasta la década de 1980. Se inicio con la demostración por Wood *et al* que en la etapa temprana del infarto al miocardio estaba invariablemente asociada a la obstrucción de la arteria coronaria. También estaba asociado con la demostración de Rentrop *et al*, que al suministrar SK en la parte temprana del infarto se inducía una rápida recanalización. Todo fue rápidamente confirmado y se acumularon evidencias, lo que permitió que se esparciera la aplicación de la SK (Collen 1999).

Desde el uso de las primeras terapias fibrinolíticas se ha avanzado mucho, por lo que se puede hablar de 3 generaciones de agentes trombolíticos.

- 1^{ra} Generación: SK y Urokinasa
- 2^{da} Generación: alteplase y APSAC
- 3^{ra} Generación: Bat pA, retemplase, tenecteplase, lanocteplase, estafiloquinasa, activador del Plg Glicosilado recombinante.

1.6.1.- APSAC (Complejo activador SK – Plg acetilado)

Es un complejo de SK con el sitio activo del Plg humano acetilado, donde el sitio proteolítico ha sido inactivado con un ácido anisóico. Tiene un MW = 131.000 D, no requiere Plg libre circulante para ser efectiva, su tiempo de vida media es de 40 – 90 min. esto le confiere una ventaja, pero no puede volver a usarse ya que es antigénico.

1.6.2.- Estafiloquinasa (SAK)

Es un potente activador de Plg tal como la SK, es de origen bacteriano, producido por *Staphilococcus aureus*. Forma un complejo uno a uno con el Plg . es una cadena de 136 a.a. como ventaja tiene una alta afinidad por fibrina y puede ser usado 2 veces en paciente, como desventaja es que tiene una respuesta inmune.

1.6.3.- Urokinasa:

Es un potente activador de Plg con un peso molecular de 54.000 D, tiempo de vida media de 15 min. Tiene una baja incidencia en complicaciones con hemorragias, no es antigénico ni pirogénico, no causa reacción alérgica todo esto le confiere

ventajas y como desventaja es menos específico y tiene un elevado costo. En Julio de 1999 la FDA (Food and Drug Administration), suspendió indefinidamente su uso.

1.6.4.- Prourokinasa (r – Scupa):

Es un polipéptido de cadena sencilla de 414 a.a y un PM = 49.000 D. Tiene un tiempo de vida media de 7 – 8 min., su ventaja es que incrementa la efectividad de la terapia trombolítica, no tiene riesgo de hemorragia. Su desventaja es el tiempo de vida media que posee.

1.6.5.- Alteplasa (rt – pA):

Es una serino proteasa tiene 527 a.a y un PM de 68.000 D, es producido por tecnología recombinante del ADN. Su ventaja es que no es inmunogénico es altamente específico para la fibrina, así que activa Plg en el coagulo 100 veces mas que el que esta circulando, como desventaja es que tiene riesgo de sangrado y un tiempo de vida media de 4 – 6 min.

1.6.6.- Reteplase (r pA).

Tiene 355 a.a (1- 3 y 176 – 527) de los 527 a.a del t – pA el EGF y la región del Kringles 1 han sido eliminado, no requiere un complejo con Plg para su actividad en

el Plg. Alta especificidad por Fn, un tiempo de vida media de 18 min., mayor potencia trombolítica, 4 veces mas que Alteplase, todo esto le confiere ventaja. Como desventaja, tiene una alta frecuencia en complicaciones con sangrado.

1.6.7.- Tecneplase (TNK – t-pA):

Es una variante del t – pA obtenida por bioingeniería, preserva la actividad fibrinolítica de t – pA. Las letras T, N y K representa 3 a.a (Treonina, Asparagina, Lisina), cambiado del t – pA natural. Asp103 por Tre, Glu 117 por Asp y la secuencia Lys 296 – His 297 – Arg 298 – Arg 299 en la región proteasa es reemplazada por 4 Ala. Como ventaja tiene que no es inmunogénico y es 80 veces más resistente al PAI – 1, alta especificad por la fibrina. Su desventaja es su elevado costo.

1.6.8.- Lanoteplase (n pA):

Es una variante del t – pA en la cual el dominio tipo dedo y el EGF ha sido quitado y la glicosilacion en el Kringle 1 ha sido modificada. Como ventaja tiene un tiempo de vida media de 37 min., se puede suministrar una dosis baja o única y su desventaja es que produce mayor sangrado comparado con alteplase.

1.6.9.- Activador de Plg de murciélago Vampiro (bat-pA, vpA):

La saliva de murciélago vampiro, *Demodus rotundus*, contiene una familia de 4 activadores de Plg llamados activadores de Plg salivario de desmodus (DPSAS). De estos DPSAS $\alpha - 1$ o bat. pA es la mayor de las proteínas (477 a.a) y estructuralmente es el más parecido al t – pA humano. Tiene el dominio en forma de dedo, una región EGF y un único Kringle a diferencia del t – pA que posee dos kringles. Como ventaja posee un elevado tiempo de vida media de 2,8 horas, alta afinidad por la Fn, se puede suministrar como una única dosis, su desventaja es que inmunogénico y muy caro.

1.6.10.- Estreptoquinasa (SK):

Es el único trombolítico aprobado por la administración de drogas y alimento (FDA) para el tratamiento de enfermedades de sistema vascular periférico. Comparando pruebas clínicas y costo efectivo sugieren que es la droga a escoger en terapias trombolítica. Entre su desventaja esta es que tiene repuesta anafiláctica, hay riesgo serio de hemorragia. (Tabla1)

TABLA 1: Comparación de diferentes agentes trombolíticos con respecto al t-PA

	SK	UK	r-ProUK	rt-PA	r-PA	TNK-tPA	SAK	VPA	nPA
M. W (KD)	48	32/54	49	68	39	65	16.5	52	53.5
Plg activation	I	D	D	D	D	D	I	I	D
Esp. Por fibrina	+	+	++	++	+	+++	+++	+	+
Selectividad fibri	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND
PAI - 1 Resisten.	ND	No	?	No	?	Si	?	Si	?
Fibrinogeno-lysis	++	++	ND	+	+	+	ND	ND	ND
T. de vida media	10/90	2	9	5	15	25	6	168	57
Eliminación	Riñón	Riñón	Hígado	Hígado	Riñón	Riñón	Hígado	Hígado	Hígado
Inmunogenicidad	Si	No	No	No	No	No	Si	Si	No
Costo	+	++	ND	+++	++++	++++	ND	ND	ND

Abreviaciones: KD = Kilodalton, PAI-1=Inhibidor del activador de Plasminogeno SK=Estreptokinasa, UK=Urokinasa, rProUK=proUrokinasa recombinante, rtPA=activador de Plasminogeno recombinante, rPA=retaplase, TNKtPA=Tecneplase, SAK=estafilokinasa, VPA=Activador de Plasminogeno de murciélago vampiro, n PA=lanoteplase, I=Indirecto, D=directo, ND=no disponible

1.7 Cinética de activación del plasminogeno

Hay numerosos estudios sobre la cinética de activación del Plg en especial con la SK (Kosow 1975, Gonzáles-Gronow y col. 1977, Wohl y col. 1980, Hoylaerts y col. 1982, Fears y col. 1985, Takada y col. 1988, Young y col. 1998, Boxrud y col. 2004; Boxrud y Bock 2004). La SK se enlaza al Plg para producir un complejo inicialmente inactivo, SK – Plg. El complejo SK – Plg sufre un rearrreglo para formar el complejo activo, SK – Plg*. El complejo SK – Plg* se puede transformar en un complejo SK – Plm, este complejo tiene la propiedad de transformar el Plg en Plm, la Plm sola es un activador de Plg muy pobre, lo que indica que la SK induce cambios conformacionales en el sitio activo (Wang y col. 2000) (figura 6)

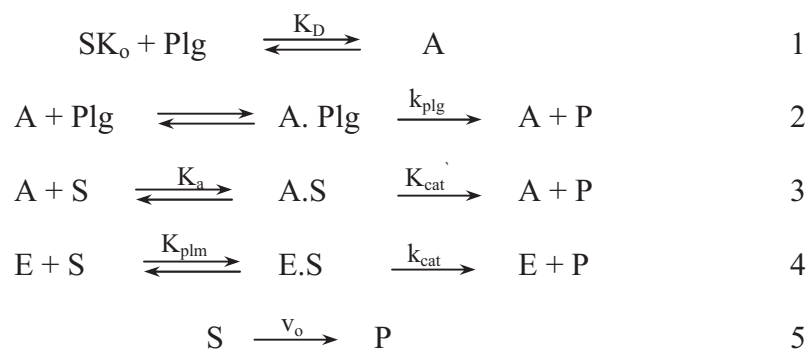
El estudio cinético de la activación del Plg por SK, se estudia por el método del estado estacionario. Para ello la activación del Plg por SK se mide por un continuo monitoreo del incremento de la absorbancia de VLK – pNA a 405 nm. (Wohl y col. 1978).

Ecuación para determinar K_{Plg} y k_{Plg} de activación:

Definición de símbolos:

- 1.- $[Plg]_0$ = Concentración del Plg agregado
- 2.- $[Plg]$ = Concentración de Plg a tiempo t
- 3.- A_0 = concentración del especie enzimático activa a $t = 0$
- 4.- SK_0 = Concentración de la SK agregada
- 5.- E = Concentración de la Plm a tiempo t
- 6.- S_0 = Concentración del sustrato cromogénico
- 7.- P = Concentración del producto, del sustrato cromogénico
- 8.- v_0 = Hidrólisis espontánea del sustrato

Esquema de la reacción



Condiciones limitante para el esquema de reacción:

- 1- $[Plg] \gg K_D$
- 2- $Plg = Plg_o$
- 3- $S = S_o$
- 4- $S_o \gg K_{plm}$

Desarrollo de la ecuación:

La medida del producto $P = A_{405}/\epsilon$.

La producción del producto generado por la plm (E), por el activador ($k_{cat}' = k_{cat}$) y el tampon:

$$v = dp/dt = v_o + k_{cat} \cdot [E + A_o] \quad (1)$$

Y

$$dE/dt = \frac{K_{plg} \cdot A_o \cdot [PIg]_o}{[PIg]_o + K_{PIg}} \quad (2)$$

Se integra en condiciones iniciales de $E = 0$ y $t = 0$

$$E = \frac{V_{max} \cdot [PIg]_o}{[PIg]_o + K_{PIg}} \times t \quad \text{Donde la } V_{max} = A_o \cdot K_{PIg} \quad (3)$$

y sustituyendo estos valores de E en la Ec. 1

$$V = dP/dt = v_o + k_{cat} \cdot x \left(A_o + \frac{V_{max} \cdot [PIg]_o}{[PIg]_o + K_{PIg}} \times t \right) \quad (4)$$

Reescribiendo esta ecuación para separar la variable:

$$dP = \left[v_o + k_{cat} \cdot x \left(A_o + \frac{V_{max} \cdot [PIg]_o}{[PIg]_o + K_{PIg}} \times t \right) \right] dt \quad (5)$$

Usando la condición limitante $P = P_o$ en $t = 0$ y sustituyendo A_{405}/ϵ por P, en la Ec. 5.

$$A_{405} - A_{405_0} = \epsilon \times (v_0 + k_{cat} \times A_0) \times t + \frac{k_{cat}}{2} \times \epsilon \times \frac{V_{max} \cdot [Plg]_0}{[Plg]_0 + K_{Plg}} \times t^2 \quad (6)$$

La cual tiene la forma:

$$\Delta A_{405} = v_1 \times t + \frac{v_2 \times t^2}{2} \quad (7)$$

Donde $v_1 = \epsilon \times (v_0 + k_{cat} \times A_0)$, que es la velocidad inicial, resultante de la hidrólisis espontánea por el activador. Una grafica de $\Delta A_{405} / t$ versus t , resulta en una línea recta con intercepto en v_1 en el eje de las ordenadas y una pendiente $v_2 / 2$. Los parámetros que pueden ser calculados de la pendiente son proporcionales a la tasa de activación del Plg.

$$v_2 = k_{cat} \times \epsilon \times \frac{V_{Max} \cdot [Plg]_0}{[Plg] + K_{Plg}} \quad (8)$$

De los valores de ϵ , v_0 , A_0 y v_2 , se puede calcular $k_{cat} \times \epsilon$, dividiendo los valores de v_2 por este factor da la tasa inicial de activación del Plg. Si v_0 es despreciable y A_0 es muy pequeña tal que $k_{cat} \times A_0 \times \epsilon$ es despreciable, entonces el primer termino de la Ec. 6 desaparece.

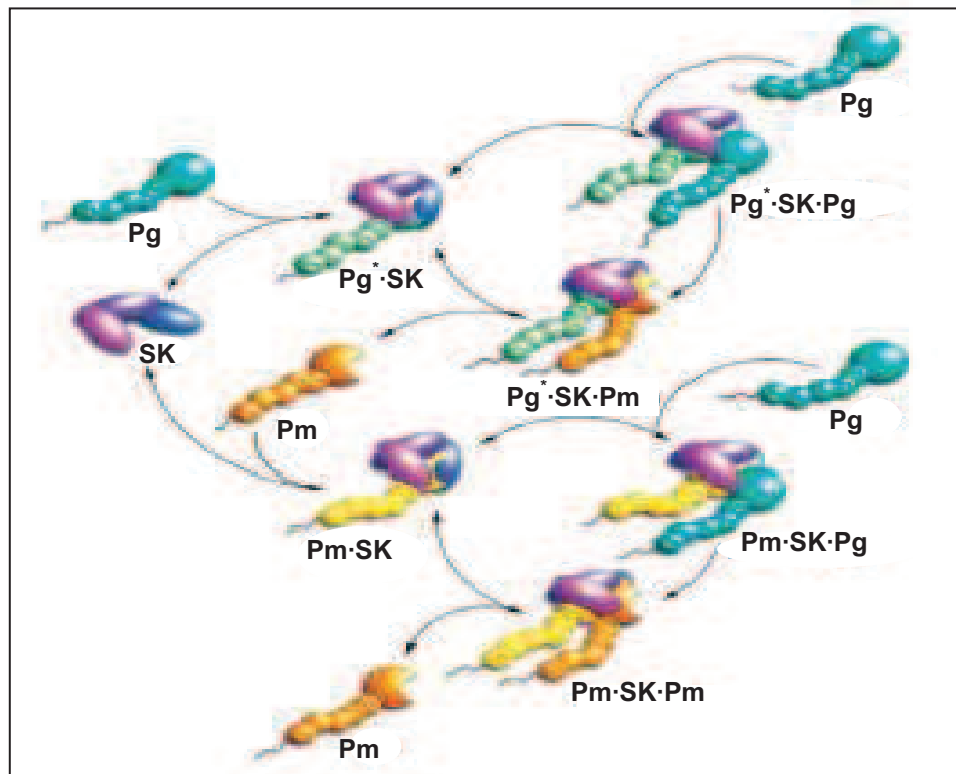


FIGURA 6: Mecanismo de acoplamiento y activación proteolítica del Plasminogeno por la Estreptokinasa (tomado de Boxrud y Bock 2004)

1.8.- *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ha llegado a ser un sistema de gran éxito para la expresión de genes heterólogo. Varios factores han contribuido a su rápida aceptación, de los cuales los mas importante incluyen:

1.- Un promotor derivado del gen de la alcohol oxidasa 1 (AOX1) de *P. pastoris* que es apropiado para el control de la expresión de genes extraños y el mismo se puede sobreexpresar (Hoop y Col. 1991)

2.- La similitud de las técnicas usada en la manipulación genética de *P. pastoris* con *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los sistemas experimentales mejor caracterizado en la biología moderna.

3.- Una fuerte preferencia de *P. pastoris* para crecer aeróbicamente lo que facilita una alta densidad en los cultivos (Cereghino y col. 2002).

4.- La decisión en 1993 de Phillip Petroleum Company de facilitar los sistema de expresión de *P. pastoris* a laboratorio de enseñanza académicas, lo que trajo como consecuencia una explosión en el conocimiento de los sistemas básicos (Higgins y Cregg 1998)

5.- Es muy eficiente para transformar (Cregg y col. 1985)

1.8.1 Metabolismo del metanol

El concepto básico de los sistema de expresión de *P. pastoris* viene de la observación de que algunas de las enzimas requeridas para el metabolismo del

metanol están presente a niveles sustanciales solo cuando las células crecen en metanol. Estudios bioquímicos muestran que la utilización del metanol requiere una vía metabólica que involucra enzimas específicas. La enzima AOX, es una flavo proteína homooctamérica, consiste en 8 sub – unidades idénticas de aproximadamente 74.000 D., cada una contiene una molécula de flavin adenin dinucleotido (FAD) como grupo prostético, cataliza el primer paso en la vía de la utilización del metanol, la oxidación del metanol a formaldehído y peróxido de hidrogeno (Figura 7). AOX se encuentra en el peroxisoma junto con la catalasa, la cual degrada el peróxido a oxígeno y agua. Una parte del formaldehído generado por AOX sale del peroxisoma y es oxidado a formato y dióxido de carbono por dos deshidrogenasas citoplasmáticas, reacciones que constituyen una fuente de energía para las células en crecimiento en metanol (Cereghino, J. y Cregg, J. 2000 y Dienys y Col. 2003).

El restante formaldehído es asimilado para formar constituyentes celulares por una vía cíclica que inicia con la condensación del formaldehído con xylulosa 5 – monofosfato una reacción catalizada por una tercera enzima peroxisomal, la dihidroxiacetona sintetasa (DHAS). El producto de esta reacción, gliceraldehido 3 – fosfato y dihidroxiacetona, salen del peroxisoma y entran en la vía citoplasmática que regenera xylulosa 5 – monofosfato y, cada 3 ciclos, una molécula de gliceraldehido 3 – fosfato. Dos de las enzimas del vía del metanol, AOX y DHAS, están presente a altos niveles en la células en crecimiento en metanol, de hecho AOX esta por encima

del 35% del total de proteínas celulares, pero no son detectables en células creciendo en otra fuente de carbón (Cereghino y Cregg 2000; Cregg y col. 1985)

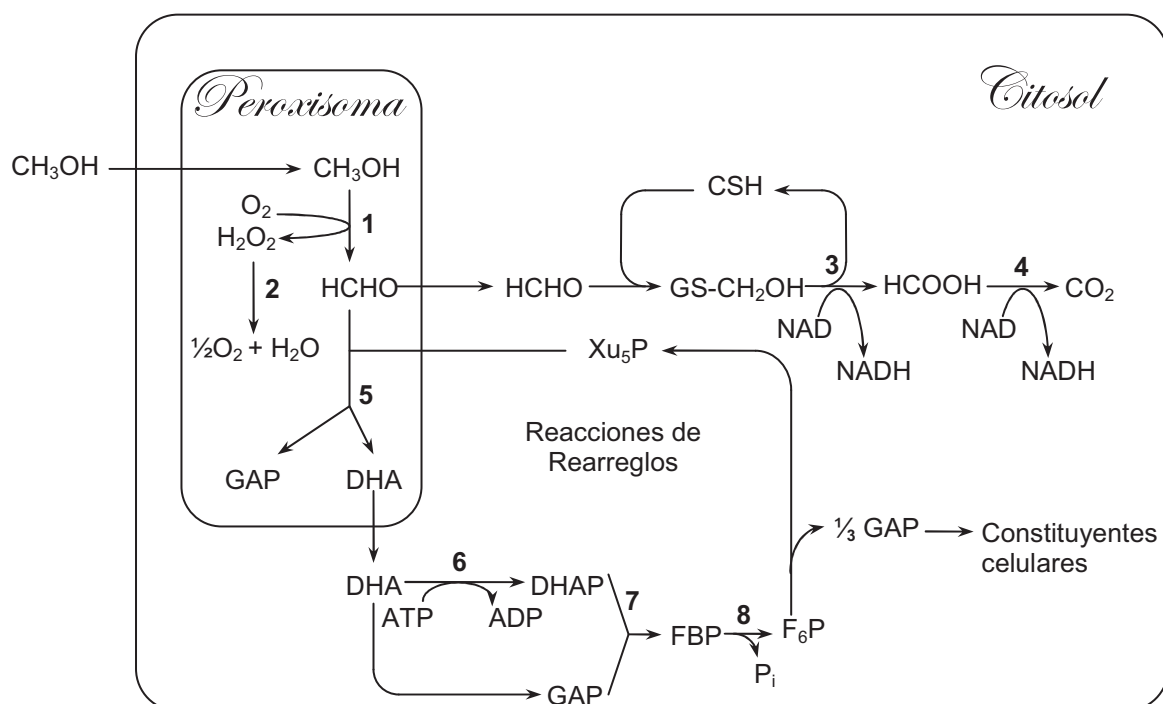


FIGURA 7: Vía del metanol en *Pichia pastoris*. 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenada; 4, formato deshidrogenada; 5, dihidroxiacetona sintetasa; 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfato andolasa; 8, fructosa 6-fosfatasa. (Tomada de Cereghino y Cregg, 2000)

1.8.2 Promotor AOXI

Hay dos genes que codifican la alcohol oxidasa en *P. pastoris*: AOXI el cual regula el 85% de la actividad en la células y AOX2. AOX es el responsable para la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa en la células (Inan y Meagher 2001). La expresión del gen AOX1 es controlada en los niveles de transcripción. En células creciendo en metanol, aproximadamente 5% del RNA es del AOX1; pero no se detecta en células creciendo en otra fuente de carbón. La regulación del gen AOX1 parece estar envuelta dos mecanismo: uno de depresión / derepresion y un mecanismo de inducción, similar a la regulación del gen GAL1 en *Saccharomyces Cerivisiae*. Probablemente la regulación de AOX, en la ausencia de una fuente de carbono que reprima, tal como glucosa en el medio, no resulta en una transcripción sustancial AOX1. La presencia del metanol es esencial para inducir altos niveles de transcripción (Cereghino, J. y Cregg, J. 2000, Rosenfeld 1998, Waterham y col. 1997).

Lo antes expuesto deja ver por que se ha escogido *P. pastoris*, como un sistema de interés para la expresión de proteínas heterologas, esa efectividad la corrobora mas de 400 proteínas que se han clonado, entre ella la SK, con un rendimiento de 77 mg/L. (Pratap y col., 2000).

2.- OBJETIVO

1. Purificar Plasminogeno de plasma sanguíneo humano
2. Verificar que la cepa de *Pichia pastoris* produce la SK-K1
3. Ver en que medio se obtiene el mayor crecimiento de *Pichia pastoris*
4. Determinar en que tiempo después de la inducción con metanol se obtiene el máximo de actividad
5. Purificar la quimera SK-K1, producida por la levadura *Pichia pastoris*
6. Caracterizar la proteína a SK-K1:
 - 6.1 Determinar el tiempo en el que se obtiene máxima producción
 - 6.2 Verificar la presencia de SK-K1 por Western Blot y Zimografía
 - 6.3 Determinar su peso Molecular en SDS-PAGE
 - 6.4 Determinar las constantes cinéticas de activación, K_{PIg} , V_{max} y K_{cat} .
 - 6.5 Determinar la K_d por la fibrina
 - 6.6 Determinar el efecto de diferentes concentraciones de fibrinogeno sobre la activación.
 - 6.7 Determinar el pH y concentración de NaCl en la cual se obtiene el máximo de actividad

3.- HIPOTESIS

El hecho de que se le haya unido a la SK el kringle 1 del Plg humano, le conferirá la capacidad de poder purificarse en un solo paso dicha proteína en una columna de Lys-sepharosa, además de unirse a la fibrina.

4.- MATERIALES

4.1.- Organismo.

Cepa de *Pichia pastoris* GS115 transformada con SK-K1

4.2.- Anticuerpos y sueros

- Anticuerpo primario anti-SK humano producido en conejo (Calbiochem, San Diego, USA)
- Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (cabra) conjugado con peroxidasa y fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St Luis, USA)

4.3.- Medios de cultivos

- Medio YPD (Yeast Peptone Dextrose)

1% de extracto de Levadura

2% de peptone

2% de glucose

- Medio MGY (Minimal Glycerol Medium)

1.34% YNB sin aminoácidos de DIFCO

1% de Glicerol

0.2 M de tampón fosfato de potasio, pH 6.0

- Medio MD (Minimal Dextrosa)

1.34% de YNB sin aminoácidos de DIFCO

2% de Glucosa

0.2 M de tampón de fosfato de potasio pH 6.0

- Medio MM (Minimal Metanol)

1.34% de YNB sin aminoácidos de DIFCO

0.5% de metanol

0.2 M de tampón de potasio pH 6.0

4.4.- tampones para la purificación de Plg humano.

- tampón de equilibración: Fosfato 0.02 M; NaCl 0.5 M; EDTA 2 mM
NaN₃ 0.001%; Aprotinina 1 µg/ml y STI (soybean Trypsin inhibitor) 1
µg/ml pH 7.4
- tampón A: fosfato 0.05 M; NaCl 80 mM; Aprotinina 1 µg/ml y STI 1
µg/ml pH 7.4.

- tampón de elusión: tampón A con ϵ -ACA (ϵ -amino-n-caproico acid) 50mM pH 7.4.

4.5.- Tampones para la transferencia de proteínas e inmunoblot.

- tampón ánodo I: Tris 0.3 M; metanol 20% pH 10,4 .
- tampón ánodo II: Tris 0.025 M; methanol 20% pH 10,4 .
- tampón cátodo: Tris 0.025 M; ϵ -ACA 0.04 M; methanol 20% pH 9.4.
- tampón de lavado: Tris 10 mM; NaCl 150 mM pH: 7,2

4.6.- Tampones y soluciones para Zimografía

- Solución 2,5 % (v/v) Triton X-100.
- tampón de lavado: 50 mM de Tris, 10 mM de NaCl pH: 7,5.

4.7.- Tampones y soluciones para SDS-PAGE

- Solución de Acrilamida 30 %: 29% de Acrilamida y 1% de N,N '-Metilbisacrilamida.
- tampón del gel concentrador: 1,0 M Tris-HCl pH: 6,8.
- tampón del gel de resolución: 1,5 M Tris-HCl pH: 8,8.
- Solución de SDS 10% (p/v).

- tampón de Carga: SDS 2% (p/v), Azul de Bromofenol 0,1% (p/v), Glicerol 10% (v/v), 100 mM β -mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl pH: 6,8.
- tampón Tris-Glicina: 250 mM Glicina, 0.1% SDS (p/v), 25 mM Tris-HCl pH: 8,3.
- Solución de persulfato de amonio: 10% (p/v) de persulfato de amonio.
- TEMED (N,N,N', N' – Tetramethyl-ethylenediamine) (SIGMA)

4.8.- Tampones y soluciones para tinción de SDS-PAGE con Azul de Comassie

- Solución colorante: 0,25 % (p/v) de Azul de Comassie R250, 45 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético glacial.
- Solución Decolorante: 45 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético glacial.

4.9.- Tampones y soluciones para tinción de SDS-PAGE con Nitrato de Plata

- Solución de lavado: 30 % etanol y 10 % Ácido acético.
- Solución fijadora: 75 ml de etanol, 17 gr de Acetato de Sodio, 1,25 ml de Glutaraldehído (25% p/v), 0,32 gm de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y Agua hasta un volumen final de 250 ml.

- Solución de tinción con plata: 0,5 gr. de AgNO_3 , 50 μl Formaldehído (37% p/v) y agua hasta un volumen final de 250 ml.
- Solución de revelado: 7,5 gr. de Na_2CO_3 , 30 μl de Formaldehído (37% p/v) y agua hasta un volumen final de 300 ml, pH < 11,5.
- Solución Stop: 3, 65 gm de EDTA en 250 ml de Agua.

4.10.- Tampones y soluciones para la preparación de fibrina acoplada en fase sólida

- tampón A: 0.05 M de tampón fosfato de sodio, pH 7.4, 0.08 M NaCl
- tampón B: 0.05 M fosfato de sodio, ph 6.8, 0.08 M NaCl.
- Solución de activación de placas NUNCLON™: 2,5 % de glutaraldehido en 0.1 % de tampón bicarbonato de sodio (pH 9.5).
- Solución de fibrinogeno: 0.3 μM de fibrinogeno en 0.1 M de tampón fosfato de sodio, pH 7.4, conteniendo 1 mM CaCl_2 .
- Solución de Trombina humana: 1 NIH U/ml de trombina en tampón A, conteniendo 0.1 % BSA, 1mM CaCl_2 y 0.01% Tween 20.
- tampón de lavado: 5 mM de fosfato de sodio (pH 6.8), conteniendo 0.5 M NaCl y 0.05% Tween 20.
- tampón de ensayo: tampón A, conteniendo 0.2% BSA y 0.01% Tween 20.

- tampón de mantenimiento: tampón B, conteniendo 0.02 M L-lisina, 0.1% BSA, y 0.01% NaN_3 .
- tampón de enlace: tampón B conteniendo 0.4% BSA y 0.01% Tween 20.

4.11.- Tampones para determinar pH optimo

- tampón Glicina-HCl, pH 3.0 y 3.5. 50 mM
- tampón Acetato, pH 4.0 – 5.5. 50 mM
- tampón Fosfato, pH 5.5 – 7.0. 50 mM
- tampón Tris-HCL y de pH 7.5 – 8.5. 50 mM
- tampón Glicina-NaOH, pH 9.0 – 10.0. 50 mM

4.12.- Sustrato sintético

- H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)

4.13.- Membranas

- Inmobilon –P, para Proteínas, MILLIPORE
- Bolsas de Diálisis , 23 mm. Poro: 12.000. (SIGMA)

4.14.- Equipos

- Baño termostataado, Memmer 854

- pHmetro, Termo. Orion 410A+
- Cámara de Electroforesis para geles de poliacrilamida, BIO-RAD, Mini PROTEAN^R 3 Cell.
- Cámara Húmeda
- Lector de Microplacas, BIO-TEK Instruments, Inc. EL_X808
- Espectrofotómetro, Agilent 8453
- Centrifuga de mesa, IEC Model CL
- Centrifuga, IEC PR-7000
- Microcentrifuga , Eppendorf 5413
- Equipo de Semisecado para Blotting, IMMTM – 1 – A
- Balanzas, METTLER AJ180 y BB1300
- Material de vidrio: tubo de ensayos, fioles, pipetas, vasos de precipitado, cilindros graduados, varillas, columnas.
- Micropipetas: p-2, p-10, p-20, p-100, p-200, p-1000 y p-5000.
- Material plástico: placas de microtitulación, tubos falcon (15 y 50 ml), tubos de microcentrifugas 1.5 ml y 0.2 ml, puntas para micropipetas y jeringas.
- Scanner ScanJet 3200C (Hewlett Packard)
- Neveras 4°C y – 20°C
- Colector de Fracciones FOXY 200
- Secador de geles, BIO-RAD, Model 543

5.- MÉTODOS

5.1.- Purificación de Plasminogeno

El Plg fue purificado a partir de plasma humano fresco, obtenidos del banco de sangre del hospital universitario de los andes utilizando un método de purificación estandarizado en LABIOMEX basado en la metodología de Deutsch y Mertz, 1986

Al plasma se le agregó la siguiente mezcla de inhibidores: aprotinina 1 $\mu\text{g/ml}$, EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid) 2 mM, Benzamidina 4 mM, NPGB (*p*-nitrofenil-*p*-guanidinobenzoato) 10 μM , PMSF (*phenylmethsulfonyl fluoride*) 2 mM. Este plasma fue pasado dos veces por una columna L – lisina Sepharose 4B (10.5 cm x 4.3 cm) previamente equilibrada con tampón de equilibración a 4 °C y a un flujo de 0.6 ml/min. La columna fue lavada con 5 volúmenes del mismo tampón a un flujo de 0.6 ml/min. A continuación se realizo un lavado con 5 volúmenes de tampón A utilizando el mismo flujo. El plasminogeno unido a la columna fue eluido con tampón de elusión. Fracciones de 4 ml fueron colectadas en tubos de ensayo esterilizados y se les midió la $\text{Abs}_{280\text{nm}}$ con el fin de determinar la concentración de proteínas presente en cada muestra. Las fracciones que presentaban mayor absorbancia a 280 nm fueron reunidas como una sola. Posteriormente se procedió a precipitar el Plg obtenido con sulfato de amonio al 55% por 18 horas a 4 °C. El precipitado obtenido fue recuperado por centrifugación a 4500 rpm por 30 minutos a

4 °C, luego fue resuspendido en un volumen mínimo y se depositó en una columna Sepharosa 6B (37 cm x 3 cm) equilibrada con tampón A a 4 °C. La columna fue lavada a un flujo de 0.27 ml/min. recogiendo fracciones de 4 ml. La Ab_{280nm} fue nuevamente determinada reuniéndose en una sola fracción aquellas que presentaron los valores mas altos, precipitándose luego el Plg de la manera antes descrita. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 4500 rpm por 30 minutos a 4 °C y resuspendido en tampón tris-HCl 50 mM pH: 7.5 y dializado contra el mismo tampón por 24 horas a 4 °C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas de la preparación y las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a - 20 °C para su uso posterior. Con el fin de determinar la pureza del Plg obtenido, se realizó una SDS - PAGE al 12%. Igualmente se determino la actividad del Plg incubando muestras del mismo con el sustrato cromogénico para la Plm, S-2251, por una hora a temperatura ambiente. La constancia de los valores de Ab_{405nm} permitió confirmar la ausencia de la forma activa del Plg. Para determinar la concentración del Plg se le midió la DO_{280nm} y se uso el coeficiente de extinción molar ($E = 16.8$ para una solución al 1% y un paso de luz de 1 cm).

5.2.- Determinación de la actividad de STK-K1 en *Pichia pastoris* por

Overlay Caseína Plasminogeno

Se cultivó durante 18 horas una colonia de *Pichia pastoris* en medio mínimo dextrosa, se tomo 0.1 ml del cultivo y se hicieron diluciones seriada desde

1×10^{-1} hasta 1×10^{-7} . De cada una de las diluciones se tomo 0.1 ml y se vertió en placas de petri conteniendo medio mínimo metanol en agar, se esparció uniformemente sobre la misma con un rastrillo de vidrio, se incubo por 120 horas a 30 °C, cuando las colonias tenían un diámetro de 1 – 2 mm. Se tomo la placa donde las colonias estuvieran nítidamente separada, y se vertió sobre ellas una mezcla que contenía 0.8% de agarosa, 8% de caseína y 2 μ M de Plg humano, de manera de formar una película blanca de 1 – 2 mm de espesor. Una vez solidificada la mezcla sobre la superficie de agar, la placa fue invertida e incubada a 37 °C por 12 h. transcurrido este tiempo se veía la formación de un halo de caseinólisis.

5.3.- Determinación del medio en el cual se obtiene mayor crecimiento de *Pichia pastoris*

Para ello se tomaron tres colonia de *Pichia pastoris* y con cada una de ellas se hizo un pre-inoculo en tres medios diferentes, YPD, MGY y MD, se incubo 18 h a 30 °C, con una agitación de 200 rpm. Cada pre-inoculo se agregó en una fiola conteniendo cada una un litro de medio, se incubaron a 30 °C y cada hora se tomó una muestra de 1 ml la cual se le mide la DO_{600nm} , esto se hizo por un espacio de 24 h o hasta que se alcanzara la fase estacionara. Cada uno de los valores se graficaron versus el tiempo.

5.4.- Determinación del tiempo en el cual se obtiene mayor producción de SK-K1 expresada por *Pichia pastoris*

Se cultivo un litro de medio, *Pichia pastoris* recombinante por un espacio de 24 h en medio MD, se centrifugo a 4500 rpm por 15 min. Se tomo el pelet y se resuspendió en 250 ml de tampón de lavado, una vez mas se centrifugo y se repitió esto dos veces, finalmente el pelet fue resuspendido en 50 ml de medio MM, se incubó a 30 °C y una agitación de 150 rpm, se tomaron muestras de 1 ml cada 12 horas a las cuales se le mide la actividad SK, cuando esta aparece las muestras se toman cada 6 h, las muestras fueron tomadas por un espacio de 120 h, cada 12 horas al medio se le agrega 0.5% de metanol. La actividad fue seguida con el sustrato cromogénico V0882 y además se usaron placas de caseína plg. Los valores de actividad se grafican versus el tiempo y la placa de caseína fue digitalizada con un scanner.

5.5.- Ensayo de actividad en placas de caseína plasminógeno

Se elaboran placas de caseína Plg de 3-4 mm de espesor en placas de petri o tapas de placas para ELISA. Para ello se elaboro una mezcla de agarosa al 0.8%, caseína 8%, 2 μ M de Plg y 0.01% de NaN₃. Esta se vierte sobre una placa, al solidificarse, con la ayuda de un sacabocado, se perforan pozos sobre la superficie de

la placa y en cada uno de ellos se agrega 10 μ l de la fracción a ensayar. La placa se incubó 12 h a 37 °C.

5.6.- Purificación de SK-K1 producida por *Pichia pastoris* recombinante

Se cultivó en dos litros de medio MD, un inoculo de *Pichia pastoris* recombinante por un espacio de 24 h, se centrifugó a 4500 rpm por 15 min. Se tomó el pellet y se resuspendió en 250 ml de tampón de lavado, una vez más se centrifugó y se repitió esto dos veces, finalmente el pellet fue resuspendido en 100 ml de medio MM, se incubó a 30 °C y una agitación de 150 rpm, cada 12 h se le agrega un ml de metanol, transcurrido 72 horas el cultivo se centrifuga por espacio de 15 min. a 4500 rpm, el sobrenadante se toma y se le agrega 1 mM de PMSF y 1 mM de EDTA y se coloca a 4 °C, se pasa dos veces por una columna de L – lisina Sepharose 4B (1.6 cm. x 4.0 cm.), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 4°C y un flujo de 0.6 ml/min., la columna fue lavada con 5 volúmenes del mismo tampón usado para equilibrarla a un flujo de 0.6 ml/min. La SK-K1 unida a la columna fue eluida con tampón de equilibración más 4 M de urea. Fracciones de 1 ml fueron colectadas en tubos eppendorf esterilizados y se les midió la Abs_{280nm} con el fin de determinar la concentración de proteínas presente en cada muestra. Las fracciones que presentaban mayor absorbancia a 280 nm fueron reunidas como una sola. Posteriormente se procedió a concentrar la muestra colocándola en una bolsa de diálisis y agregándole exteriormente polietilén glicol 20000 esto se dejó hasta que el

volumen dentro de la bolsa de diálisis fuera 10 veces menor que el inicial. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas de la preparación y la muestra fue almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior. Con el fin de determinar la pureza de la SK-K1 obtenida se hizo una SDS – PAGE al 12%. Igualmente se determinó la actividad incubando una muestra con el sustrato cromogénico para la Plm, V-0882, y siguiendo el progreso de la reacción espectrofotométricamente a una DO de 405 nm. Los valores de $\text{DO}_{405\text{nm}}$ permitieron confirmar la presencia de SK-K1. Para determinar la concentración se midió la cantidad de proteínas por medio del método Bradford. A las fracciones se le hizo la prueba de halos de caseína.

5.7.- Transferencia de proteínas e inmunoblot.

Con el fin de determinar la antigenicidad de la SK – K1 se procedió a realizar un inmunoblot. La muestra fue separada en SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras y las electrotransferencias se realizaron a membrana de nitrocelulosa utilizando el método Western blot semi seco (Figura 8).

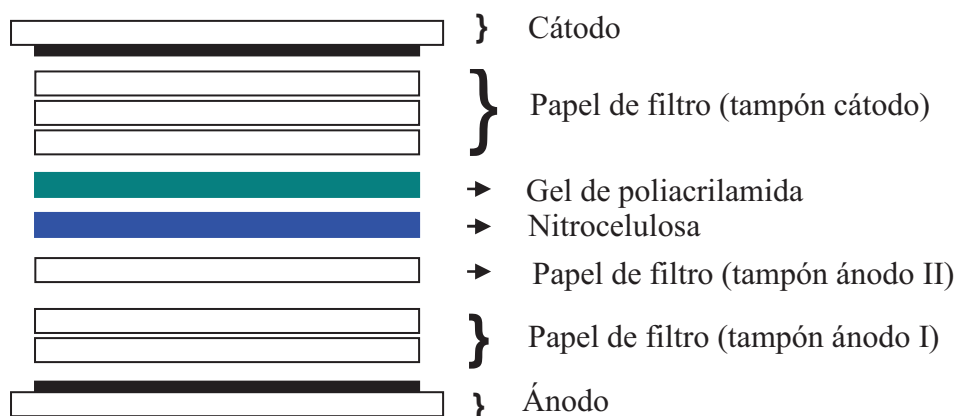


FIGURA 8: Esquema de transferencia de proteínas por Western blot

Luego de la transferencia y el posterior bloqueo el cual consiste en agregar el tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 y 0,9% de NaCl y 1% de Albúmina Bovina, las membranas se incubaron durante una hora con tampón de bloqueo y el anticuerpo primario anti-SK (conejo) a temperatura ambiente. Se lavo 2 veces con tampón de lavado por 10 seg. cada lavado. Seguidamente se incubó la membrana en tampón de bloqueo mas el anticuerpo secundario anti-IgG de Conejo (cabra) acoplado a la fosfatasa alcalina por una hora a temperatura ambiente. Se lavo dos veces por 10 segundos con tampón de lavado y posteriormente se revelo con 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT).

5.8.- Zimografía

La muestra fue separada en SDS-PAGE al 12% en condiciones no reductoras. Una vez realizada la electroforesis de la muestra de SK-K1 y SK como control, el gel fue lavado por 30 min. con una solución acuosa de Triton X-100 con la finalidad de eliminar el SDS presente en este (Lacks & Springhorn 1980) y posteriormente el Triton X-100 era eliminado mediante 3 lavados de 10 min. con el tampón de incubación. Finalmente el gel fue colocado sobre una placa de caseína plg. (Overlay) y colocada en una cámara húmeda a 37°C por 12 horas hasta que apareció el halo de caseinólisis sobre la placa. La placa fue digitalizada con un scanner.

5.9.- Determinación del peso molecular de SK-K1

La muestra fue separada en SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras además se corrió una escalera de peso molecular, es un kit de Sigma, MW-SDS-200 (fosforilasa b de músculo de conejo 97.400 dalton, albúmina bovina 66.000 dalton, albúmina de huevo 45.000 dalton, gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa de músculo de conejo 36.000 dalton, Anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos 29.000 dalton, Inhibidor de tripsina de soya 20.100 dalton y α -Lactalbumina de leche bovina 14.200 dalton). El gel fue revelado con el método nitrato de plata, se mide la distancia recorrida del tinte de frente desde el inicio del gel separador (dt), seguidamente se mide la distancia recorrida por cada banda de la escalera de peso molecular desde el inicio del gel separador (de); luego se obtiene la relación, dt/de , para obtener la razón de migración de cada banda (Rf). Se calcula el Logaritmo del peso molecular de la escalera y este se grafica versus el Rf, se tira una línea de regresión. Se calcula el Rf de la SK-K1, el valor obtenido se extrapola hasta la línea de la gráfica y se busca el logaritmo inverso al valor correspondiente en el eje de y, para determinar el peso molecular.

5.10.- Determinaciones cinéticas, K_{PIg} , V_{Max} y k_{cat}

Cinéticas de activación del plasminogeno fueron realizadas utilizando el sustrato sintético de la plasmina H-D-Val-Leu-Lys-pNA (V-0882) (Friberger y col.,

1978). Este sustrato no se hidroliza espontáneamente a pH 7.5 a 37 °C y su coeficiente de extinción molar es de 3840 M⁻¹cm⁻¹ a 405 nm (Coutto y Col., 2004). Fue disuelto en agua desionizada a una concentración stock de 3 mM y empleado en los ensayos de cinéticas a una concentración de 0.3 mM. El ensayo se llevó a cabo en placas de microtitulación en un volumen final de 100 µl, en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. El activador fue agregado de primero en la mezcla de reacción, el plasminogeno fue agregado de último a una concentración de 1,625; 1,083; 0,8125; 0,5417; 0,203 y 0,1015 µM respectivamente. La variación de absorbancia fue monitoreada en un lector de microplacas a 405 nm, cada minuto por espacios de 1 a 2 h. Los datos fueron tomados de las curvas de progreso de activación y graficada como ΔAbs₄₀₅ versus t². Una línea recta fue obtenida en todos los casos, cuya pendiente es igual a b/2. La ecuación para las condiciones de sustrato usado en este estudio fue:

$$v_2 = k_{cat} \times \epsilon \times \frac{V_{max} \cdot [PIg]_o}{[PIg]_o + K_{PIg}}$$

A partir del inverso de la ecuación y la curva tipo Lineweaver-Burk se obtiene la V_{max}, K_{plg} y k_{cat}. El procedimiento es el mismo que se hace para una cinética tipo michaeliana.

5.11.- Preparación del soporte de fibrina fase sólida y determinación de la K_D de SK-K1 por fibrina

La activación de placas NUNCLON™ de 400 µl cada pozo, se hizo para acoplar el fibrinogeno, de acuerdo a Angles-Cano 1985.

Para producir puentes estables polyvinyl cloro (PVC) derivados de polyglutaraldehydos (PVG), se agregó 100 µl por pozo de solución de activación, la placa se selló e incubó por 2 h a temperatura ambiente. El exceso de solución de activación fue descartado y lavado 3 veces con agua desionizada, entonces se agregó 100 µl por pozo de solución de fibrinogeno, la placa se selló y fué incubada 18 h a 4°C, para permitir la formación de la unión cruzada fibrinogeno-placa, el exceso de fibrinogeno fue removido y la placa fue lavada 3 veces con tampón A. posteriormente se agregó por pozo 100 µl de solución de trombina humana, nuevamente la placa se selló e incubó por 30 min. a 37°C, el exceso de trombina se descarta y los puentes fibrina-trombina son eluidos con tres lavados con tampón de lavado, la placa fue secada y se le agregó 100 µl por pozo de tampón B. Finalmente la placa se selló y guardó a 4 °C para su posterior uso. Para descartar todo el contenido dentro de los pozos en cada uno de los pasos se le dió fuertes golpes a la placa sobre una superficie sólida.

Para el ensayo se tomó la placa conteniendo la fibrina unida y se descartó el tampón B con que había sido guardada y lavada con tampón de enlace, se agregó por pozo 100 μl de diferentes concentraciones de SK-K1 diluida en tampón de enlace sellada e incubado por 1 h a 37 °C. Luego se descartó esa solución y la placa fue extensivamente lavada con tampón de ensayo y los puentes SK-K1-fibrina fase sólida fueron determinados por agregar tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5, sustrato cromogénico 300 μM y Plg 6.5 μM en un volumen final de 100 μl . El progreso de la reacción se sigue realizando lectura cada minuto por un espacio de 2h en el lector de microplacas.

5.12.- Potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de Fibrinogeno

Para cada ensayo la actividad fue medida espectrofotométricamente, se usó 0.4 μM de SK-K1, Plg 6,5 μM y 300 μM de Cromógeno y se le agrego Fibrinógeno de acuerdo a la concentración deseada (0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.1 y 0.4 μM), a cada una de las curvas obtenidas se le calculó las velocidades y estas se grafican versus cada una de las concentraciones de Fibrinógeno usado.

5.13.- Determinación del valor de concentración de NaCl (fuerza iónica) en la cual la SK-K1 expresada por *Pichia pastoris* tiene el máximo de actividad

Para cada ensayo la actividad fue medida espectrofotométricamente usando para ello 400 μM de SK-K1, 300 μM de cromógeno, 6.5 μM de Plg, tampón Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM con NaCl a diferentes concentraciones que van desde 0 μM hasta 700 μM (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 700 μM). Los valores de actividad son graficado versus las concentraciones de NaCl.

5.14.- Determinación del valor de pH en el cual la SK-K1 expresada por *Pichia pastoris* tiene el máximo de actividad

Para cada ensayo la actividad fue medida espectrofotométricamente usando para ello 0,4 μM de SK-K1, 300 μM de cromógeno, 6.5 μM y diferentes tampones de acuerdo al pH deseado. Los valores de pH probados van desde 3.0 hasta 10, con una diferencia entre cada uno de ellos de 0.5 unidades. De pH 3.0 y 3.5 se uso tampón Glicina-HCl, pH 4.0-5.5 tampón Acetato, pH 6.0-7.0 tampón Fosfato, pH 7.5-8.5 tampón Tris-HCL y de pH 9.0-10.0 tampón Glicina-NaOH. Los Valores de actividad obtenidos fueron graficado versus los valores de pH probado.

6.- RESULTADOS

6.1.- Purificación del Plg humano.

En el primer paso de la purificación, se llevo a cabo la fijación de Plg presente en el plasma sanguíneo a una columna L-lysine Sepharose 4B. El Plg fue eluido utilizando el análogo de lisina ϵ -ACA para obtener un pool constituido por las fracciones 8-26 (figura 9).

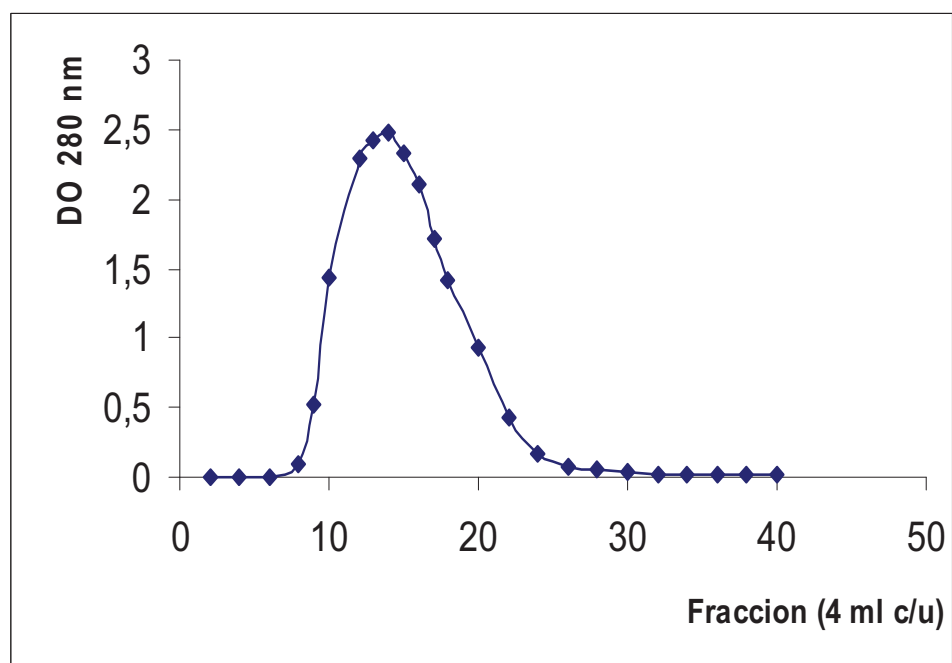


FIGURA 9: Perfil de elución en L-lysine Sepharose 4B con ϵ -ACA

Posteriormente las proteínas contenidas en este pool fueron precipitadas con sulfato de amonio y filtradas a través de una columna Sepharose 6B (figura 10). De esta columna se tomaron las fracciones 26-42 para obtener un pool que contenía al Plg.

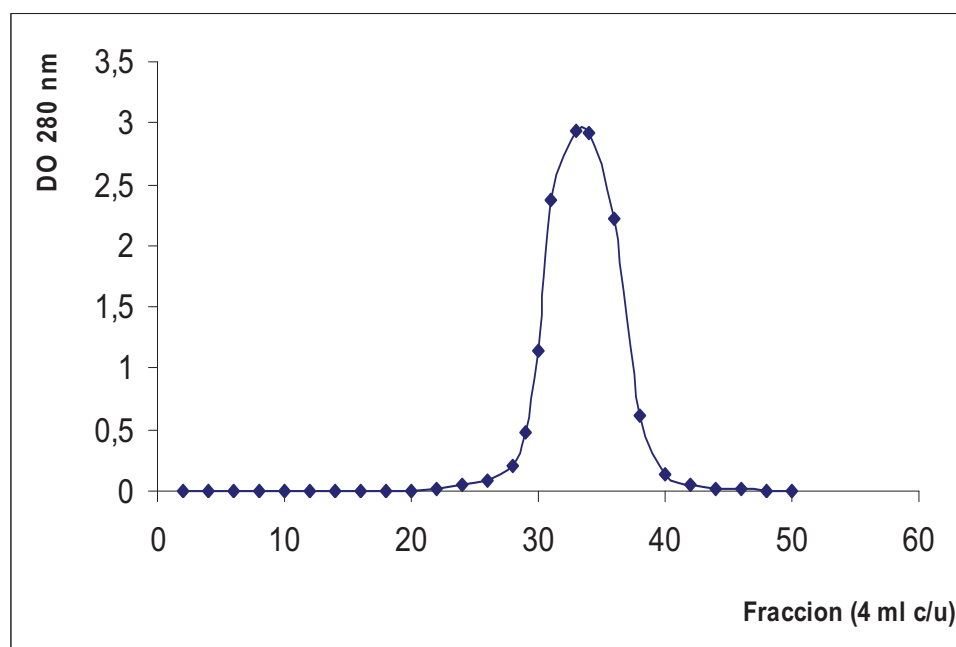
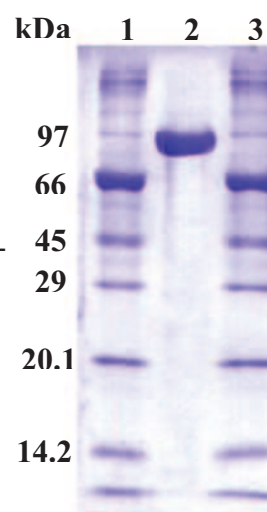


FIGURA 10: Perfil de elución del Plg en Sepharose 6B

El procedimiento de precipitación con sulfato de amonio fue repetido y luego del proceso de diálisis el Plg fue eficientemente purificado (figura 11). Todas las pruebas de Plm resultaron negativas.

FIGURA 11: SDS-PAGE al 10%. Línea 1 y 3, marcadores de peso molecular; y Línea 2, muestra de Plg purificado.



Finalmente se calculó la concentración del Plg obtenido por medio de su coeficiente de extinción molar ($E = 16.8$ para una solución 1% y un paso de luz de 1 cm.) resultando ser $65 \mu\text{M}$.

6.2.- Determinación de la producción de STK-K1 en *Pichia pastoris* por Overlay Caseína Plasminogeno.

Tras 5 días de incubación se obtuvo el crecimiento de colonias perfectamente separadas la una de las otras, en la dilución 1×10^{-5} , se vertió la mezcla caseína-Plg, obteniéndose lo que se visualiza en la figura 12.

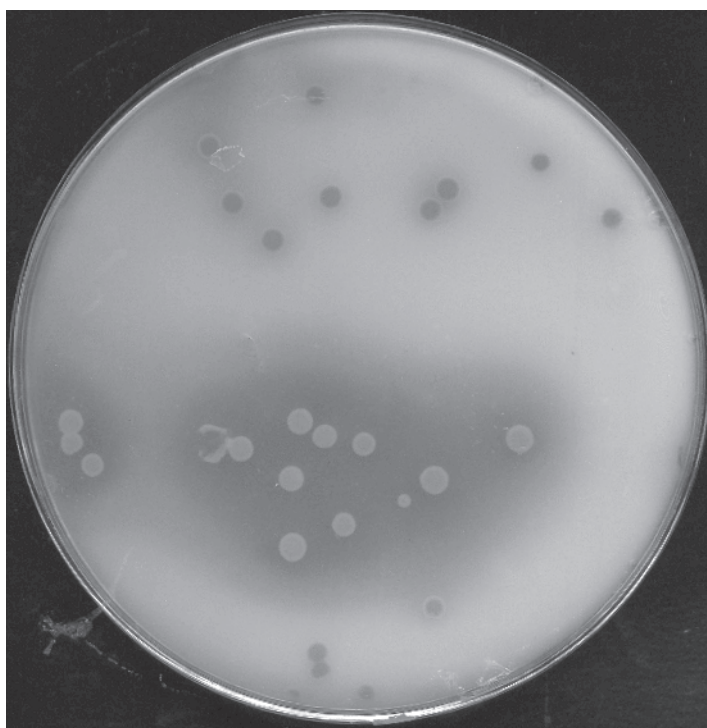


FIGURA 12: Overlay de Caseína Plasminogeno. Sobre colonias crecida en placas de MM. Para determinar si *Pichia p.* produce SK-K1

Se evidencia que todas las colonias son productoras de SK. Indicando así que el inserto SK permanece intacto en *P. pastoris*

6.3.- Determinación del medio en el cual se obtiene mayor crecimiento de *Pichia pastoris*

La grafica 13 muestra el crecimiento de la levadura *P. pastoris* en tres medio diferentes (MGY: Minimal Glycerol Medium, YPD: Yeast Peptone Dextrose y MD: Minimal Dextrose)

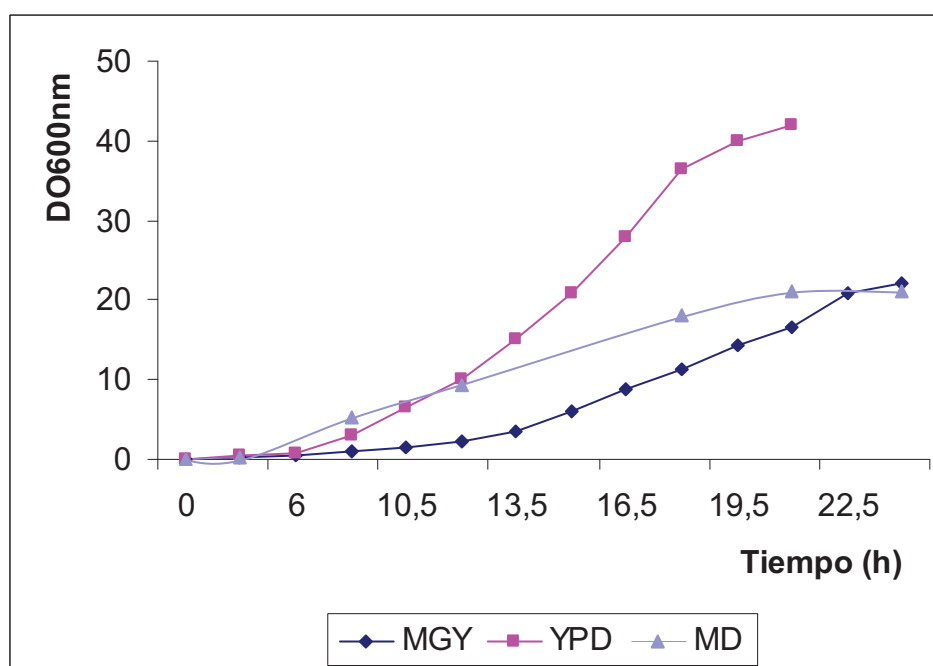


FIGURA 13: Crecimiento de *Pichia p.* en diferentes tipos de medios.

El mayor crecimiento se obtiene en el medio YPD, el cual es un medio rico. Y con los medios MGY y MD se obtiene un crecimiento similar, solo que la fase lag de MGY es mas larga que la de MD. En cada uno de los medios pasadas la 20 h. se obtiene el crecimiento máximo.

6.4.- Determinación del tiempo en el cual se obtiene mayor producción de SK-K1 expresada por *Pichia pastoris*

La figura 14 muestra la curva de actividad con respecto al tiempo, para ello se tomo una alícuota de medio (MM) a diferentes tiempos y se le midió la actividad.

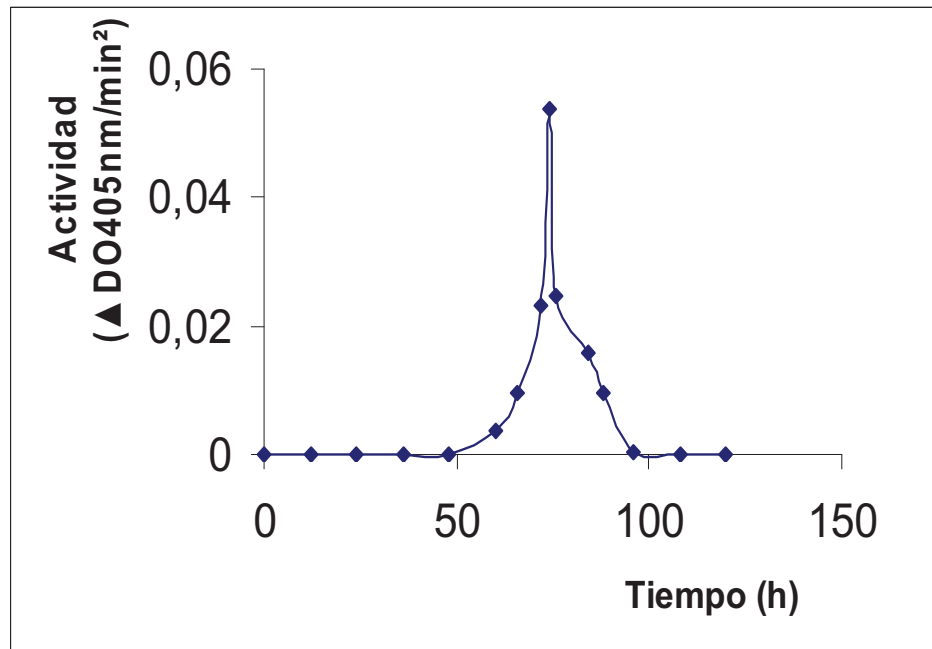


FIGURA 14: Curva de actividad SK-K1 a diferentes tiempos de incubación

La actividad se presenta 60 h. después de la incubación en MM, y progresa de forma violenta hasta alcanzar su máximo en menos de 15 horas después de haber aparecido la actividad, 74 horas desde la inducción. Tras alcanzar el máximo de actividad este comienza a descender de forma rápida hasta no haber rastro de la misma al tiempo de las 96 h. Se le midió el Ph en ese tiempo y este había descendido desde 6.5 hasta 5.

6.5.- Purificación de SK-K1

Se cultivó por un espacio de 20 h. un inoculo de *P. pastoris* recombinante alcanzando una DO de 20.2. Seguidamente tras dos lavados, se concentro unas 20 veces, obteniéndose un volumen de 50 ml y una DO de 366, este se indujo y se recolecto el sobrenadante 66 h. después.

En el único paso de la purificación, se llevo a cabo con la fijación de SK-K1 presente en el sobrenadando del cultivo en medio MM a una columna L-lysine Sepharose 4B. El SK-K1 fue eluido utilizando Urea 4 M en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para obtener un pool constituido por las fracciones 7 – 18 (figura 15).

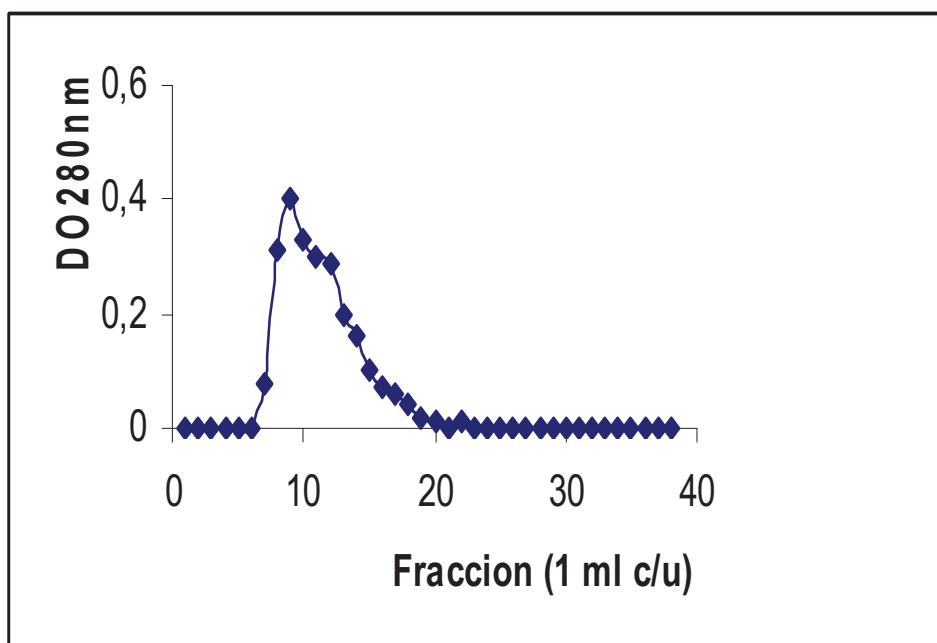


FIGURA 15: Perfil de elusión de SK-K en Sepharose 6B.

Como se nota se obtiene un solo pico. Para verificar que corresponde a SK-K1, a cada una de las fracciones se toma una pequeña muestra (10 μ l) y se vierte en unos pozos hechos sobre una placa de caseína con Plg. Figura 16

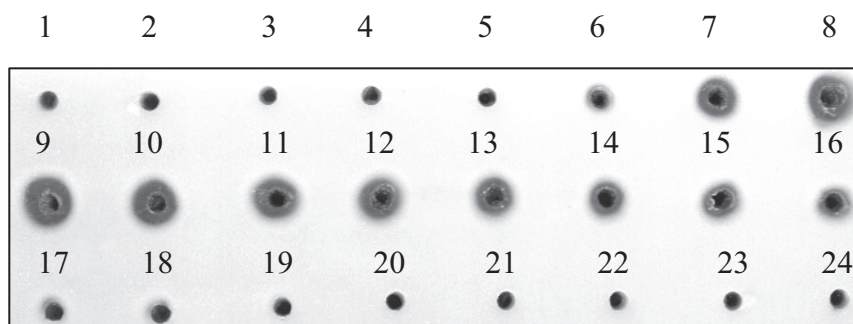
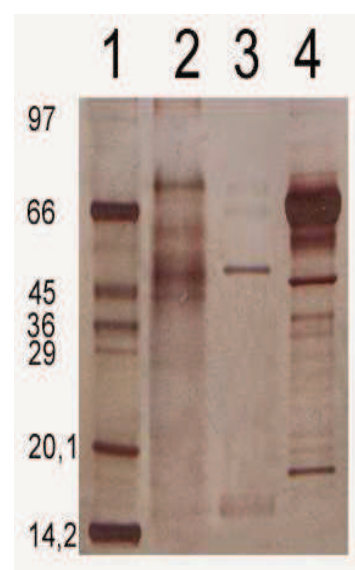


FIGURA 16: Ensayo de actividad activadora de Plg de las fracciones eluidas de la columna Lys-Sepharose. Fracciones 1 – 18

Posteriormente todas las fracciones que presentaron actividad (6 – 18), se reunieron y se obtuvo un volumen de unos 18 ml los cuales se colocaron en una bolsa de diálisis y luego se dejó concentrando con polietilén glicol 20.000, hasta obtener un volumen que aproximadamente corresponde a un décimo del inicial, 1.7 ml. Con este volumen se realizaron todas las experiencias. Inicialmente para verificar la pureza se hizo una SDS – PAGE al 12 % en estado desnaturalizante (Figura 17).

FIGURA 17: SDS-PAGE al 12 % revelado con nitrato de plata. Línea 1 Marcadores de Peso molecular, los valores presentados son kDa. Línea 2, Extracto crudo. Línea 3, Producto de la cromatografía de afinidad concentrado y línea 4, Streptase.



Teniendo la proteína purificada se procede hacer una determinación del rendimiento de SK- K1, obtenida (tabla 2).

TABLA 2: Tabla de purificación

Fracción	Volumen total (mL)	Proteínas Parciales (mg/ml)	Actividad Enzimática U/ml	Unidades Totales (U)	Proteínas Totales (mg)	Actividad específica (AE)	Factor de purificación (FP)	Rend. %
Extracto	45	0.052	571	25695	2.34	244	1	100
Lys-Sepha.	1.7	0.083	1272	2162.4	0.1411	9014.9	37	8.4

La SK-K1, se purifica en un solo paso

6.6.- Western Blot

Con el fin de verificar que la proteína purificada corresponde a SK-K1, se corrió la misma en una SDS-PAGE al 12% en estado desnaturizante. Seguidamente se transfirió la proteína a una membrana de Immobilon - P y se reveló con los anticuerpos apropiados obteniéndose lo que la figura 18 muestra.

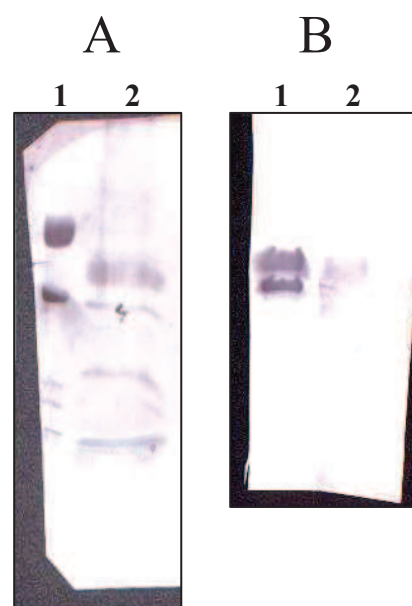


FIGURA 18: Western Blot del sobrenadante y el Purificado de SK-K1. Líneas 1^a y 1B, SK control; Línea 2^a, sobrenadante y Línea 2B, purificado de la Lys-Sepharosa.

El sobrenadante , línea 2A, además de la SK-K1, presenta otras bandas que son reconocida por el anticuerpo Anti-SK, eso puede ser producto de degradación, pero la misma no se presentan en la SK-K1 purificada, línea 2B, indicando así, que el K1, no esta presenta en las bandas del producto de la degradación

6.7.- Zimografía en Overlay

Se preparó un gel de SDS-PAGE al 12 %, pero las muestras agregadas no contenían agente desnaturizante. Tras la corrida se lavó por unos 30 min. en Tritón X-100 al 2.5 %, seguidamente se eliminó el Tritón X-100, con 3 lavados de 10 min. con el tampón de incubación, el gel se colocó sobre una placa que contenía una mezcla de caseína-Plg y se dejó incubando toda la noche en una cámara Húmeda. Obteniéndose lo que se muestra en la figura 19.



FIGURA 19: Overlay de caseína-Plg. Línea 1, Halo producido por SK-K1. Línea 2, Halo producto de Streptase.

Se nota perfectamente la diferencia de tamaño que presenta la SK-K1 con respecto a la SK comercial, siendo esta de menor tamaño.

6.8.- Determinación del Peso molecular

De la figura 17 a partir de la escalera de peso molecular se calculó las respectivas razones de migración (Rf) de cada una de las bandas y esta se grafico versus el logaritmo de los respectivos pesos moleculares. Figura 20.

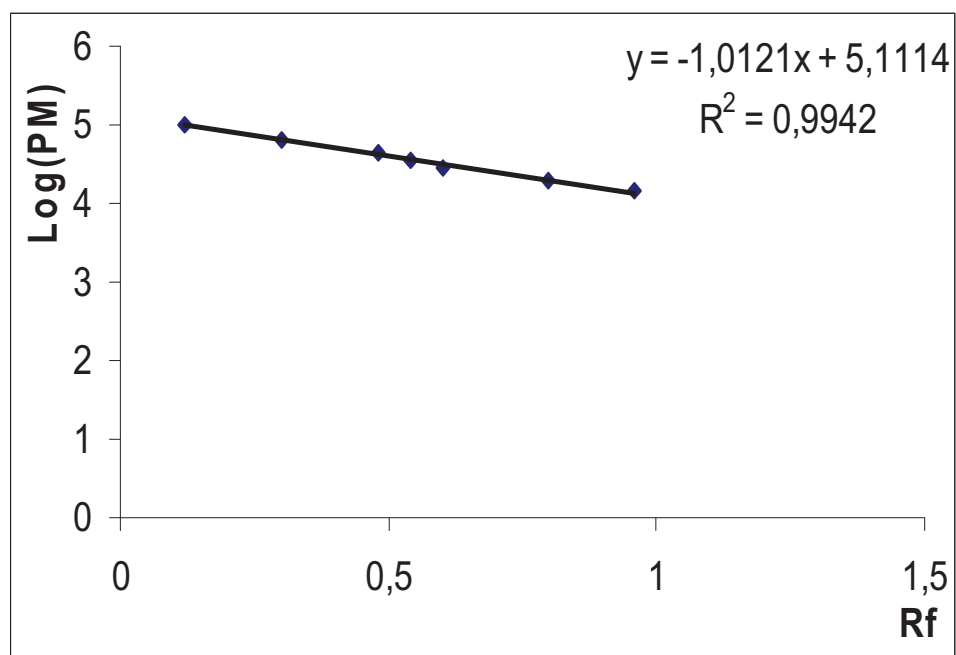


FIGURA 20: Curva de calibración para determinar pesos moleculares.

Con la Ecuación de la recta obtenida de la figura 20, $Y = -1.0121X + 5.1114$, Sustituyo el R_f para SK-K1, el cual es 0,39. y luego sacando el antiLog. Se obtiene que la SK-K1, tiene un peso de: **PM SK-K1 = 52.100 Da.**

6.9.- Cinética de SK-K1, determinación de K_{Plg} , V_{max} y k_{cat}

La figura 21 muestra el progreso de la reacción de activación de diferentes concentraciones de Plg, las cuales van desde 1,625 μM Plg a 0,1015 μM Plg, las misma están dentro del rango de la K_{Plg} .

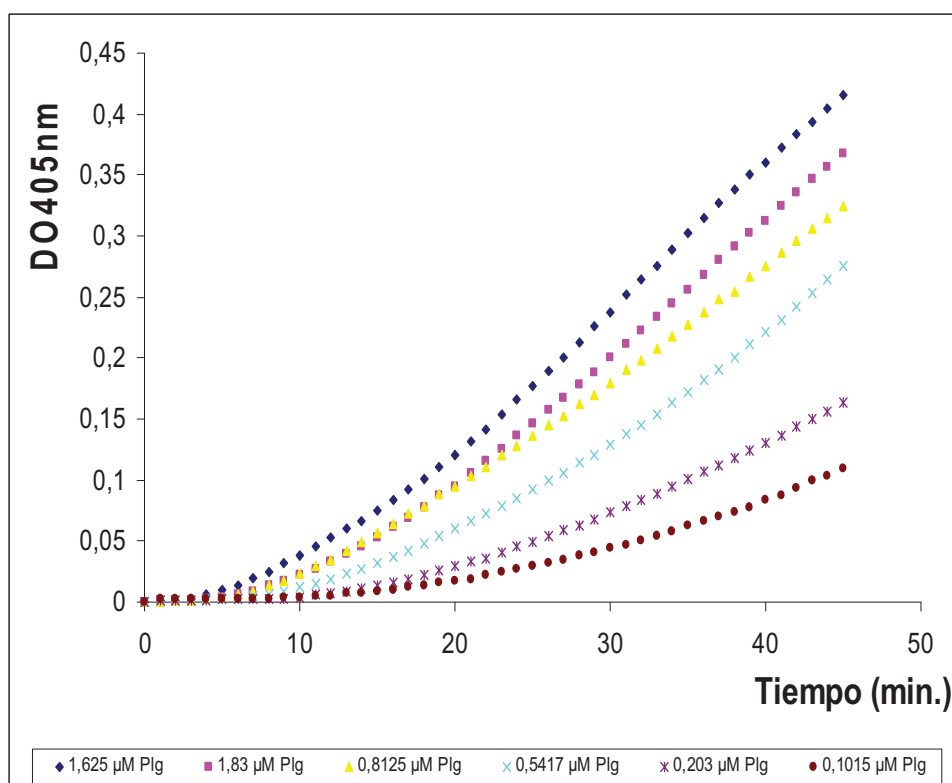


FIGURA 21: Curva de progreso de activación de plasminogeno. En todos los caso se agrego SK-K1 a concentración final de 0.02 μM y Cromógeno a 300 mM.

A partir de estos valores se construyó la figura 22 que a diferencia de la anterior, se grafica versus el tiempo elevado al cuadrado (min.^2)

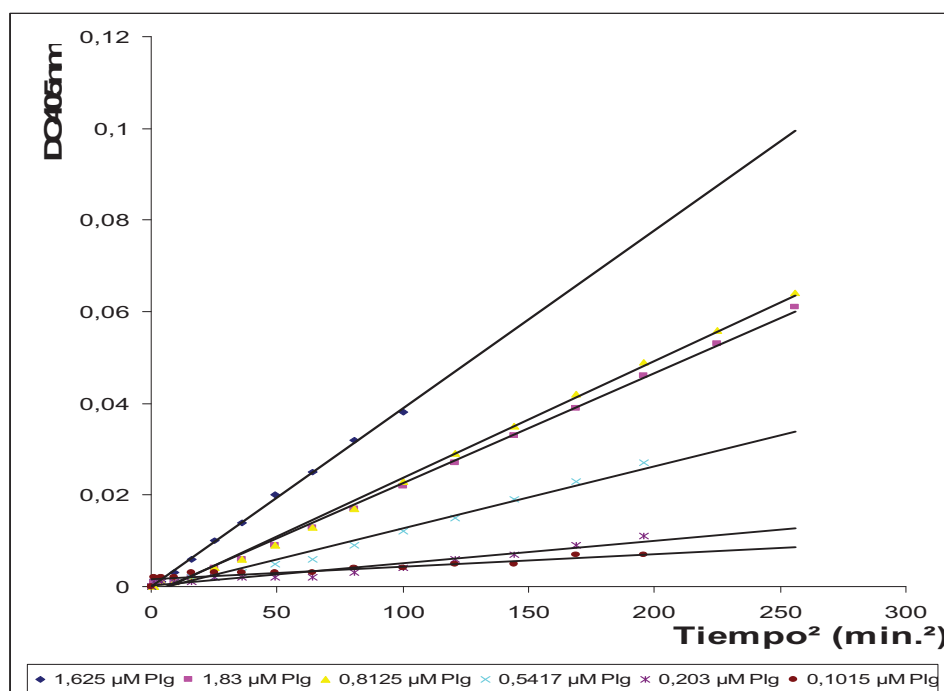


FIGURA 22: Gráfico DO_{405nm} versus T^2 . Se tomaron los datos de los primeros 10 a 15 min.

A cada una de las rectas se le calculo la pendiente, dando:

$$Y = 0.003845831 + 0.000261161 t \dots\dots\dots 1,625 \mu\text{M Plg}$$

$$Y = 0.003580254 + 0.000223214 t \dots\dots\dots 1,83 \mu\text{M Plg}$$

$$Y = 0.002754331 + 0.000190171 t \dots\dots\dots 0,8125 \mu\text{M Plg}$$

$$Y = 0.006248 + 0.000148 t \dots\dots\dots 0,5417 \mu\text{M Plg}$$

$$Y = 0.0045274 + 0.000080586 t \dots\dots\dots 0,203 \mu\text{M Plg}$$

$$Y = 0.0168 + 0.00005 t \dots\dots\dots 0,1015 \mu\text{M Plg}$$

Cada una de las ecuaciones tiene la forma:

$$\Delta A_{405} = v_1 + \frac{V_2}{2} \times t$$

Donde la pendiente corresponde a $V_2/2$, por tal motivo las pendientes obtenidas se deben multiplicar por dos y estos valores se divide por el coeficiente de extinción molar del producto del cromógeno, el cual es $3,84 \mu\text{M}^{-1}$, con el objeto de que los valores ya no queden expresado absorbancia, sino en μM de Producto. Dichas pendientes que corresponde a la velocidad de activación se grafican versus las concentraciones de Plg. Dando lo que la figura 23 muestra.

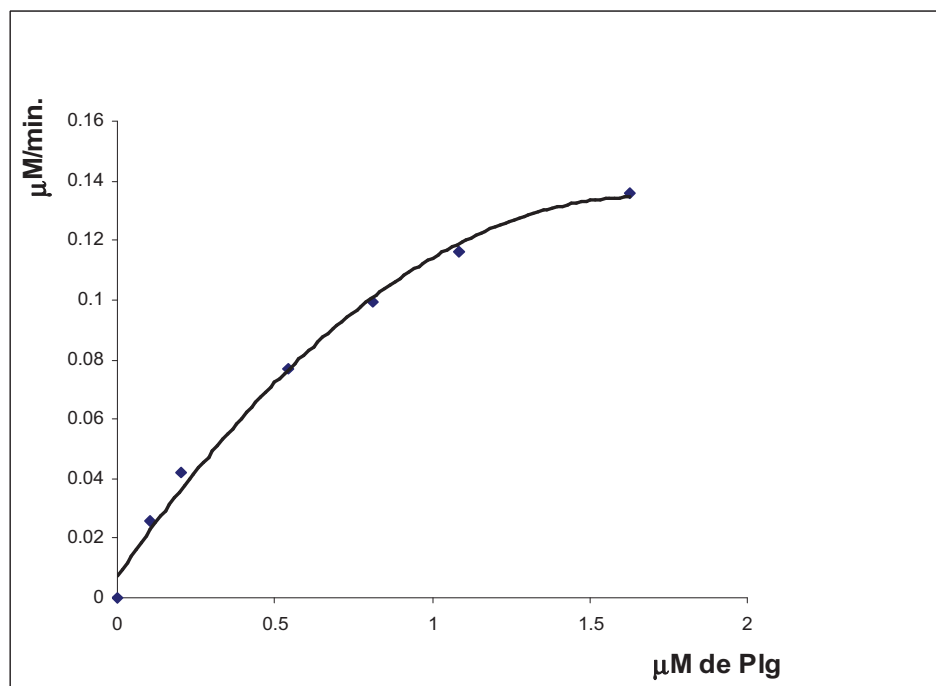


FIGURA 23: Representación de concentración de sustrato frente a velocidad inicial

La figura 23 es una hipérbola cuadrática típica de una cinética Michaeliana. Ahora se procede a graficar los recíprocos para obtener de allí los respectivos valores cinéticos (Figura 24).

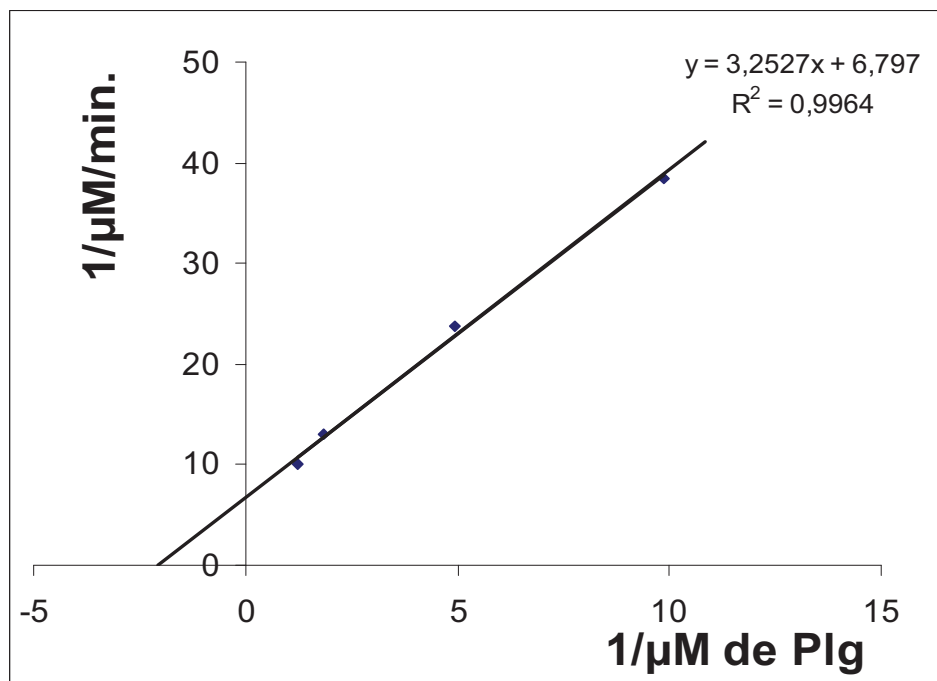


FIGURA 24: representación de Lineweaver-Burk

Como es de esperarse se obtiene una recta, y a partir de la ecuación de la misma se calculan los parámetros cinéticos. De la ec. 8 de la sección 5.10. Obtenemos los equivalentes, donde la pendiente

La $m = 3.2527$ ó

$m = K_{plg}/(k_{cat} \cdot \epsilon \cdot V_{max})$, así que en principio se obtiene es una K_{plg} aparente, pero cuando dicha ecuación se procesa los términos se cancelan y queda demostrado que:

$K_{plg\ app} = K_{plg}$ el corte en el eje de las abscisas corresponde a:

$-1/K_{pI_g} = 1/\mu\text{M}^{-1}$ de P_{I_g} , sustituyendo los valores,

Corte en eje de las abscisas

$Y = 3.2527 X + 6.797$ Sustituyendo $Y = 0$ y despejando a X , tenemos:

$$X = -6.797/3.2527$$

$$X = -2.08965 \quad X = -1/K_{P_{I_g}}, \text{ por lo tanto :}$$

$$K_{P_{I_g}} = -1/X = -1/(-2.08965) =$$

$K_{P_{I_g}} = 0.479 \mu\text{M}$

Para calcular V_{Max} Nos valemos del corte en Y , donde el inverso corresponde a un

$V_{\text{Max app}}$:

$Y = 3.2527 X + 6.797$ Hacemos a $X = 0$, entonces tendremos:

$Y = 6.797$, Recordando que $Y = 1/V_{\text{Max app}}$, Por lo tanto:

$$V_{\text{Max app}} = 1/Y = 1/6.797 =$$

$$V_{\max \text{ app}} = 0.147 \mu\text{M}/\text{min.}$$

Ahora procedemos a calcular la constante catalítica, k_{cat} .

$k_{\text{cat}} = a/\varepsilon \cdot A_0$, donde “a” corresponde a el corte en el eje de las ordenadas de la grafica 24, del cual se saca un promedio y da como resultado 0.0041 pero expresado en unidades de DO, para expresarlos en unidades de producto en μM , se divide dicho valor por el coeficiente de extinción molar, el cual es $3.84 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1}$ y da como resultado 1.067 min^{-1} . y A_0 representa la concentración de SK-K1 utilizada para los ensayos cinéticos, la cual fue de $0.02 \mu\text{M}$, así que :

$$k_{\text{cat}} = a/\varepsilon \cdot A_0 = 1.067 \text{ min}^{-1} / (3.84 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \times 0.02 \mu\text{M}) =$$

$$k_{\text{cat}} = 13893.2 \text{ min}^{-1} \text{ ó } :$$

$$k_{\text{cat}} = 231.6 \text{ seg}^{-1}$$

Con este resultado a partir de la $V_{\text{Max app}}$. Calculo V_{max} :

$$V_{\text{Max}} = 1/(k_{\text{cat}} \cdot \varepsilon \cdot \text{Corte Y}) = 1/(13896 \text{ seg}^{-1} \times 3.84 \times 10^{-3} \mu\text{M} \times 6.797) =$$

$$V_{\text{Max.}} = 0.0027 \mu\text{M}/\text{min.}$$

6.10.- Determinación de la K_D y el radio molar de enlace de SK-K1 por la fibrina

Tras dejar que la reacción progrese, por un espacio de 120 min. a diferentes concentraciones de SK-K1 en una placa de micro titulación que tiene adosado fibrina, se obtiene lo que la figura 25 muestra

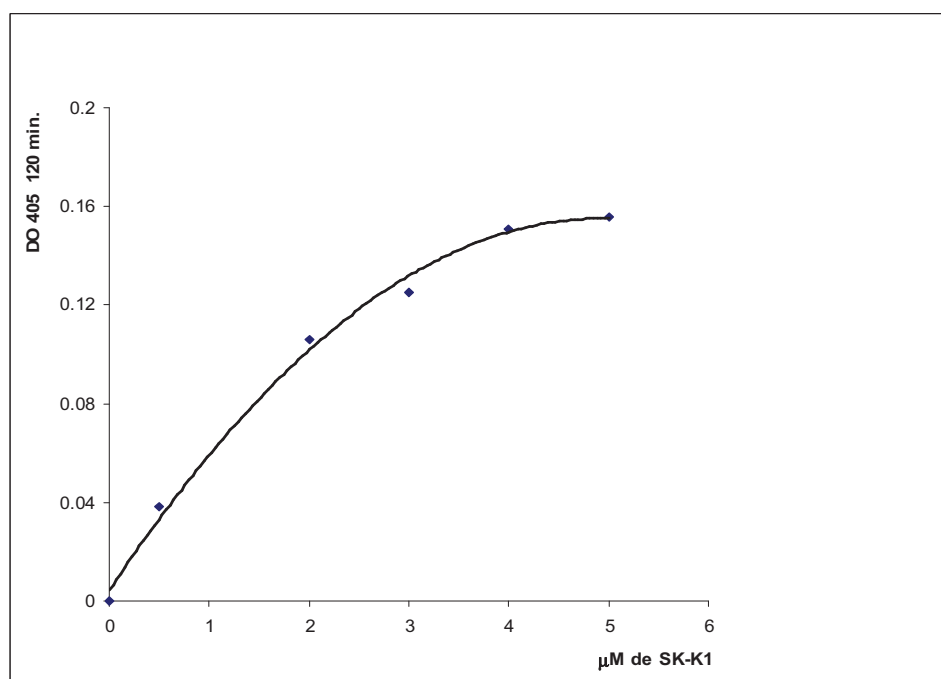


FIGURA 25: Enlazamiento de la SK-K1 a fibrina

De la figura 25 se hace una regraficación donde los valores del eje de las abscisas se representa en logaritmo, así da lo presentado en la figura 26

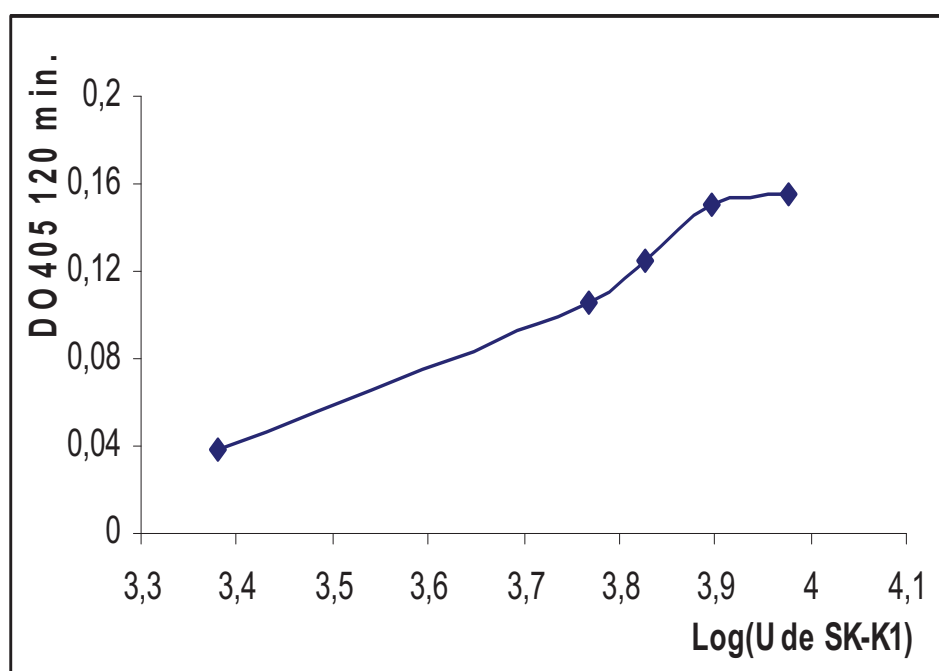


FIGURA 26: Enlazamiento de la SK-K1 a fibrina, Log (U de SK-K1) vs DO 405 120 min.

Como se esperaba se obtiene una curva la cual tiene un punto de inflexión, tal como se demuestra en el apéndice 10.3, el antilogaritmo del valor de las abscisas corresponde a la K_D , así que haciendo una extrapolación se obtiene que:

$$K_D = 0.9 \mu\text{M}$$

La concentración de fibrina enlazada a la placa se determina por la ecuación:

$$Fn/cm^2 = ([Fn] \cdot V \cdot \alpha) / S, \text{ donde.}$$

$$[Fn] = 0.3 \mu M, V = 100 \mu l, S = 121 \text{ mm}^2 \text{ y } \alpha = 0.7$$

Bajo estas mismas condiciones Angles-Cano (1986), indicó que 410 fmol/cm² se adosan a la placa. Por otro lado se determina la cantidad de SK-K1 unida a la placa de fibrina en la concentración saturante, para ello se calcula el número de unidades para la concentración de 1.5 μM de SK-K1 la cual es 1.21 U y esta se transforman en mg. Recordando que 100.000 U corresponde aproximadamente a un mg de SK, esto da 1.21x10⁻⁸ g. con el peso molecular de la SK-K1 (52.100 g/mol) se determinó el número de moles, dando 232 fmol. Sacamos la relación entre dicho valor y la cantidad de fibrina adosada en la placa se tiene:

$$\frac{\text{SK-K1 232 fmol}}{\text{Fn 410 fmol}} = \mathbf{0,56}$$

Esto indica que al menos dos moléculas de fibrina son necesarias para enlazar una molécula de SK-K1.

6.11.- Potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de Fibrinogeno

La figura 27 muestra como la actividad de la SK-K1 varia de acuerdo a la concentración de fibrinogeno.

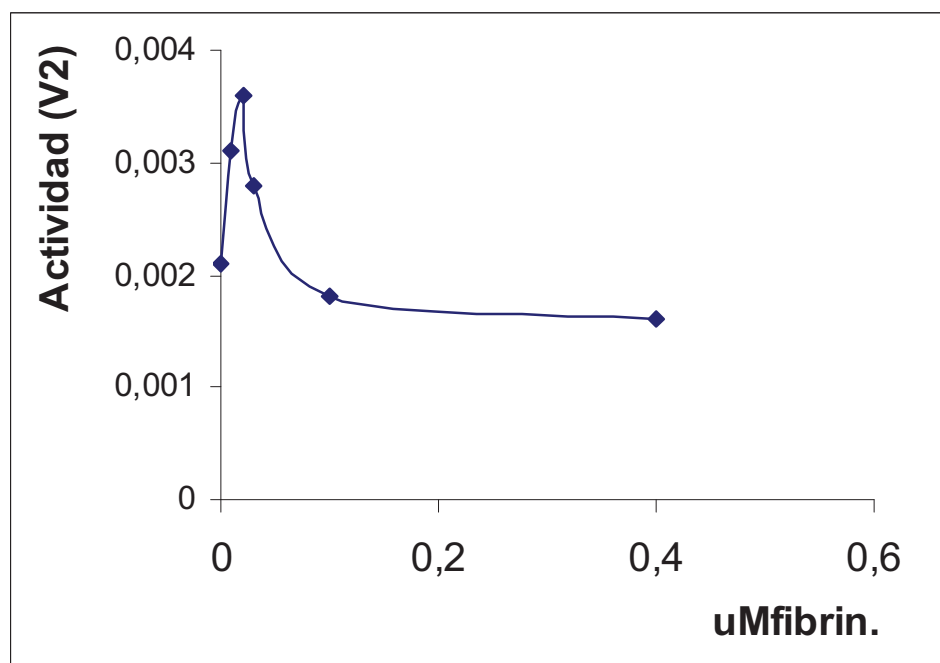


FIGURA 27: potenciación de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de Fibrinogeno.

La actividad se incrementada a partir de una concentración mayor a cero hasta 0.02 μM de fibrinogeno a partir de dicha concentración la actividad disminuye paulatinamente hasta alcanzar aproximadamente la misma en ausencia de fibrinogeno.

6.12.- Efecto de la activación del Plg por SK-K1 en presencia de NaCl

La activación de Plg Por SK-K1 sometida a diferentes concentraciones de NaCl se ve afectada a medida que la misma incrementa tal como se evidencia en la figura 28

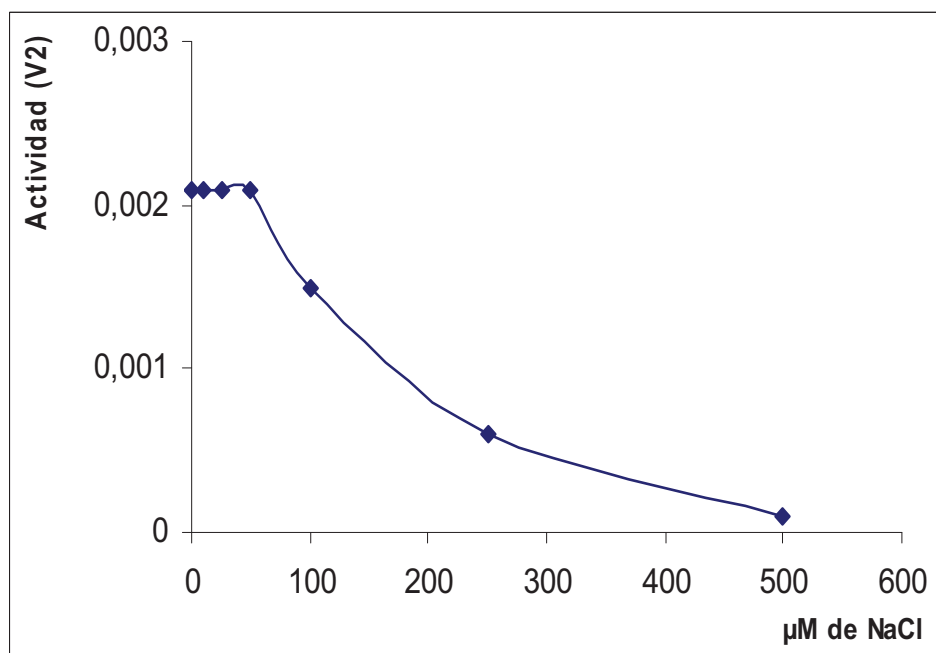


FIGURA 28: Efecto de la activación de Plg con SK-K1 en presencia de NaCl

Desde 0 a 50 μM de NaCl no parece tener ningún efecto sobre la activación de Plg por SK-K1, pero a partir de esta concentración la actividad comienza a disminuir hasta desaparecer cuando la concentración de NaCl es de 500 μM .

6.13.- Efecto de la activación del Plg por SK-K1 a diferentes pH.

Con diversos tampón se logró el pH deseado para los ensayo de activación del Plg por SK-K1, obteniéndose lo que la figura 29 muestra.

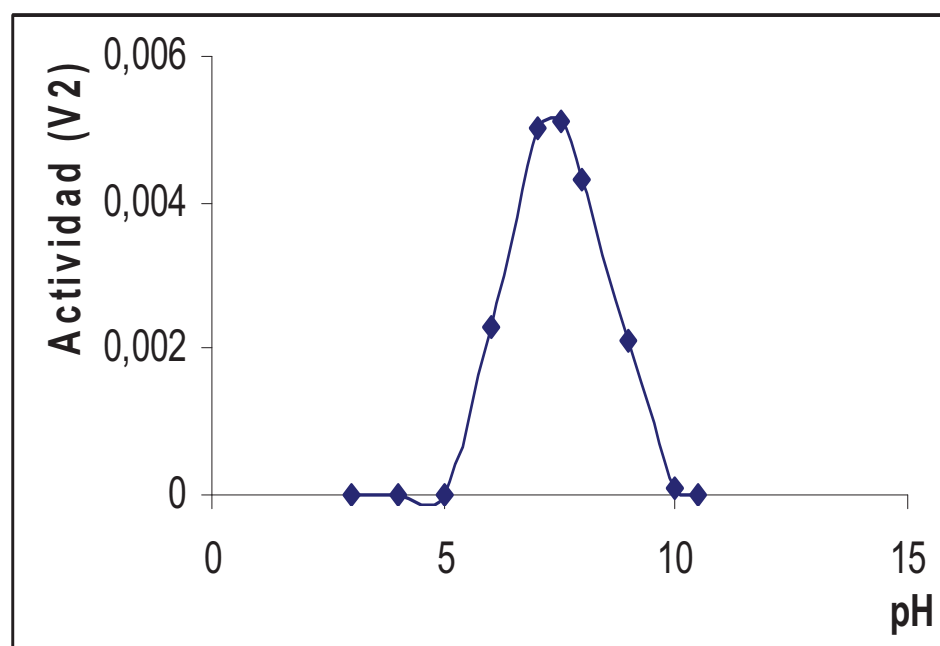


FIGURA 29: Efecto del pH sobre la activación del Plg por SK-K1

Tal como muestra la figura 29, a pH por debajo de 5 o por encima de 10 la activación es nula, pero en el rango de pH 7 a 7.5 se obtiene el máximo de actividad, decreciendo por encima o por debajo de estos valores.

7.- DISCUSION

Los agentes trombolíticos han llegado a ser la piedra angular en el tratamiento de infarto agudo al miocardio y otras complicaciones. Sin embargo, los agentes corrientes están lejos de ser perfectos, por lo que en base a modificaciones de las drogas existentes se han desarrollado nuevos agentes por lo que en el presente ya se puede hablar de tres generaciones de agentes trombolíticos (Sinnaeve y Van de Werf, 2001). La tercera generación consta en su mayor parte de agentes existentes modificados, en especial el t-PA; no obstante las proteínas de origen bacterianos en la actualidad están siendo objetos de numerosos estudios que tienen que ver con el mejoramiento que al final persigue disminuir los riesgos al ser tratado con la misma, entre ella esta la SK, la cual goza en el presente de ser el único agente que tiene la aprobación de la FDA, para tratar enfermedades del sistema vascular periférico y además en efectividad-costo es el tratamiento a elegir. Desde hace una década y media el laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), de la universidad de los andes, Venezuela, a dedicados gran esfuerzo en la obtención en gran escala de la SK y además el mejoramiento de la misma por medio de técnicas de ingeniería genéticas, por ellos se ha desarrollado una quimera SK Kringle 1, con lo que principalmente se busca disminuir los pasos de la purificación y al estar clonado en una lavadura disminuir las complicaciones que están ligadas al tratar a un paciente con dicho medicamento.

Esfuerzos conjuntos de Bastidas (2000), Buela (2002) y Mendoza (2003), han logrado obtener la quimera antes mencionada clonada en la levadura *Pichia pastoris*, pero la misma carece de una caracterización, el cual es el objeto de este trabajo.

Inicialmente para realizar todas las pruebas es necesario tener Plg de origen humano de alta pureza, con plasma humano suministrado por el Hospital Universitario de los Andes se logró purificar el Plg. Al ser pasado por la primera columna, Lys-Sepharosa, se logró aislar de allí en un pico único el Plg tal como la figura 9 hace constar, aunque existe la posibilidad que haya coeluido una lipoproteína, para ello se pasa por una segunda columna de exclusión molecular, Sepharosa 6B, de allí también se obtiene un único pico, así lo evidencia la figura 10, indicando así que el Plg está puro, cuando ese no es el caso otras purificaciones presentan dos picos en el eluido de dicha columna, esa otra proteína corresponde a una lipoproteínas, al aparecer esta, es indicio de que el plasma corresponde a una persona que tiene sobrepeso. Para corroborar que esta puro se hace una SDS-PAGE al 10% y allí se confirma de que efectivamente el Plg si esta puro, pues en la muestra que corresponde al mismo solo hay presente una banda, Figura 11. Existe la posibilidad que el Plg obtenido este activado, para descartar esa posibilidad, se incubo con cromógeno, por espacio de media hora y midiéndose la absorbancia a 405 nm no hubo cambios de la misma indicando así que el Plg es apto para las pruebas con la SK-K1, finalmente se midió la concentración del mismo siendo esta de 65 μM .

Para determinar que el inserto de SK-K1 en la levadura *Pichia Pastoris* esta presente se hizo necesario por medio de un Overlay caseína-Plg, verificarlo, siendo positivo (Figura 12), además se nota que todas las colonias presenta un halo caseinolítico mostrando así la ausencia de reversibilidad. En principio se quiere tener la mayor masa celular para obtener una mayor cantidad de la proteína de interés, esta se obtiene creciendo la levadura en medio rico YPD, tal como se muestra en la figura 13, Sin embargo al desear inducir la proteína esta no se presenta en un lapso de 5 días, por lo que se decide cambiar del medio (MD) para obtener masa celular aunque esta es menor en un 50 % , la inducción de la SK-K1, se pone al descubierto al transcurrir 54 h. tras la inducción (figura 14). Algunos trabajos indican que la inducción de proteínas heterologas cuando se parte de masa celular obtenida del medio YPD, se nota a los 12 días (Wu y Col, 2003), esto se debe tal vez que el sistema de inducción de AOX se ve reprimido por la presencia de algún componente del medio rico que no se elimina fácilmente. A las 72 h de la inducción se obtiene la máxima actividad, pero esta desciende rápidamente hasta no quedar rastro (figura 14). Aunque en un Overlay si se evidencia actividad (datos no mostrados), esta disminuye pero no tan bruscamente, el hecho que se determine ausencia de actividad usando el sustrato cromogénico se debe seguramente a que el pH descendió desde 6.5 a 5.0, esto esta en perfecta consonancia con lo que se muestra en la figura 29, donde al ver la actividad a diferentes pH justo en 5 no hay actividad.

Pruebas preliminares evidenciaron que el punto en donde hay el máximo de actividad (72 h) no es justamente el punto ideal para cosechar, en vista de que no se logra purificar nada, esto se puede deber a que el Kringle 1 que le confiere la capacidad a la SK de unirse a la columna se escindió de la misma o hubo una degradación de la proteínas, ambas posibilidades tienen fundamentos, tanto en el SDS-PAGE de la figura 17, línea 2 y en el western blot, figura 18, línea 2A, se nota que a nivel de la SK control esta presente la SK-K1 y además por debajo de la misma se nota degradación de la proteína. Por lo tanto se escogió un punto intermedio entre aparecer la actividad y el máximo, este fue a las 66 H.

El sobrenadante obtenido de la tras 66 h de inducción es pasado por la columna Lys-Sepharosa y tras lavarse se procede a eluirse con ϵ - aminocapróico pero en el eluido no se evidencias presencia de proteínas por medio de medir la absorbancia a 280 nm. Se probó con diferentes concentraciones que van desde 0,15 a 5 M, siendo fallido los numerosos intentos y finalmente se probó con un agente muchos mas fuerte, Urea a 4 M, esto parece indicar que la interacción de la proteína kimerá con la resina pudiera ser diferente a una interacción a través del los sitios de enlazamiento a lisina o que la interacción del K1 con lisina sea muy fuerte y no pueda ser desplazada con ϵ -aminocapróico. Obteniéndose lo que la figura 15 muestra, se nota un pico único y para corroborar que corresponde a SK-K1 a las diferentes fracciones se toma una pequeña alícuota (10 μ l) y se coloca en una placa de caseína-Plg notándose que todas las fracciones que presenta proteína también tienen actividad (figura 16). Al ser

reunidas todas estas fracciones en un solo pool y concentradas 10 veces, se determina su pureza por medio de una SDS-PAGE al 12 %, así se muestra en la figura 17, la línea 3 muestra la proteína purificada aunque muy tenuemente se nota 2 bandas mas, una de mayor y otra de menor tamaño que la SK-K1, por otro lado se ve que la SK-K1 es de mayor peso molecular que la SK control, dando prueba de que el K1 esta unido a la proteína. El western blot y el Zismograma, figura 18 y 19 respectivamente, dan prueba inequívoca que dicha banda corresponde a la SK-K1 y además que tras la purificación no hay degradación. El rendimiento obtenido es de 8,4 % (Tabla 2) en principio este valor es aceptable aunque se esperaría que fuera mayor por ser purificado por afinidad y ser un solo paso de purificación, pero si se toma en cuenta que la actividad en el sobrenadante no solo corresponde a la proteína SK-K1, sino también a la que no presenta el K1 y se pudiera restar esta del total y recalcular el rendimiento de seguro este aumentaría significativamente, así que un rendimiento de 8,4 % no significa baja efectividad de enlazamiento del K1 a la resina. La actividad específica de la SK-K1 es de 9014 U/mg., esto es aproximadamente 10 veces menor que la de SK, que esta alrededor de 100000 U/mg, esto es comprensible en vista de la modificación que presenta SK-K1 con respecto a SK. Si se tiene en cuenta que se partió de un litro de medio para producir masa celular y luego se concentro 20 veces para la inducción y finalmente se purifico 0,1411 mg de SK-K1, significa que por un litro de medio se obtiene 0,1411 mg/l, es decir una cantidad muy baja en comparación con lo que otros investigadores han obtenido de SK producida en *Pichia pastoris*, Hagenson y Col (1989), obtuvieron 77 mg/l. La cantidad puede ser mejorada, si se

logra que toda la SK-K1 producida permanezca intacta, otro factor que contribuiría es controlar la aireación durante la inducción y además la cantidad de metanol que se agrega poder monitoréala. La purificación de SK-K1 se puede considerar un éxito ya que solo se necesito un paso, diversos investigadores que han trabajado en la purificación de SK, bien sea producida por *Streptococcus sp.* o por otro microorganismo donde se haya clonado utilizan mas de un paso de purificación (Taylor y Botts, 1968) o se ha usado un solo paso pero que a gran escala no es viable (Johnsen y col., 1999). Se trató de mejorar el rendimiento sometiendo a la proteína a una renaturalización, tal como lo describe Wang y col. (1998), pero se siguió obteniendo lo mismo (Datos no mostrado), lo que indica que no es un problema de plegamiento. Por otro lado se debe tener en cuenta que la secreción de proteínas heterologas en levadura se hace a través de vesículas, las cuales son hechas en el retículo endoplásmico, allí la proteína en cuestión pasa por un riguroso control de calidad; además se debe considerar la posibilidad que la proteína sea glicosilada (Spang, 2004)

El peso molecular calculado de SK-K1 es de 52100 D. siendo mayor que la SK (45000 D), esto se debe a que K1 esta unido. K1 tiene un peso aproximado de 8000 D, por lo que el peso de SK-K1 debería ser de 53000 D, pero el valor obtenido es aceptable considerando que hay posibilidad de no medir la migración con alta precisión.

La SK-K1 exhibe un K_m (K_{p1g}) de 0,479 μM , que es aproximadamente 4 veces mayor en comparación con la de SK que es de 0,12 μM (Wohl y col. 1980) indicando así que la formación del complejo activador es más lenta, esto puede ser atribuido a que existe un cierto impedimento por parte del K1. La V_{max} es de 0,0027 $\mu\text{M}/\text{min}$. mientras que la de SK es aproximadamente tres veces menor, 0,001 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Fears y col. 1985), probablemente esto se debe que la degradación progresiva de la SK durante el envejecimiento del complejo es más rápida que la de SK-K1 (Markus y col. 1976), eso también explicaría que la k_{cat} sea más de doscientas veces mayor, siendo 231,6 seg.^{-1} para SK-K1 y 1 seg.^{-1} para SK.

La SK-K1 tiene afinidad por la fibrina siendo su K_D de 0,9 μM , el radio molar de enlace es de 0,56 lo que indica que al menos dos moléculas de fibrina son necesario para enlazar una de SK-K1, si se compara con el de t-pA (0,58), casi no hay ninguna diferencia (Angles-Cano, 1986). El que la SK-K1 tenga afinidad por la fibrina reviste gran importancia en vista que su acción va a ser sobre coágulo lo que significaría que esta localizada en el sitio del daño y no en todo el torrente sanguíneo tal como si lo está la SK cuando es suministrada, de allí se desprende que la dosis a suministrar a un paciente sería mucho menor a la usada actualmente, la cual es de 1500000 U y por tal motivo el riesgo que tiene el paciente al ser tratado con SK disminuiría.

La actividad de la SK-K1 es potenciada en presencia de pequeñas cantidades de fibrinogeno (0 – 0,03 μM), pero a grandes concentraciones no parece tener significativamente ningún efecto, así es evidenciado en la figura 27. La estimulación a grandes concentraciones se pudiera ver afectado por la difusión de los reactantes debido a la viscosidad. Por otro lado la actividad de SK-K1 en el rango de 0 a 50 mM de NaCl, no se ve afectada (figura28), superior a esta disminuye, esto se puede deber a la fuerza iónica a la que el sistema esta sometido aunado a esto al efecto que el Ion Cl^{-1} ejerce sobre el complejo. El rango de pH adecuado es desde 7,5 a 8, así lo muestra la figura 22, en comparación con la SK tanto de la actividad en presencia de NaCl y diversos pH, no parece haber ninguna diferencia.

8.- CONCLUSIONES

En síntesis la proteína SK-K1 obtenida a partir de la levadura *Pichia pastoris* presenta las siguientes características.

- Es capaz de activar plasminogeno humano
- Se purifica en un solo paso por medio de una columna Lys-Sepharosa, eluyendose con urea a 4 M, obteniéndose un rendimiento de 8,4 %
- Es sensible a inmunodetección con policlónales anti – SK
- Tiene un peso molecular de 52100 D
- La K_{Plg} es de 0,479 μ M
- La V_{max} es de 0,0027 μ M/min.
- La k_{cat} es de 231,6 seg^{-1}
- Tiene afinidad por la Fibrina, siendo su K_D de 0,9 μ M, y es necesario dos molécula de fibrina para enlazar una de SK-K1
- Su actividad es potenciada por fibrinogeno en el rango de 0 a 0,03 μ M
- Su actividad permanece constante en el rango de 0 a 50 mM de NaCl y entre pH 7,5 a 8.0

En definitiva la hipótesis planteada es confirmada, pero por su baja producción y rendimiento en la purificación, por el momento parece ser que es poco rentable este sistema para producir SK-K1 a gran escala por el momento.

9.- BIBLIOGRAFIA

- Andrews, R. y Berndt, M. 2004. **Platelet physiology and thrombosis**. Thrombosis Research 114: 447 – 453.
- Angles-Cano, E. 1986. **A Spectrophotometric Solid-Phase Fibrin-Tissue Plasminogen Activator Activity Assays (SOFIA-tPA) for High-fibrin-Affinity Tissue Plasminogen Activators**. Analytical Biochemistry. 153: 201 – 210.
- Bajaj, S. P and y Castellino F. J. 1977. **Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase**. J. Biol. Chem. 252: 492-498.
- Banerjee, A., Chisti, Y. y Banerjee, U. 2004. **Streptokinase useful thrombolytic agent**. Biotechnology Advances, 22: 287 – 307.
- Bastidas, M. 2000. **Diseño de un Ligando para Purificar Estreptokinasa por Cromatografía de Afinidad**. Trabajo especial de grado para optar por el título de magíster sciantarum presentado en la Universidad de los andes – Mérida.
- Boxrud, P. y Bock, P. 2004. **Coupling of conformational and Proteolytic Activation in the Kinetic Mechanism of Plasminogen Activation by Streptokinase**. Journal of Biological Chemistry, 279 (35): 36642 – 36649
- Boxrud, P., Verhamme, I. y Bock, P. 2004. **Resolution of Conformational Activation in the Kinetic Mechanism of plasminogen Activation by Streptokinase**. The Journal of Biological Chemistry, 279 (35): 36633 – 36641.
- Buela, L. 2002. **Construcción de una quimera plasminogeno (N- Terminal del Kringle 1) :: Estreptoquinasa**. Trabajo especial de grado para optar por el título de magíster sciantarum presentado en la Universidad de los andes – Mérida.
- Canobbio, I., Balduini, C. y Torti, M. 2004. **Signalling through the platelet glycoprotein Ib – V – IX complex**. Cellular Signalling, 16: 1329 – 1344.
- Castellino, F. y Plopis, V. 2005. **Structure and function of the plasminogen/plasmin system**. Thromb Haemost, 93: 647 – 654.
- Cereghino, G. , Cereghino, J., Ilgen, C. y Cregg, J. 2002. **Production of Recombinant Proteins in Fermenter Culture of the Yeast Pichia pastoris**. Current Opinion in Biotechnology, 13: 329 – 332.

- Cereghino, J. y Cregg, J. 2000. **Heterologous Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris***. FEMS Microbiology Reviews, 24: 45 – 66.
- Chandler, W. 1996. **The human fibrinolytic system**. Critical Review in Oncology/Hematology, 24: 27 – 45.
- Christensen, U. y Molgaard, L. 1992. **Positive co-operative binding at two weak lysine-binding sites governs the Glu-plasminogen conformational change**. Biochem. J., 285: 419 – 425.
- Collen, D. 1999. **The plasminogen (Fibrinolytic) System**. Thrombosis and Haemostasis, 82 (2): 259 – 270.
- Coutto, L. T., Donato, J. L. y de Nucci, G. 2004. **Analysis of Five Streptokinase Formulations Using the Euglobulin Lysis Test and the Plasminogen Activation Assay**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.37: 1889 – 1894
- Cregg, J., Barringer, K., Hessler, A. y Madden. 1985. ***Pichia pastoris* as a Host System for Transformations**. Molecular and Cellular Biology, 5 (12): 3376 – 3385.
- Davie, E. 2003. **A Brief Historical Review of the Waterfall/Cascade of Blood Coagulation**. The journal of Biological Chemistry, 278 (51): 50819 – 50832.
- Davie, E., Fujikawa, K. y Kisiel, W. 1991. **The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation**. Biochemistry, 30 (43): 1363 – 1370.
- De Revel, T. y Doghmi, K. 2004. **The normal haemostatic Process**. EMC-Dentisterie, 1: 71 – 81.
- Deutsch, DG; Mertz, ET. 1970 **Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography**. Science 170: 1095 – 1096.
- Deutscher, M. 1990. **Guide Protein Purification**. Mn Enzimology. 182 :1 - 89
- Dienys, G., Jarmalavicius, S., Budriene, S., Citavicius, D. Sereikaite. 2003. **Alcohol Oxidase from the Yeast *Pichia pastoris* – a Potential Catalyst for Organic Synthesis**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 21: 47 – 49.
- Duga, S., Asselta, R. y Tenchini, M. 2004. **Coagulation factor V**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36: 1393 – 1399.

- Fears, R., Hibbs, M. y Smith, R. 1985. **Kinetic Studies on the Interaction of Streptokinase and other Plasminogen Activators with Plasminogen and fibrin.** *Biochem. J.*, 229: 555 – 558.
- Fletcher, B., Taylor, Jr. y Russell, H. 1970. **Streptokinase.** *Methods in Enzymology*, 19: 807 – 834.
- Friberger, P., Knös, M., Gustavsson, S., Aurell, L. y Claeson, G. 1978. **Methods for determination of Plamin, Antiplasmin and Plasminogen by means of Sustrate S-2251.** *Hemostasis*, 7: 138 – 145.
- Gentry, P. 2004. **Comparative aspects of blood coagulation.** *The Veterinary Journal*. 168: 238 – 251.
- Gonzales-Gronow, M., Sieftring, G., y Castellino, F. 1978. **Mechanism of Activation of Human Plasminogen by the Activator Complex, Streptokinase-Plasmin.** *The Journal of Biological Chemistry*, 253 (4): 1090 – 1094.
- Hagenson, M., Holden, K., Parker, K., Wood, P., Cruze, J., Fuke, M., Hopkins, T., y Stroman, D. 1989. **Expression of streptokinase in Pichia pastoris yeast.** *Enzyme Microb. Technol.* 11: 650 – 656.
- Harrison, P. 2005. **Platelet function analysis.** *Blood Review*, 19: 111 – 123.
- Herrick, S., Blanc-Brude. O., Gray, A. y Laurent, G. 1999. **Fibrinogen.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31: 741 – 746.
- Higgins, D. y Cregg, J. 1998. **Pichia Protocols.** *Methods in Molecular Biology*, 103: 1 – 15.
- Hillman, M., Zolotarjova, N., Patrick, D., McCabe, D., Shen, K., Corman, J., Billheimer, J., Sieffert, D., Hollis, G. y Wynn, R. 2002. **Large – purification of active platelet integrin glycoprotein IIb – IIIa.** *Protein expression and purification*, 25: 494 – 502.
- Hoop, M., Cregg, J., Keizer-Gunnink, I., Sjollem, K., Veenhuis, M. y Ab, G. 1991. **Overexpression of Alcohol Oxidase in Pichia pastoris.** *FEBS*, 291 (2): 299 – 302.
- Hoover, G., Menhart, N., Martin, A., Wader, S. y Castellino, F. 1993. **Amino Acids of Recombinant Its Interaction with ω -Amino Acids.** *Biochemistry*, 32: 10936 – 10943.

- Hoover, G., Menhart, N., Martin, A., Warder, S. y Castellino, F. 1993. **Amino Acids of the Recombinant Kringle 1 Domain of Human Plasminogen That Stabilize Its Interaction with ω -Amino Acids**. *Biochemistry*, 32: 10936 – 10943.
- Hoylaerts, M., Rijken, D., Lijnen, H. y Collen, D. 1982. **Kinetics of Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator**. *The Journal of Biological Chemistry*, 257 (6): 2912 – 2919.
- Inan, M. y Meagher, M. 2001. **Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOX1) Promoter of *Pichia pastoris***. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (6): 585 – 589.
- Irigoyen, J., Muños-Cánoves, P., Montero, L., Koziczak, M. y Nagamine, Y. 1999. **The plasminogen activator system: biology and regulation**. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 56: 104 – 132.
- Jackson, K., Malke, H., Gerlach, D., Ferretti, J. y Tang, T. 1986. **Active streptokinase from the cloned gene in *Streptococcus sanguis* is without the carboxyl-terminal 32 residues**. *Biochemistry*, 25: 108 – 114.
- Johnsen, L., Poulsen, K. y Petersen, T. 1999. **Purification and Cloning of a Streptokinase from *Streptococcus uberis***. *Infection and Immunity*. 67(3): 1072 – 1078.
- Kim, D., Lee, S., Yoon, S. y Byun. 2002. **Specificity Role of the Streptokinase C-Terminal Domain in Plasminogen Activation**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290: 585 – 588.
- Kosow, D. 1975. **Kinetic Mechanism of the Activation of Human Plasminogen by Streptokinase**. *Biochemistry*, 14 (20): 4459 – 4464.
- Lijnen, H., Bachmann, F., Collen, D., Ellis, V., Pannekoek, H. y Rijkens, D. 1994. **Mechanisms of plasminogen activation**. *Journal of Internal Medicine*, 236: 415 – 424.
- Lizano, S. y Johnston, K. 2005. **Structural Diversity of Streptokinase and Activation of Human Plasminogen**. *Infection and immunity*, 73 (7): 4451 – 4453.
- Malke H, Gerlach D, Kohler W, Ferretti J. 1984. **Expression of a streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* in *Streptococcus sanguis***. *Gen. Genet.* 196: 360 – 3.

- Malke, H. y Ferretti, J. 1984. **Streptokinase: Cloning, Expression, and Excretion by *Escherichia coli***. Proc. Nati. Acad. Sci. USA. 81: 3557-3561.
- Marder, V. 2001. **Thrombolytic therapy: 2001**. Blood Reviews, 15: 143 – 157.
- Markus, G., Evers, J. L. y Hobika, G. H. 1976. **Activator activities of the transient forms of the human plasminogen-streptokinase complex during its proteolytic conversion to the stable activator complex**. Journal of Biological Chemistry. 251 (21): 6495 – 6504.
- McCance, S. y Castellino, F. 1995. **Contributions of Individual Kringle Domains toward Maintenance of the Chloride-Induced Tight Conformation of Human Glutamic Acid-1 Plasminogen**. Biochemistry, 34 (29): 9581 – 9586.
- Mendoza, C. 2003. **Diseño, Expresión, Purificación y Caracterización Parcial de una Streptokinasa Híbrida Activable por Trombina extendida por el dominio N-terminal Kringle 1 del Plasminogeno**. Trabajo especial de grado para optar al título de licenciado en Biología ante la ilustre Universidad de los Andes.
- Padmanabhan, K., Wu, T., Ravichandran, K. y Tulinsky, A. 1994. **Kringle-Kringle interactions in multimer kringle structures**. Protein Science, 3: 898 – 910.
- Petersen, T., Martzen, M., Ichinose, A. y Davie, E. 1990. **Characterization of the Gene for Human Plasminogen, a Key Proenzyme in the Fibrinolytic System**. The Journal of Biological Chemistry, 265 (11): 6104 – 6111.
- Pierce, T., Razzuk, M., Razzuk, L. y Hoover, S. 1999. **A comprehensive review of the physiology of hemostasis and antithrombotic agents**. BUMC Proceedings, 12: 39 – 49.
- Ponting, C., Marshall, J. y Cederholm-Williams. 1992. **Plasminogen: a structural review**. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 3: 605 – 614.
- Pratap, J., Rajamohan, G. y Dikshit, K. 2000. **Characteristics of Glycosylated Streptokinase Secreted from *Pichia pastoris*: Enhanced Resistance of SK to proteolysis by Glycosylation**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 469 – 475.
- Rasche, H. 2001. **Haemostasis and thrombosis: an overview**. European Heart Journal Supplements, 3: 3 – 7.
- Rosenfeld, S. 1998. **Use of *Pichia pastoris* for Expression of Recombinant Proteins**. Methods in Enzymology, 306: 154 – 169.

- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. 1989. **Detection and Analysis of Proteins Expressed from Cloned Genes**. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition 3: 18.56 – 18.71
- Schick, L. A, y Castellino F. J. 1974. **Direct evidence for the generation of an active site in the plasminogen moiety of the streptokinase-human plasminogen activator complex**. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57(1): 47-54.
- Sinnaeve, P. y Van de Werf, F. 2001. **Thrombolytic Therapy State of the Art**. Thrombosis Research. 103: S71 – S79.
- Sottrup-Jensen, I., Clays, H., Zajdel, M., Petersen, T. y Magnusson, S. 1978. **The primary structure human plasminogen: isolation of two lysine-binding fragments and one “mini”plasminogen (MW, 38000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis**. Prog Chem Fibrinolysis Thrombolysis, 3: 191 – 209.
- Spang, A. 2004. **Vesicle Transport: A Close Collaboration of Rabs and Effectors** Current Biology, 14: R33–R34
- Standeven, K., Ariëns, R. y Grant, P. 2005. **The molecular Physiology and pathology of fibrin structure/function**. Blood Review, 19: 275 – 288.
- Takada, A., Takada, Y. y Sugawara, Y. 1988. **Activation of Val₄₄₂-Plasminogen (mini-Plasminogen) by Urokinase, Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator**. Thrombosis Research, 49: 253 – 263.
- Tang, J., Huntera, B. y Zhang, X. 1999. **Crystal structure of streptokinase β -domain**. FEBS Letter, 459:85 – 89.
- Taylor, F. B. y Botts, J. 1968. **Purification and Characterization of Streptokinase with Studies of Streptokinase Activation of Plasminogen**. Biochemistry 7(1): 232 – 242.
- Tillet WS, Garner RL. 1933. **The fibrinolytic activist of hemolytic streptococci**. J Exp Med., 58: 485-502.
- Tillet WS, Sherry S. 1949. **The effect in patients of streptococcal fibrinolysin (streptokinase) and streptococcal desoxyribonuclease on fibrinous, purulent and sanguinous pleural exudations**. J. Clin. Invest., 23: 173-179.

- Víctor, W. y Van, H. 2001. **The endothelium: vascular control of haemostasis.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 95: 198 – 201.
- Wang, S., Reed, G. y Hedstrom. 2000. **Zymogen Activation in the Streptokinase – Plasminogen Complex.** Eur. J. Biochem., 267: 3994 – 4001.
- Wang, X., Lin, X., Loy, J., Tang, J. y Zhang, X. 1998. **Crystal Structure of the Catalytic Domain of Human Plasmin Complexed with Streptokinase.** Science, 281: 1662 – 1665.
- Wang, X.; Tang, J.; Hunter, B.; Zhang, X. 1999. **Crystal Structure of Streptokinase β -Domain.** FEBS Letters 459: 85 – 89.
- Waterham, H., Russell, A., Vries, Y. y Cregg, J. 1997. **Peroxisomal Targeting, Import, and Assembly of Alcohol Oxidase in *Pichia pastoris*.** The Journal of Cell Biology, 139 (6): 1419 -1431.
- Wohl, R., Summaria, L. y Robbins, K. 1980. **Kinetics of Activation of Human Plasminogen by Different Activator Species at pH 7.4 and 37 °C.** The Journal of Biological Chemistry, 255 (5): 2005 – 2013.
- Wohl, R., Summaria, L., Arzadon, L. y Robbins, K. 1978. **Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen.** The Journal of Biological Chemistry. 253 (5): 1402 – 1407.
- Wu, S., Castellino, F. y Wong, S. 2003. **A Fast – acting, Modular – structured Staphilokinase Fusion with Kringle-1 from Human Plasminogen as the Fibrin-targeting Domain Offers Improved Clot Lysis Efficacy.** The Journal of Biological Chemistry. 278 (20): 18199 – 18206.
- Wu, T., Padmanabhan, K. y Tulinsky, A. 1994. **The Structural of Recombinant Plasminogen Kringle 1 and the Fibrin Binding Site.** Blood Coagulation and Fibrinolysis, 5: 157 – 166.
- WWW.Chromogenix.Se.
- Young, K., Shi, G., Wu, D., Chang, L., Chang, B., Ou, C. y Wu, H. 1998. **Plasminogen Activation by Streptokinase Via a Unique Mechanism.** The Journal of Biological Chemistry, 273 (5): 3110 – 3116.

10.- APENDICE

10.1.- Determinación de la constante de disociación (K_d) de SK-K1 con respecto a la fibrina (Fn)

El acoplamiento de la SK-K1 se puede describir por medio de un modelo de equilibrio de afinidad para interacciones de proteínas acoplantes. Combinando la ecuación de balance de masa de la reacción de equilibrio de enlace de Fn.SK-K1. (Angles-Cano 1986)

$$q = p_t \alpha \quad (1)$$

$$\frac{[Fn] \times [SK-K1]}{[Fn. SK-K1]} = K_d = \frac{mp}{q} \quad (2)$$

Con la ecuación 1, la cual describe el coeficiente de partición entre la fase líquida y la sólida; y con la ecuación 2 que describe la relación de la conservación de la masa de SK-K1 y la molécula de fibrina.

$$m_t = m + q \quad (3)$$

$$p_t = p + q \quad (4)$$

Se puede derivar una ecuación para determinar la efectividad de enlace para un dado set de parámetros (K_p , la constante de disociación; m_t , la concentración total de fibrina, y p_t , la concentración de SK-K1), como:

$$K_d = \frac{(m_t - p_t\alpha)(p_t - p_t\alpha)}{p_t\alpha} \quad (5)$$

Así

$$K_p = \frac{(m_t - p_t\alpha)(1 - \alpha)}{\alpha} \quad (6)$$

Donde:

$$A = \frac{4 p_t m_t}{(m_t + p_t + K_d)^2}$$

Asumiendo que $A \ll 1$, la aproximación

$$\sqrt{(1 - A)} \approx 1 - A/2$$

Se puede hacer y la ecuación 8 puede ser rearrreglada para la saturación fraccional de fibrina por la SK-K1

$$p_t\alpha/m_t = p_t/(m_t + p_t + K_d) \quad (9)$$

Esta ecuación posee una asíntota, indicando que la saturación de la fase sólida de fibrina es hiperbólica en la concentración de SK-K1. Para determinar la constante de disociación (K_d), se hace una transformación logarítmica de la Ec. 9

$$\text{Log} [m_t/p_t\alpha - 1] = \text{Log} (m_t + K_p) - \text{Log} p_t$$

Una gráfica de la relación $p_t\alpha/m_t$ versus $\text{Log} p_t$ muestra un intercepto. En el punto medio $p_t\alpha/m_t = 0.5$ y $\text{Log} (m_t/p_t\alpha - 1) = 0$. Así, en el punto $\text{Log} K_d = \text{Log} p_t - \text{Log} m_t$; m , Fn libre, en la solución, en la Ec. 4 puede ser eliminada. m_t es una expresión de q y entonces $\text{Log} K_d = \text{Log} p_t - \text{Log} q$. Así K_d se puede determinar por identificar el punto de inflexión de la curva.

10.2.- Curva de calibración de proteínas con Bradford

Para la curva de calibración se hizo de acuerdo a Deutscher (1990), para ello se uso Albúmina bovina a diversas concentraciones (0.5, 1, 2, 3 y 4 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$) y la Absorbancia se determino a 530 nm, obteniéndose lo que la figura 30 muestra.

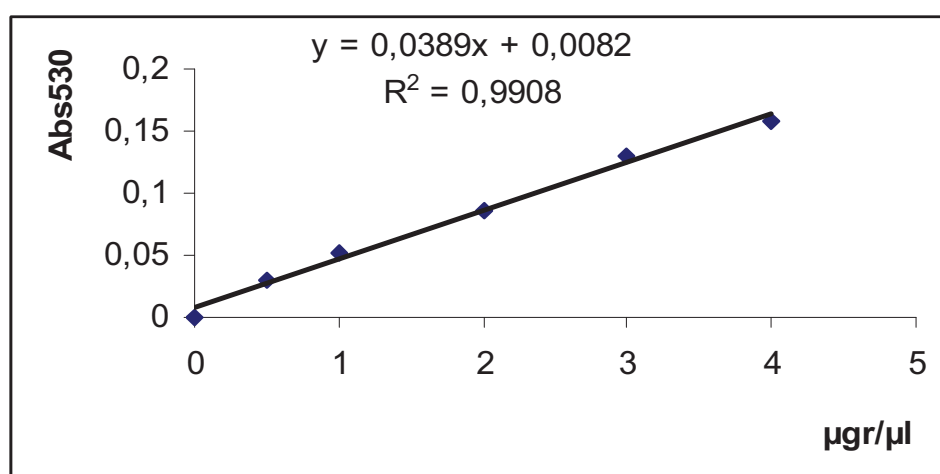


FIGURA 30: Curva de calibración de proteínas, por Bradford

Con la ecuación de la recta se puede determinar concentraciones de proteínas desconocidas.

10.3.- Curva de calibración para determinar U de SK

Para ello se trabajo con SK comercial (Streptase), la cual se le conoce el número de unidades por peso (100000 U/mgr). Se tomo diferentes cantidades de unidades (0, 4, 10, 20, 30 y 50 U/ μ l) y se monto una reacción que contenía cromógeno (0.3 μ M) tampón Tris-HCl, pH 7.5 y 50 mM y Plg, en un volumen total de 100 μ l. Se graficaron los valores de absorbancia del progreso de la reacción versus el tiempo al cuadrado (t^2), para cada una de las reacción se obtuvo una línea recta a la cual se le calculo la pendiente (V_2) y estas se graficaron versus las unidades de SK. Obteniéndose lo que se presenta en la figura 31

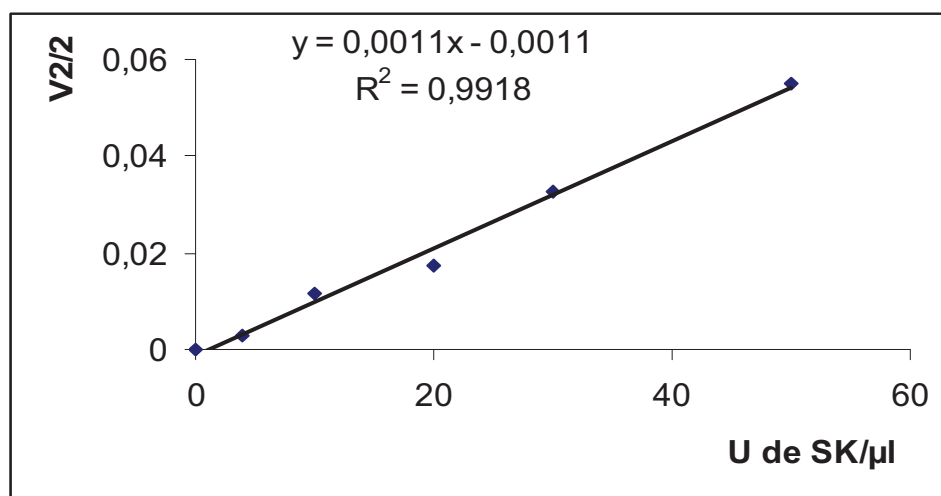


FIGURA 31: Curva de calibración de unidades de SK

Con la ecuación de la recta se puede determinas unidades de SK desconocidas.

