

## **Determinación de la actividad de urokinasa y cinética de activación del plasminógeno en placa de agarosa-caseína**

**M. E. FERNÁNDEZ DE COSSÍO, L. PÉREZ Y E. PENTÓN**

**Centro de Investigaciones Biológicas**

**Apartado 6996**

**La Habana, Cuba**

*Recibido el 11 de diciembre de 1985*

### **RESUMEN**

Se describe el comportamiento cinético de la urokinasa en un gel agarosa-plasminógeno-caseína, distribuido en los pozuelos de una placa de microtitulación. Un fotómetro múltiple de placas registra, a diferentes tiempos, el decrecimiento de la turbidez propia de la caseína al ser digerida por la plasmina que se deriva de la activación selectiva (proteolisis parcial) del plasminógeno. El procedimiento se propone para estudios cinéticos y purificación de esta proteasa.

### **SUMMARY**

We describe the kinetic behaviour of urokinase in an agarose-plasminogen-casein gel distributed in a microtitration multiwell plate. A photometer for multiwell plates registers, at different times, the decrease of turbidity of casein during its digestion by plasmin as a result of the selective activation (partial proteolysis) of plasminogen. The procedure is proposed for kinetic studies and purification of this protease.

### **INTRODUCCION**

El interés suscitado por los resultados notables obtenidos recientemente en la aplicación clínica, en trombosis e infartos, de proteasas fibrinolíticas activadoras del plasminógeno (estreptokinasa, urokinasa, activador tisular), de fuente natural (Tennant, 1984; Van der Werf, 1984) o recombinante (Collen, 1984), hace necesario el desarrollo de métodos simples y seguros para la cuantificación de estas enzimas.

Se han empleado diversos procedimientos (Tang, 1984) para la determinación de la proteolisis parcial del plasminógeno producida por distintas proteasas específicas (activadores), incluida la urokinasa. Estos procedimientos utilizan como sustrato proteínas (fibrina, caseína) en

suspensión (Kanai, 1979), en geles (Marsh, 1972; Faily-Crepin, 1979; Taylor, 1972) o marcadas radiactivamente (Unkeless, 1973; Roblin, 1980), así como ciertos oligopéptidos sintéticos modificados que producen derivados fluorogénicos (Niewenhuizen, 1977; Zimmerman, 1978; Obrenovitch, 1983) o cromogénicos (Tang, 1983; Coleman, 1981) al hidrolizarse. Algunos de estos últimos sustratos son útiles para mediciones cinéticas (Tang, 1983; Coleman, 1981) pero resultan muy costosos; los métodos radiactivos, por su parte, son poco prácticos por su complejidad y pobre sensibilidad (Tang, 1984), mientras que la placa "convencional" de fibrina o de agarosa-caseína en geles, hasta ahora habían sido empleadas solamente para determinaciones cualitativas o cuando más semi-cuantitativas.

En este trabajo se reportan los resultados obtenidos al aplicar a la urokinasa un procedimiento fotométrico directo (Pentón, 1985), desarrollado en nuestro laboratorio, para determinar la actividad enzimática y cinética de activación del plasminógeno en un gel de agarosa-plasminógeno-caseína, distribuido en pozuelos de una placa de microtitulación. El método es muy simple y permite medir directamente la disminución de la turbidez propia de la caseína que resulta de la digestión de esta proteína por la plasmína derivada de la activación (proteólisis parcial) del plasminógeno por alguna proteasa específica.

## MATERIALES Y METODOS

### Preparación de las placas de agarosa-caseína

Se disuelven 50 mg de agarosa (SIGMA-LGR, tipo VII) en 4 ml de PBS (pH 7.4) a 90°C durante 20 minutos, se deja enfriar hasta 45°C y se añade entonces una mezcla homogénea que contiene 100 mg de leche en polvo descremada (ECL); 0.5 ml de 0.2 por ciento azida sódica (Koch-Light) y una unidad<sup>1</sup> de plasminógeno (SIGMA de páncreas bovino) contenido en 0.5 ml de PBS.

La mezcla se mantiene líquida a 45°C mientras se distribuye rápidamente en alícuotas de 0.05 ml por pozuelo en las seis columnas impares de ocho pozuelos de una placa de microtitulación (NUNCLON, 96 pozuelos). Las seis columnas pares restantes se ocupan con 0.05 ml por pozuelo de una mezcla idéntica a la descrita, pero sin plasminógeno (controles de proteólisis no mediada por plasminógeno). La placa se deja en reposo unos 20 minutos hasta que gelifica.

### Determinación de la actividad enzimática

En los pozuelos de las placas preparadas, como se ha descrito, se depositan 0.040 ml de las muestras cuya actividad se desea determinar en múltiples réplicas y con sus respectivos controles sin plasminógeno. Se reservan varias posiciones para diluciones de los patrones y otros controles de interés. Se realiza inmediatamente una lectura inicial (tiempo cero) en fotómetro múltiple de placas (Multiskan, Labsystem), con filtro de 510 nm y se incuban las placas en cámara húmeda a 37°C, manteniéndose en agitación en zaranda miniorbital de placas.

<sup>1</sup> Una unidad de plasminógeno produce un incremento de absorbancia a 275 nm de 1.0 en 20 minutos a pH 7.5 y a 37°C, al medirse los productos de degradación de la alfa-caseína solubles en ácido perclórico en volumen final de 5 ml.

(BELLCO, NJ). Las lecturas se repiten a distintos intervalos de tiempo, hasta el término de la reacción, en que los pozuelos de las muestras y patrones se aprecian completamente transparentes, mientras los controles sin plasminógeno se mantienen opacos (figura 1a) y sus valores de lectura no cambian o aumentan ligeramente por consolidación del gel.

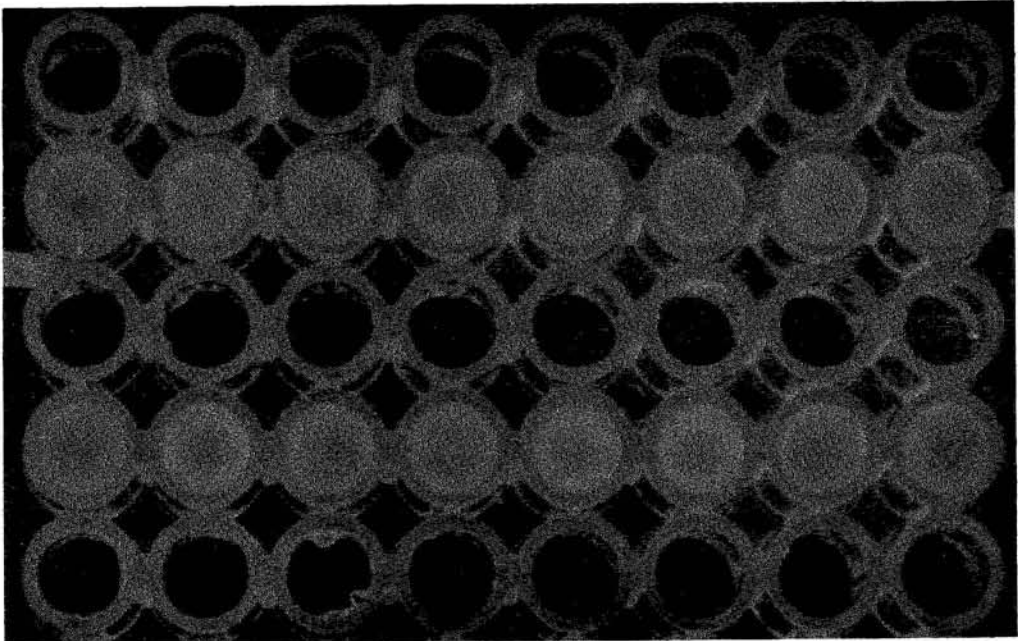


FIG. 1a VARIACION DE LA ABSORBANCIA CON EL TIEMPO DE INCUBACION

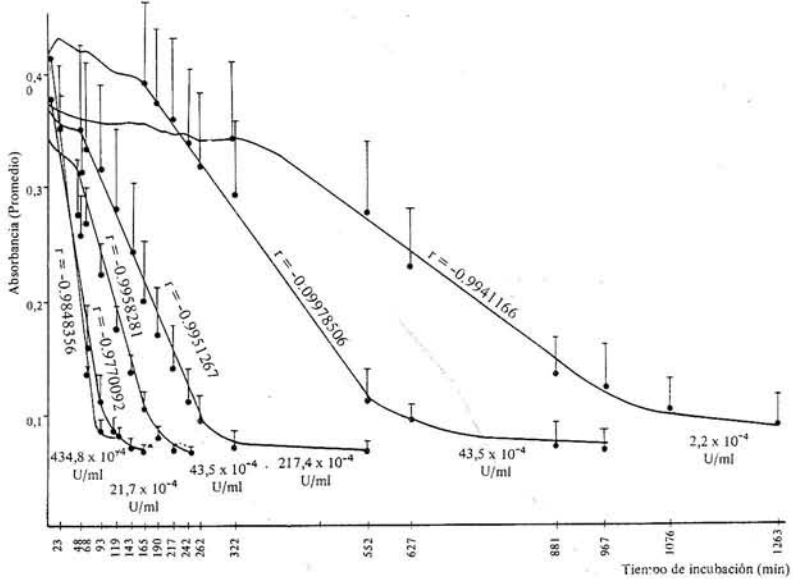


FIG. 1a y 1b. Variación de la absorbancia con el tiempo de incubación.

## Preparación de urokinasa empleada

Se empleó una preparación de urokinasa de células de riñón humano (SIGMA) en 0,34 M cloruro de sodio que contenía 22 unidades<sup>2</sup> de la enzima por ml de preparación, con una actividad específica de 22 unidades por mg de proteína.

## Procesamiento de datos

Se calculó el cambio de absorbancia<sup>3</sup> con el tiempo de incubación ( $|\Delta A/\Delta t|$ ), como el valor absoluto de la pendiente de la recta de regresión que ajusta mejor los promedios de los valores de lectura de las réplicas por cada muestra, contra los tiempos en que se obtuvieron esos valores a partir de la lectura inicial a tiempo cero. Se determinaron las ecuaciones de las rectas de regresión, coeficientes de correlación y se realizaron otros análisis que se representan en los resultados, según un programa elaborado al efecto para una microcomputadora.

## RESULTADOS

### Variación de la absorbancia con el tiempo de incubación para diferentes concentraciones de urokinasa

En la figura 1b puede observarse que la disminución de la absorbancia con el tiempo de incubación se produce de forma lineal solamente a partir de cierto tiempo (período de retraso), que es mayor a medida que son menores las concentraciones de enzima. Se observa también que esta variación deja de ser lineal al final de la reacción cuando se ha consumido la mayor parte del sustrato. Los coeficientes de correlación ( $r$ ) de las rectas de regresión para cada concentración de la enzima, caracterizan la dependencia lineal de la variación en los tramos rectos de las curvas.

### Variación de la velocidad de reacción ( $|\Delta A/\Delta t|$ ) con la concentración de urokinasa

La figura 2a muestra que la variación de la velocidad de reacción (pendientes de las rectas de la variación absorbancia contra tiempo) no es lineal en relación con la concentración de la enzima, sino que se establece una dependencia exponencial entre ambos parámetros. No obstante, los logaritmos de esa velocidad sí guardan una relación lineal ( $r=0,988$ ) con los logaritmos de las concentraciones correspondientes de la enzima, según se aprecia en la figura 2b, lo cual permite calcular con facilidad estas concentraciones a partir de la determinación de las velocidades de reacción respectivas.

- 
- 2 Una unidad de urokinasa activa una cantidad de plasminógeno capaz de producir un incremento de absorbancia a 275 nm a 1,0/ml/minuto de 37°C y pH 7,5 al medirse los productos de degradación de la alfa-caseína solubles en ácido perclórico con 10 nm de paso de luz.
  - 3 Aunque estas lecturas no pueden ser consideradas valores de absorbancia en sentido estricto, se emplea esta designación por brevedad y por su uso corriente.

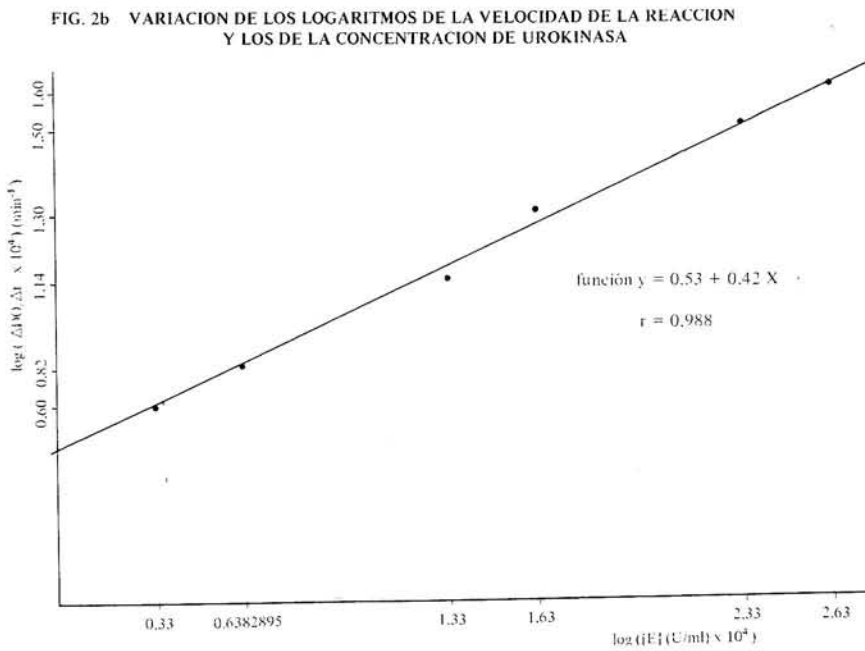
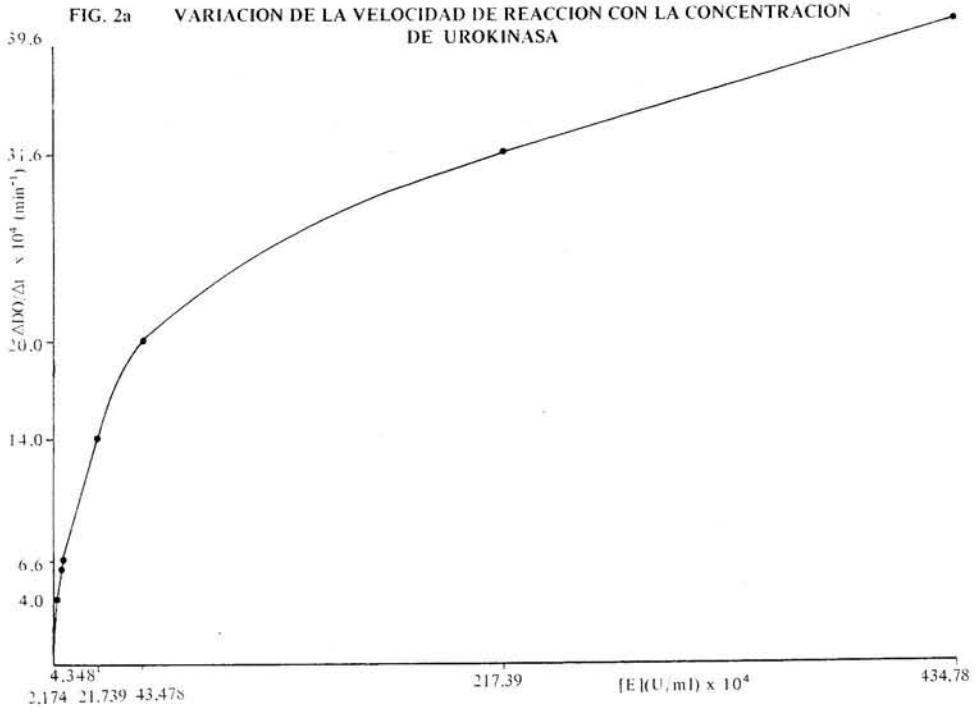


FIG. 2a y 2b. Variación de la velocidad de reacción con la concentración de uroquinasa.

**Variación de la velocidad de reacción con la concentración de plasminógeno (sustrato de la urokinasa)**

En la figura 3a aparece la dependencia entre la velocidad de reacción y la concentración de plasminógeno, la cual puede ser ajustada aproximadamente por la ecuación de Michaelis-Menten, obteniéndose el valor  $K_m=0,0109$  U/ml de plasminógeno a partir del gráfico de los inversos de Lineweaver-Burk (figura 3b).

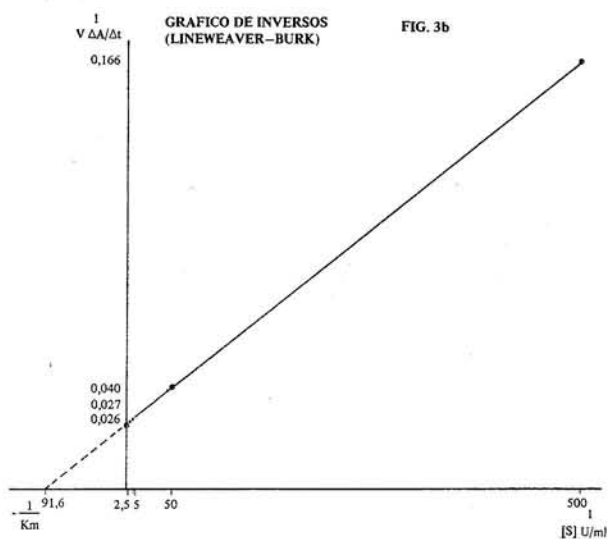
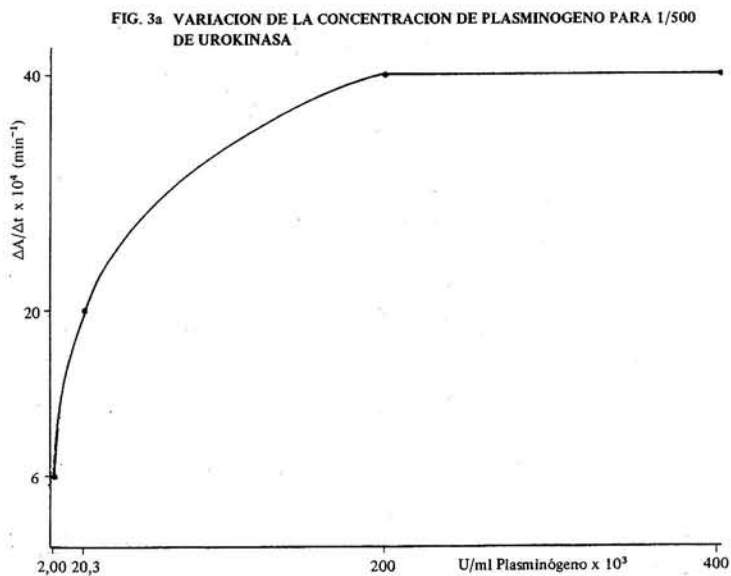


FIG. 3a y 3b. Variación de la velocidad de reacción con la concentración de plasminógeno.

### Indicadores de la calidad del método

Según se observa en la figura 1b, con este procedimiento hemos podido detectar concentraciones de hasta  $2,2 \times 10^{-4}$  U/ml (correspondiente a una dilución 1:100 000 de la preparación original) en un tiempo de incubación de unas 10 horas. Sin embargo, la siguiente dilución de 1:500 000 no fue detectable en 18 horas de incubación, por lo que la sensibilidad del método se ubica entre estas dos diluciones.

El propio experimento de la figura 1b fue repetido en tres ocasiones en diferentes placas, empleando las mismas diluciones de la preparación enzimática original y las ecuaciones de regresión respectivas fueron comparadas obteniéndose los resultados de la tabla 1, donde se evidencia que sólo en el caso de la dilución 1:10 000 se encontró una diferencia significativa entre las rectas de regresión. No obstante, aun en ese caso, las pendientes de las tres rectas son muy similares.

Tabla 1

COMPARACION DE LAS RECTAS DE REGRESION DE TRES EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES PARA LA DETERMINACION DE LA VELOCIDAD DE LA REACCION $\Delta A/\Delta t$ DE LA UROKINASA (UK)						
Concentración UK (U/ml)	$434,8 \times 10^{-4}$	$217 \times 10^{-4}$	$43,5 \times 10^{-4}$	$21,7 \times 10^{-4}$	$4,3 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-4}$
Pendientes de rectas de regresión de experimentos	-0,0042	-0,0036	-0,0019	-0,0016	-0,0006	-0,0004
	-0,0038	-0,0028	-0,0021	-0,0018	-0,0007	-0,0004
	-0,0039	-0,0031	-0,0017	-0,0014	-0,0007	-0,0004
Hipótesis: las pendientes son diferentes	n.s.	n.s.	n.s.	significativo	n.s.	n.s.

### DISCUSION

Desde el punto de vista teórico, sería interesante interpretar la forma peculiar de dependencia de la velocidad de reacción en relación con la concentración de enzima, así como el período de retraso observado antes del comienzo de la variación lineal de la absorbancia contra el tiempo de incubación. Un efecto similar al último fue estudiado para este mismo sistema de sustrato macromolecular por otro autor (Norrman, 1985) que describe dos fases en la activación fibrinolítica del plasminógeno. El presente trabajo, sin embargo, no pretende profundizar en consideraciones teóricas, sino aportar un instrumento metodológico apropiado para estudios de este tipo.

Las determinaciones disponibles actualmente de la actividad de proteasas selectivas del tipo de la urokinasa, confrontan limitaciones importantes para estudios cinéticos y para el seguimiento de procesos de purificación (Tang, 1984). Los procedimientos basados en el tamaño de las zonas de lisis producidas por estas proteasas sobre geles de fibrina o de agar-caseína se consideran muy sensibles y completamente dependientes de la presencia de plasminógeno (Taylor, 1972), además, son sencillos, poco costosos y bastante reproducibles. Sin embargo, la medición de los diámetros de estas zonas de lisis constituye una estimación semicuantitativa grosera de la actividad enzimática, mientras que la medición fotométrica de la disminución de absorbancia propia de la caseína aporta, sin dudas, una alternativa mucho más rigurosa y segura.

El uso de un lector múltiple de placas de microtitulación y la distribución en estas placas del gel que contiene la mezcla de reacción caseína-plasminógeno, permite realizar la determi-

nación simultánea de no menos de 40 muestras, incluyendo patrones y controles de proteólisis inespecífica (no mediada por plasminógeno).

Las razones prácticas apuntadas se añaden a las determinaciones de parámetros cinéticos e indicadores de calidad presentados en los resultados para hacer posible la proposición de este procedimiento para determinar actividades enzimáticas de proteasas activadoras del plasminógeno.

## REFERENCIAS

- COLEMAN, P. L. y G. D. J. GREEN (1981). *A coupled photometric assay for plasminogen activator*. *Methods Enzymol.* 80: 408-414.
- COLLEN, D.; E. J. TOPOL; A. J. TIEFENBRUNN; H. K. GOLD; M. L. WEISFELDT; B. E. SOBEL; R. C. LEINBACH; J. A. BRINKER; P. A. LUDBROOK; I. YASUDA; B. H. BULKLEY; A. K. ROBISON; A. M. HUTTER; W. R. BELL; J. J. SPADARO; B. A. KHAW y E. B. GROSSBARD (1984). *Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial*. *Circulation* 70: 1012-1017.
- FAILLY-CREPIN, C. y J. URIEL (1979). *An electrophoretic assay for plasminogen activator*. *Biochemic* 61: 567-571.
- KANAI, S.; H. OKAMOTO; Y. TAMAURA; S. YAMAZAKI y Y. INADA (1979). *Fibrin suspension as a substrate for plasmin. Determination and kinetics*. *Thromb. Haemostas.* 42: 1153-1158.
- MARSH, N. A. y C. L. AROCHA-PINANZO (1972). *Evaluation of the fibrin plate method for estimating plasminogen activators*. *Thromb. Diath Haemorrh.* 28: 75-38.
- NIEWENHUIZEN, G.; G. WIJNGAARDA y E. GROENEVELD (1977). *Fluorogenic peptide anide substrates for the estimation of plasminogen activators and plasmin*. *Analytical Biochemistry* 83: 143-148.
- NORRMAN, B.; P. WALLEN y M. RANBY (1985). *Fibrinolysis mediated by tissue plasminogen activator. Disclosure of a kinetic transition*. *Eur. J. Biochem.* 149: 193-200.
- OBRENOVITCH, A.; C. MAINTIER; T. MAILLET; R. MAYER; C. KIEDA y M. MONSIGNY (1983). *Sensitive fluorometric determination of plasminogen activator in cell lysates and supernates*. *FEBS Letters.* 157(2): 265-270.
- PENTON, E. (1985). En proceso de publicación.
- ROBLIN, R. y P. O. YOUNG (1980). *Dexamethasone regulation of plasminogen activator in embryonic and tumor-derived human cells*. *Cancer Res.* 40: 2706-2713.
- TANG, J. C.-T.; P. McGRAY y P. CHEN (1983). *Improved photometric assays for plasminogen activator*. Abstract 83rd Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- TANG, J. C.-T.; L. SHERLEY; P. McGRAY y A. VECCHIO (1984). *Current status of activity assays for tissue plasminogen activator*. *Annals New York Academy of Sciences. Enzyme Engineering* 434(7): 536-540.
- TAYLOR, J. C.; D. W. HILL y M. ROGOLSKY (1972). *Detection of caseinolytic and fibrinolytic activities of BHK-21 cell strains*. *Exp. Cell. Res.* 73: 422-428.
- TENNANT, S. N.; J. DIXON; T. C. VENABLE; H. L. J. R. PAGE; A. B. KAISER; R. FREDERICKSEN; L. TACOQUE; P. KAPLAN; N. S. BABU; E. E. ANDERSON; E. WOOTEN; H. S. III JENNINGS; J. BREINIG y W. B. CAMPBELL (1984). *Intracoronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction: comparison of the efficacy of urokinase with streptokinase*. *Circulation* 69: 756.
- UNKELESS, J. C.; A. TOBIA; L. OSSOWSKI; J. P. QUIGLEY; D. B. RIFKIN y E. REICH (1973). *An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses*. *J. Exp. Med.* 137: 85-126.
- VAN DE WERF, F.; P. A. LUDBROOK; S. R. BERGMAN; A. J. TIEFENBRUNN; K. A. A. FOX; H. DE GEEST; M. VERSTRAETE y D. COLLEN (1984). *Coronary thrombolysis with tissue type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction*. *N. Engl. J. Med.* 310: 609.
- ZIMMERMAN, M.; J. P. QUIGLEY; B. ASHE; C. DORN; R. GOLDFARE y W. TROLL (1978). *Direct fluorescent assay of urokinase and plasminogen activators of normal and malignant cells: kinetics and inhibitor profiles*. *Proc. Natls. Acad. Sci. USA.* 75: 750-753.