

Fraccionamiento del plasma sanguíneo de Ovinos de Pelo (*Ovis aries*) con Polietilenglicol-6000, alternativa que facilita el aislamiento de α_2 -Macroglobulina.

Barrera Valderrama D. I.¹, Giraldo Caballero J. H.¹, Arbeláez Ramírez L. F.¹

¹ Grupo de Investigación en Biomoléculas (GIB)

Universidad de Pamplona

email: luifer@uipamplona.edu.co

Recibido 12 Septiembre 2006

Aceptado 16 Noviembre 2006

ABSTRACT

The α_2 -macroglobulin (α_2 -M) is a member of the superfamily of the thioester glycoproteins; this family is integrated with two subgroups, the macroglobulin and the complement respectively. In the macroglobulin our research group demonstrated the presence of this protein in the tropical hair sheep plasma (*Ovis aries*). The solubility of any protein depends on several Physical, Chemical and structural factors, even in the α_2 -M. found in tropical sheep coats. These factors were altered using polyetilenglycol (PEG) in a final concentration of 16%. The supernatant and the precipitation obtained by the treatment with PEG were analyzed by SDS PAGE electrophoresis analysis. This analytical process demonstrated that the precipitated fraction with 16% PEG contains the α_2 -M. in the plasma of tropical sheep. This method eliminated most of the plasma proteins particularly albumin which is the most abundant protein in the plasma with different isoelectric points, being close to the human α_2 -M. making it difficult to eliminate as a contaminant. This is due to the lesser tendency of denaturing proteins of the PEG with low heat of dissolution and being easy to use. This method is a recommended step in a previously high purifying preparation to which some other steps like ion exchange and exclusion through chromatography should be added to the purification.

KEY WORDS

Alpha 2-Macroglobulin, *Ovis aries*, Precipitation.

RESUMEN

La α_2 -Macroglobulina (α_2 -M), es un miembro de la superfamilia de las glicoproteínas tioéster; esta superfamilia está compuesta por los subgrupos macroglobulina y complemento. Recientemente, nuestro grupo de investigación evidenció por primera vez esta proteína en plasma de ovino de pelo (*Ovis aries*). Teniendo en cuenta que la solubilidad de cualquier proteína depende de múltiples factores fisicoquímicos y estructurales, realizamos experimentos que afectaron los parámetros de la solubilidad de la α_2 -M de ovino de pelo en el plasma, utilizando el fraccionamiento con Polietilenglicol

6000 (PEG), hasta una concentración final del 16%; se analizaron electroforéticamente en SDS PAGE el segundo sobrenadante y los precipitados obtenidos del fraccionamiento por precipitación con PEG, los análisis electroforéticos demostraron que el fraccionamiento con una concentración final del 16% de PEG, es un método que facilita aislar la fracción de la α_2 -M de ovino de pelo, eliminando una gran cantidad de otras proteínas plasmáticas, en particular la albúmina, la cual es la proteína más abundante del plasma con diferentes puntos isoeléctricos, que la hacen un contaminante difícil de eliminar. Debido a la poca tendencia de denaturar las proteínas por parte del PEG, su bajo calor de disolución y el poco tiempo necesario para generar los precipitados, hacen que el fraccionamiento del plasma sea recomendable como un paso previo en la purificación de la α_2 -M de ovino de pelo.

PALABRAS CLAVES

α_2 -Macroglobulina, *Ovis aries*, Precipitación.

INTRODUCCIÓN

La α_2 -Macroglobulina (α_2 -M), es un miembro de la superfamilia de las glicoproteínas tioéster; esta superfamilia está compuesta por los subgrupos macroglobulina y complemento (revisado en SOTTRUP-JENSEN, 1987; BARRERA, ARBELÁEZ, 2006), la proteína de superficie celular CD 109 (LIN et al., 2002) y algunas proteínas de insectos expresadas en la fase aguda (LEVY 2004; LEVASHINA et al, 2001; LAGUEUX et al, 2000). El subgrupo macroglobulina es tipificado por la α_2 -M humana, la cual es considerada como una proteína inhibidora de los cuatro tipos de proteasas (serino, metalo, carboxil y tiol) (SOTTRUP-JENSEN, 1989). Las α -Macroglobulinas (α -Ms) se sintetizan como monómeros de 180 a 200 kDa (LUNDWALL et al, 1981). Estructuralmente, el dímero de las α -Ms se mantiene unido por dos puentes de disulfuro (JENSEN, SOTTRUP-JENSEN, 1986; SOTTRUP-JENSEN, 1989), pero constan de una estructura cuaternaria en la forma tetramérica (SOTTRUP-JENSEN et al, 1990). Cada subunidad de α -M contiene un dominio sensitivo a la proteólisis, el cual es llamado "bait region"; durante el rompimiento proteolítico de este dominio, el grupo amino de una lisina en la proteasa desestabiliza el tioéster permitiendo su atrapamiento por medio de un enlace covalente β -cisteinil- γ -glutamil en cada subunidad (ROBERTS, 1986; SOTTRUP-

JENSEN et al, 1990). Estudios *in vitro*, han demostrado que el tioéster puede ser escindido por aminas primarias y en la mayoría de las α -Ms, induce cambios conformacionales similares a los iniciados por el rompimiento de la "bait region" (SWENSON, HOWARD, 1979). Una consecuencia adicional de este rompimiento y del subsecuente cambio conformacional, es la exposición en la superficie de las α -Ms del dominio que reconoce el receptor Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP/ α_2 -M), que corresponde al terminal-C de cada subunidad, lo cual conlleva a la eliminación de los complejos α -Ms-proteasa en células reticuloendoteliales (DEBANNE et al, 1973; ENGHILD et al, 1989; van DIJK et al, 1991). Estudios previos han aislado y caracterizado el terminal-C de la α_2 -M, mediante la evaluación con anticuerpos monoclonales (JENSEN, 1996; ARBELÁEZ, STIGBRAND, 1997; BARRERA et al, 2007). Recientemente, nuestro grupo de investigación evidenció por primera vez esta proteína en plasma de ovino de pelo. Teniendo en cuenta que la solubilidad de cualquier proteína depende de múltiples factores fisicoquímicos y estructurales, realizamos variaciones que afectaron los parámetros de la solubilidad de la α_2 -M de ovino de pelo, utilizando el fraccionamiento del plasma con Polietilenglicol 6000 (PEG),

además, se evaluaron electroforéticamente dicha fracciones, con el fin de facilitar la posterior purificación de la α_2 -M de ovino de pelo, de tal manera que facilite posteriores análisis estructurales y fisiológicos comparativos, con las α -Ms humanas y de otras especies, identificadas por nuestro grupo en diferentes plasmas animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Las sustancias para los búferes Acetato de Sodio, Fosfato de Sodio y el PEG fueron de Merck KgaA; los reactivos de electroforesis de BioRad Laboratories; Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), Dimetil sulfóxido (DMSO), Cloruro de Zn fueron de Fluka Chemie y la Metilamina (MA) de Sigma; todos los reactivos fueron del mayor grado de pureza disponible en el mercado internacional, las matrices insolubles proveídas por Amersham Biosciences, fueron de flujo rápido.

Toma de muestras y obtención de plasmas

Se tomaron muestras de sangre (450 mL) de la vena yugular de ovino de pelo, de acuerdo a las normas de bioética empleando para ello una Bolsa Baxter® CPDA-1; el plasma se obtuvo por centrifugación a 7.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos, (Universal 32R Hettich, Bäch), a los plasmas de esta manera obtenidos, se les añadió PMSF disuelto en DMSO, hasta una concentración final de 1mM, con el fin de inhibir la actividad de serino proteasas; el plasma normal humano fue analizado previamente y catalogado libre de antígenos de Hepatitis, VIH, Chagas, y otras enfermedades infecciosas de acuerdo al protocolo del banco de sangre del Hospital Erasmo Meoz, Cúcuta, Colombia. Los plasmas fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización.

Purificación de la α_2 -Macroglobulina

Se tomaron 250 mL de plasma humano al cual previamente se le había retirado el plasminógeno (Plg), por cromatografía de afinidad en sefarosa-lisina de acuerdo al método de DEUSTCH, MERTZ, 1970;

posteriormente, el plasma fue dializado contra agua tipo III durante 24 horas en una membrana de celulosa regenerada MWCO 12-14 kDa y centrifugado a 7.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente (~18°C) con el fin de retirar el precipitado de euglobinas, 200 mL de este plasma fue utilizado para la purificación de α_2 -M por cromatografía de afinidad en sefarosa-Zn (IMBER, PIZZO, 1981), en un cromatógrafo BioLogic LP de BioRad Laboratories, a través de una columna de 2,5 x 10 cm, empacada con 45 mL de matriz. La proteína fue eluída con buffer acetato de sodio 0.01M, NaCl 0.15M, pH 5.0, colectando fracciones de 8 mL. La concentración de la α_2 -M fue determinada por absorción a una longitud de onda de 280_{nm} usando como coeficiente de extinción ($\epsilon^{1\%}_{1cm}$) 8.9 (HALL, ROBERTS 1978); esta proteína fue concentrada a ~4.16 mg/mL en una célula de ultrafiltración AMICON de Millipore, utilizando N₂ como gas de arrastre. El procedimiento anterior fue realizado de la misma manera para la α_2 -M de ovino de pelo, sin embargo no se obtuvo ningún resultado positivo.

Fraccionamiento del plasma de ovino de pelo con PEG

Se tomaron 250 mL de plasma normal de de ovino de pelo y se le retiró el Plg de la misma manera que al plasma humano, el volumen total fue medido y el 13.6% de este volumen fue añadido como PEG (50% p/v), en forma lenta y bajo agitación constante, hasta que se alcanzó una concentración final del 6%; después de 45 minutos de agitación a temperatura ambiente, se centrifugó el plasma a 7.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente, el precipitado fue almacenado en baño de hielo y redisolto en PBS. El volumen del sobrenadante fue medido de nuevo, posteriormente se añadió PEG, en la misma forma como se explico anteriormente, hasta obtener una concentración final del 16%; este plasma fue centrifugado bajo los mismos parámetros ya explicados; el precipitado fue redisolto con PBS. El segundo sobrenadante y los precipitados redisolto fueron analizados electroforéticamente en SDS PAGE al 7.5%

utilizándose como patrón la α_2 -M humana purificada.

Análisis electroforético

Los plasmas de humano y de ovino de pelo, así como los precipitados y el segundo sobrenadante obtenidos mediante el fraccionamiento con PEG del plasma de ovino de pelo, fueron diluidos 1:5 (vol/vol) con PBS; posteriormente, al igual que la α_2 -M humana purificada, se mezclaron con buffer de carga denaturante en una relación 1:1 (vol/vol) (LAEMMLI, 1970). Las pruebas no fueron sometidas a ebullición para evitar la termólisis del dominio tioléster (HOWARD et al, 1980; SOTRUPP-JENSEN et al, 1980), en su lugar se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Todas las corridas fueron efectuadas a 20 mA constantes. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la cromatografía de sefarosa-Zn, se demostró que la mayoría de las proteínas, no fueron retenidas por la matriz insoluble de afinidad al Zn (figura 1, pico 1); después de lavada la columna y su posterior eluida, se demostró que la α_2 -M humana fue retenida por la matriz de sefarosa-Zn (figura 1, pico 2).

El mismo procedimiento fue realizado para la α_2 -M de ovino de pelo identificada electroforéticamente al mismo nivel que la α_2 -M humana (figura 2, carriles 2 y 3), sin embargo, la α_2 -M de ovino de pelo no fue retenida por la columna de sefarosa-Zn; clara indicación que algunas características fisicoquímicas entre la

α_2 -M humana y de ovino de pelo varían, dificultando la purificación por el mismo método cromatográfico. El porcentaje de pureza con que se obtuvo la α_2 -M humana fue superior a 95 de acuerdo a los análisis electroforéticos realizados en forma denaturante (figura 2, carril 1), al ser comparada con el plasma normal humano y el plasma normal de ovino de pelo (figura 2, carriles 2 y 3), demostrándose un claro alineamiento concordante entre la banda de 180 kDa que corresponde a la α_2 -M humana purificada (figura 2, carril 1) y la banda de esta proteína presente en el plasma (figura 2, carril 2) la cual en estudios

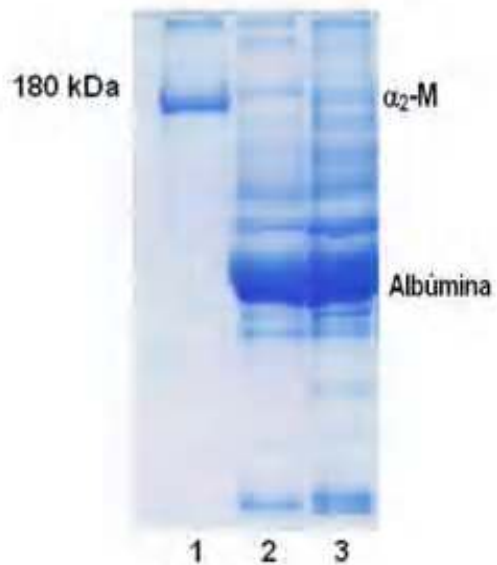


Figura 2. SDS PAGE 7.5% de plasmas normales. Carril 1. α_2 -M humana purificada; Carril 2. Plasma humano; Carril 3. Plasma ovino de pelo.

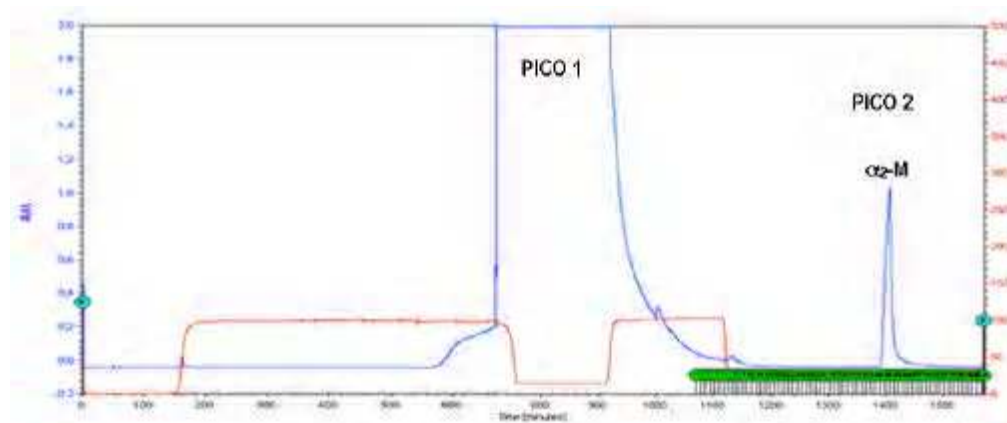


Figura 1. Perfil de la elución de la α_2 -M humana de columna de cromatografía de afinidad en sefarosa-Zn. La línea roja corresponde a la conductividad y la línea azul a la absorbancia a 280 nm.

previos había sido identificada como α_2 -M (VON SHOULTZ, STIGBRAND, 1973); las dos bandas anteriores presentaron una migración electroforética similar a la banda correspondiente de las α -Ms en el ovino de pelo (figura 2, carril 3), este resultado está en concordancia con el análisis electroforético nativo (gel no mostrado), donde se demostró la conversión de las bandas en estudio de 720 kDa (gel nativo) a 180 kDa (gel SDS-PAGE).

La adición del PEG al plasma de ovino de pelo hasta un porcentaje de saturación del 6%, generó un efecto de exclusión estérica (DOONAN, 1996); el primer precipitado fue redisolto, la electroforesis de dicha prueba demostró que la mayoría de las proteínas plasmáticas se precipitan a esta concentración de PEG (figura 3, carril 3), incluyendo una parte de la α_2 -M de ovino de pelo, al comparar el carril 3 con el 1, donde se puede apreciar claramente, que el precipitado obtenido en el primer fraccionamiento con el polímero orgánico de alto peso molecular, generó las mismas bandas del plasma normal (figura 3, carril 2). El perfil electroforético del segundo sobrenadante indica que la saturación a un 16% con PEG, no afecta la solubilidad de la albúmina ya que esta se encontró principalmente en el segundo sobrenadante (figura 3, carril 4). En el segundo precipitado se encontró la α_2 -M de ovino de pelo, como se demostró después de la redisolución y posterior electroforesis SDS-PAGE (figura 3, carril 5). Con este gel se demuestra que en el segundo precipitado obtenido, la banda correspondiente a la α_2 -M se encuentra rodeada de un número menor de contaminantes proteicos (figura 3, carril 5), eliminándose una gran cantidad de albúmina (figura 3, carril 4), la cual, por ser una proteína globular (DOCKAL et al, 1999), con un punto isoeléctrico (~5) (WIGG et al, 2003), similar al de la α_2 -M, puede llegar a interferir en posteriores procedimientos de purificación de α_2 -M de ovino de pelo.

Los factores que intervienen en la solubilidad de la α_2 -M en el plasma de ovino de pelo están influenciados por la superficie de la proteína, la cual contiene residuos ionizados, regiones

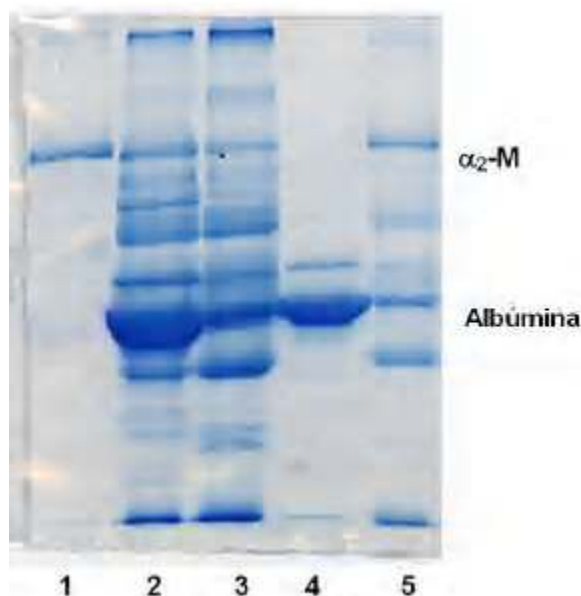


Figura 3. SDS PAGE 7.5% del fraccionamiento del plasma de ovino de pelo con PEG. Carril 1, α_2 -M humana purificada; Carril 2, Plasma humano; Carril 3, primer precipitado (6% PEG); Carril 4, segundo sobrenadante; Carril 5, segundo precipitado (16% PEG).

hidrófobas y regiones polares; estas regiones están en constante interacción con los diferentes componentes del plasma, lo anterior explica porqué esta proteína se precipita en ambas fracciones (INGHAM, 1990); si bien, no podemos comparar la pureza de la α_2 -M humana (figura 3, carril 1) con la de la α_2 -M de ovino de pelo (figura 3, carril 5) observamos que el aislamiento de la α_2 -M del plasma de ovino de pelo en el segundo precipitado es un paso seguro y positivo hacia una purificación eficiente, agregando otros procedimientos cromatográficos, como pueden ser intercambio iónico y exclusión por tamaño.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se comprobó que la α_2 -M de ovino de pelo no fue adsorbida por la matriz de sefarosa-Zn, en las condiciones experimentadas.

El fraccionamiento del plasma de ovino de pelo con PEG 6000, hasta una concentración final del 16%, es un método que facilita aislar la fracción del plasma de ovino de pelo que contiene la α_2 -M, eliminado una gran cantidad de otras proteínas

plasmáticas.

Se debe plantear una estrategia de purificación que permita obtener α_2 -M de ovino de pelo con una pureza superior al 95%.

Debido a la poca tendencia a denaturar las proteínas por parte del PEG, su bajo calor de disolución y el poco tiempo necesario para generar los precipitados (INGHAM, 1990), hacen que este método sea recomendable como un paso previo en métodos de purificación de esta proteína.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona (Colombia), bajo la dirección del Dr. Fredy Solano Ortega, al M.V.Z. Carlos Mario Duque por su apoyo con el manejo de los donantes animales en la Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona (Colombia) y la donación del plasma humano al Hospital Erasmo Meoz, Cúcuta (Colombia).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arbeláez LF, Stigbrand T (1997) Purification of Pregnancy Zone Protein and Its Receptor Binding Domain from Human Plasma. *Prot Exp and Pur* **10**: 301-308.

Barrera DI, Arbeláez LF (2006) α_2 -Macroglobulina, inhibidor de proteinasas altamente sofisticado. *Bistua* **4**: 56-69.

Barrera DI, Matheus LM, Stigbrand T and Arbeláez LF (2007) Proteolytic hydrolysis and purification of the LRP/alfa-2-macroglobulin receptor domain from α -macroglobulins. *Protein Expr Purif* **53**: 112-118.

Debanne MT, Reocz E, Dolovich J (1973) Serum Proteinase Inhibitors in the Blood Clearance of Subtilisin A. *Br J Exp Pathol* **54**: 571-582.

Deutsch DG, Mertz ET (1970) Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. *Science* **170**: 1095-1096.

Dockal M, Carter DC and R?ker F (1999) The Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin. *J Biol Chem* **274**: 29303–29310.

Doonan S, (1996). Bulk purification by fractional precipitation. In: *Protein purification protocols*. Vol 59, Humana Press.

Enghild JJ, Thøgersen IB, Roche PA, Pizzo SV (1989) A Conserved Region in Alpha-Macroglobulin Participates in Binding to the Mammalian α_2 -Macroglobulin Receptor. *Biochem J* **28**: 1406-1412.

Hall PK, Roberts RC (1978) Physical and Chemical Properties of Human Plasma α_2 – Macroglobulin. *Biochem J* **173**: 27-38.

Howard JB, Vermeulen M, Swenson RP (1980) Methylamine Reaction and Denaturation-Dependent Fragmentation of Complement 3. *J Biol Chem* **255**: 3820-3823.

Imber MJ, Pizzo SV (1981) Clearance and Binding of Two Electrophoretic “fast” Forms of Human α_2 -Macroglobulin. *J Biol Chem* **256**: 8134-8139.

Ingham KC, (1990). Precipitation of proteins with polyethylene glycol, In: *Methods in Enzymology*, Vol 182. Academic Press, Inc.

Jensen PE, Arbeláez LF, Vithaldas PS, Stigbrand T (1996) Preparation and Characterization of a C-Terminal Fragment of Pregnancy Zone Protein Corresponding to the Receptor-Binding Peptide from Human α_2 -Macroglobulin. *Biochim et Biophys Acta* **1293**: 254-258.

Jensen PEH, Sottrup-Jensen L (1986) Primary Structure of Human α_2 -Macroglobulin. Complete Disulfide Bridge Assignment and Localization of Two Interchain Bridges in the Dimeric Proteinase Binding Unit. *J Biol Chem* **261**: 15863-15869.

Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capotilla M and Hoffman JA (2000) Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 11427.

Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagneux M, and Kafatos FC (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* **104**: 709.

Levy F, Bulet P, Ehret-Sabatier L (2004) Proteomic Analysis of the Systemic Immune Response of *Drosophila*. *Molecular & Cellular Proteomics* **3**: 156-166.

Lin M, Sutherland DR, Horsfall W, Totty N, Yeo E, Nayar R, Wu XF and Schuh AC (2002) Cell surface antigen CD109 is a novel member of the α_2 -Macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins. *Blood* **99**: 1683.

Lundwall A, Malmheden I, Stålenheim G, Sjöquist J (1981) Isolation of Component C4 of Human Complement and its Polypeptide Chains. *Eur J Biochem* **117**: 141-146.

Roberts RC (1986) α_2 -Macroglobulin. *Rev Hematol* **2**: 124-129.

Sottrup-Jensen L, (1987) *The Plasma Proteins*. Academic Press, Orlando. Putman, F. W. (eds). Sottrup-Jensen L (1989) α -Macroglobulins: Structure, Shape, and Mechanism of Proteinase Complex Formation. *J Biol Chem* **264**: 11539-11542.

Sottrup-Jensen L, Hansen HF, Pedersen HS, Kristensen L (1990) Localization of Epsilon-lysyl-gamma-glutamyl Cross-links in Five Alpha2-Macroglobulin-Proteinase Complex. *J Biol Chem* **265**: 17727-177237.

Sottrup-Jensen L, Petersen TE, Magnusson S (1980) Thiolester in α_2 -Macroglobulin Cleaved During Proteinase Complex Formation. *FEBS Lett* **121**: 275-279.

Swenson RP, Howard JB. (1979) Characterization of Alkilamine-Sensitive Site in α_2 -Macroglobulin. *Prot Natl Acad Sci USA* **76**: 4313-4316.

van Dijk MC, Ziere GJ, Boers W, Linthorst C, Bijsterboch MK, Berkel TJ (1991) Recognition of Chylomicron Remnants and Beta-Migrating Very-Low-Density Lipoproteins by the Remnant Receptor of Parenchymal Liver Cells is Distinct from the Liver α_2 -Macroglobulin-Recognition Site. *Biochem J* **279**: 863-870.

Von Shoultz B, Stigbrand T (1973) Purification of the "Pregnancy Zone" Protein. *Acta Obstet Gynec Scand* **52**: 51-57.

Wiig H, Kolmannskog O, Tenstad O, Bert JL (2003) Effect of charge on interstitial distribution of albumin in rat dermis *in vitro*. *J Physiol* **550**: 505-514.