

Purificación de fibronectina mediante derivados de gelatina

R. M. Tolón*, T. Obispo, I. Alava, J. L. Navarro y L. J. García-Frade

Servicio de Hematología
Hospital Ramón y Cajal
Carretera de Colmenar Km 9,1
28034 Madrid

(Recibido el 10 de enero de 1986)

R. M. TOLON, T. OBISPO, I. ALAVA, J. L. NAVARRO and L. J. GARCÍA-FRADE. *Purification of Fibronectin Using Gelatin Derivates*. Rev. esp. Fisiol., 42 (4), 535-542, 1986

This work compares two distinct methods, column and batch, for the purification of fibronectin, from different plasma fractions, using gelatin and one of its derivates (Hemoce, Behring). The yields of both techniques at quantitative as well as qualitative levels (levels of immunologically active fibronectin), are evaluated. The data indicate that better conservation of immunological characteristics is obtained with the use of gelatin derivates (Hemoce). The plasma fraction does not have significant influence on the process yields.

Key words: Fibronectin. Hemoce. Fresh-frozen plasma. Aged plasma. Cryoprecipitate. Platelet concentrate.

La Fibronectina (Fn) es una glicoproteína dimérica de alto peso molecular, que se encuentra en forma soluble en el plasma y en otros fluidos del organismo, y en forma insoluble sobre muchas superficies celulares, tejido conectivo y membranas basales (4, 16). Se relaciona con procesos tan diversos como adhesión, morfología y propagación celular, organización del citoesqueleto, hemostasia y trombosis (17).

La infusión de expansores plasmáticos derivados de gelatina en pacientes, pro-

duce un descenso significativo de la tasa de Fn en plasma (1). MORGENTHALER (12) demuestra, que expansores de uso clínico como el Phisiogel, pueden utilizarse para purificar Fn en condiciones ventajosas.

El propósito de este trabajo es comparar los procedimientos de purificación utilizando gelatina (Ge) y Hemoce (He), a partir de diversas fracciones del plasma, así como estudiar las condiciones bajo las que se mantiene su reconocimiento inmunológico, dado su interés como proteína opsonica, y su posible utilidad en la terapéutica sustitutiva.

* Correspondencia: Rosa María Tolón.

Material y Métodos

Preparación de Sepharosa-Gelatina y Sepharosa-Hemoce. Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) y procesada según las indicaciones del producto (Pharmacia Fine Chemical Inc), se unió covalentemente tanto a gelatina (Merck) como a Hemoce (Behring), redisolviéndose en ambos casos en un tampón constituido por CO_3HNa 0,1 M, ClNa 0,5 M a pH 8,3, en una relación de 10 mg de proteína por ml de gel hidratado. Después de 2 h de incubación a temperatura ambiente y en agitación continua, se le sometió a un ciclo de lavados con el tampón citado anteriormente. A continuación, se incubó durante dos horas con tampón de bloqueo (etanolamina 1 M). El exceso de ligandos no unidos covalentemente se eliminó lavando el absorbente alternativamente con soluciones tampón de pH ácido (acetato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15 mM, pH 4) y básico (tampón de pH 8,3).

El gel de afinidad fue equilibrado y conservado en tampón PBS (ClNa 0,1 M, fosfato disódico dihidratado 0,007 M, fosfato monopotásico 0,002 M, pH 7,2) al que se adicionó 0,02 % de azida sódica.

Simultáneamente, se realizaron «batch» con un volumen de gel de afinidad de 3,5 ml, uniendo en 4 de ellos Ge y en otros 4 He. Para comprobar la afinidad de Ge y He por Sepharosa se eluyó la proteína mediante SDS 2 % (dodecil sulfato sódico) y se realizó la valoración de proteínas mediante el método de MAKWELL *et al.* (10).

Aislamiento de Fn. La purificación de Fn se realizó a partir de crioprecipitado (CR), concentrado plaquetario (CP), plasma fresco (PF) y plasma envejecido (PV). En todos los casos, la muestra fue calentada a 56°C, durante 5 min (6, 11), con objeto de precipitar la mayor parte del fibrinógeno presente. Se centrifugó a 1.500 g, durante 15 min, a 15°C.

Se realizó la separación en dos columnas con las características siguientes: 0,9/15

cm y 1,5/25 cm (diámetro interno/altura). En cada caso se absorbió un volumen de muestra equivalente al doble del volumen de la columna (14 y 70 ml respectivamente). La purificación en «batch» se realizó a partir de 7 ml de plasma fresco. Se lavaron en todos los casos con tampón PBS (de 3 a 4 veces el volumen de la columna o del «batch»). La elución se efectuó con PBS, citrato sódico 10 mM a pH 5,5, obteniéndose el perfil de elución a 50 mV y D.O. 0,3. Las fracciones conteniendo Fn se reunieron y dializaron a 4°C frente a agua bidestilada, almacenándose las muestras liofilizadas a -20°C, para su posterior utilización.

Electroforesis en SDS-PAGE. Las muestras conteniendo Fn se resuspendieron a una concentración de 2 mg/ml en el tampón 0,01 M Tris-ClH, 0,01 M EDTA, 2 % dodecil sulfato sódico; las proteínas fueron reducidas con β -mercaptoetanol 5 % y calentadas durante 5 min a 100°C. La valoración de proteínas se llevó a cabo por el método de LOWRY *et al.* (9) y las electroforesis en gel de poliacrilamida según el sistema de LAEMMLI (7), con un gradiente del 7 al 14 %, tiñéndose las placas con azul de Coomassie.

Identificación inmunológica de Fn. Se realizó una electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida, en las condiciones descritas en el apartado anterior. Una vez separadas, las proteínas fueron transferidas a una tira de papel de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,45 mm, depositando sobre ésta el gel de poliacrilamida, incubado previamente en el mismo tampón en el que se realizó la electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, pH 8,3), durante 15 min. La tira de papel de nitrocelulosa había sido humedecida previamente con este mismo tampón, y colocada sobre una lámina de teflón, evitando la formación de burbujas de aire entre ellas, la transferencia electroforética de las proteínas se realizó en una cámara de

electroforesis durante 3 h a 48 V (14, 15).

Una vez verificada la transferencia de proteínas a la tira de nitrocelulosa, éstas fueron reveladas con solución amido black (amido black 0,1 %, isopropanol 25 % y ácido acético 10 %).

Transferidas las proteínas mediante la técnica del *Electroblotting* anteriormente descrita, se incubaron en un tampón Tris 10 mM, ClNa 0,9 %, BSA (albúmina de suero bovino) 3 %, pH 7,4, durante 1 h en agitación continua, y a 40°C.

Tras la incubación, la tira de nitrocelulosa (conteniendo las proteínas) es transferida a una solución del tampón anterior más el anticuerpo antifibronectina (Behring) a una concentración del 0,3 % (v/v), incubándose durante 90 min a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido es eliminado mediante lavados con solución salina. A continuación, la tira de nitrocelulosa es incubada 3 h en el tampón anteriormente descrito, conteniendo Proteína A- I^{125} (4×10^6 c.p.m./ml) obtenida siguiendo el método de GREENWOOD *et al.* (3). Una vez finalizada la incubación, se lava la tira sucesivas veces con solución salina, se seca y se somete a autorradiografía durante un período de 48 h (2).

La caracterización cuantitativa se realizó por el método de inmuno-electroforesis de LAURELL (8) en agarosa al 1 %, conteniendo 1,8 % de antisuero de conejo anti-fibronectina humana, durante 18 h a 100 V, utilizando tampón barbital, pH 8,6. Posteriormente, las placas se secaron y tiñeron con azul de Coomassie.

Como referencia se utilizó un estándar de fibronectina (Behring) con una concentración de 295 μ g/ml.

Resultados

El perfil de elución de la cromatografía sobre las columnas de Sepharosa-Gelatina y Sepharosa-Hemoce (fig. 1) muestra la existencia de dos picos. El primero de ellos corresponde a las proteínas no retenidas en la columna, que según las placas de electroforesis contengan la mayor parte de las proteínas plasmáticas presentes en la fracción inicial. Es notable destacar la ausencia de Fn en este pico, comprobada tanto por electroforesis como por técnicas inmuno-electroforéticas. La electroforesis del segundo pico dio como resultado una banda única con un Pm correspondiente al de la

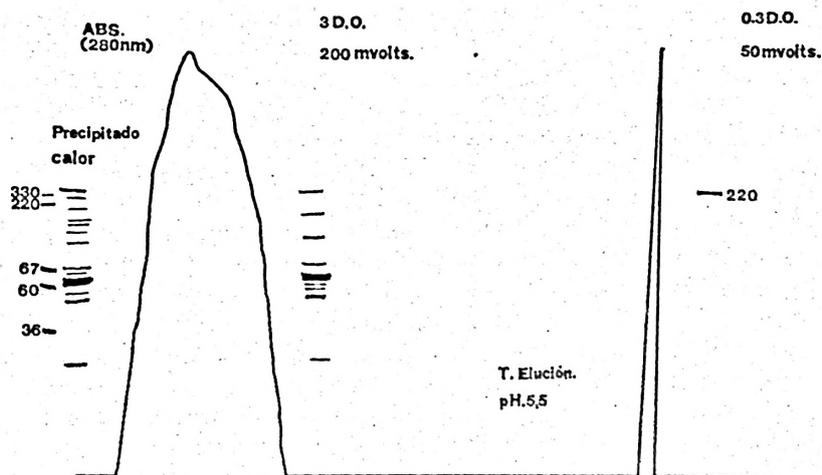


Fig. 1. Perfil de elución de cromatografía de afinidad y electroforesis de las distintas fracciones del proceso.

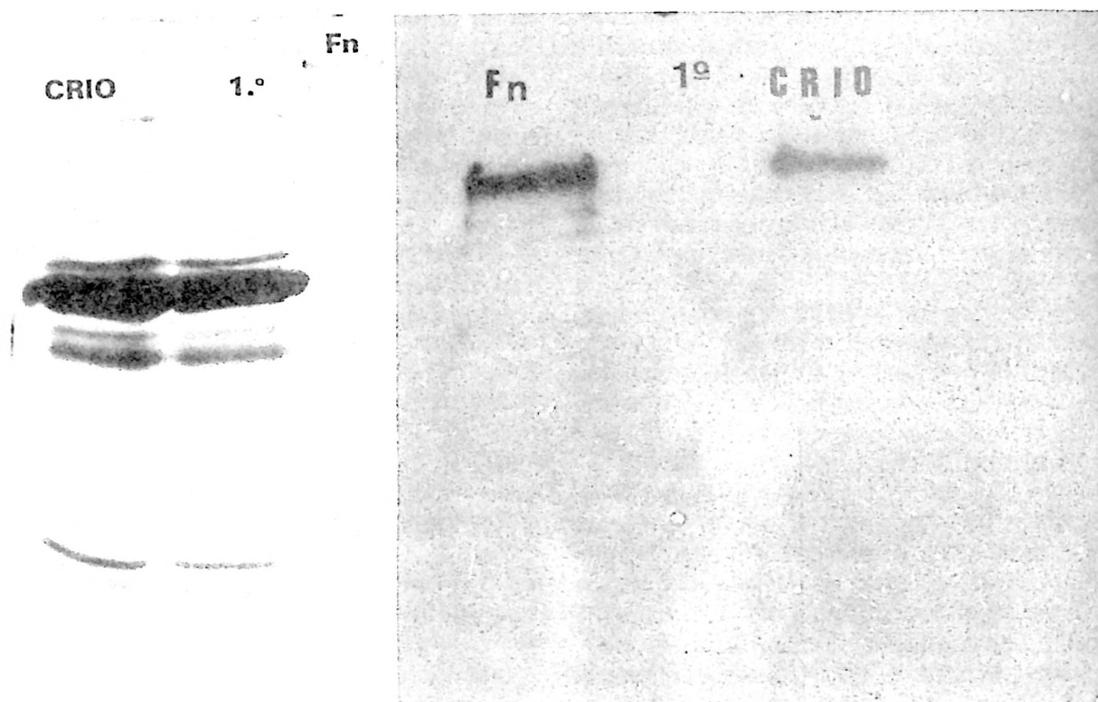


Fig. 2. Electroforesis y electroblotting de la fracción inicial de crioprecipitado (CRI), primer pico (1.º) y segundo pico (Fn) de elución de la cromatografía de afinidad.

Fn, identificándose mediante técnicas inmuno-electroforéticas (fig. 2).

Tanto los valores de proteína total (método de Lowry), como los de Fn (método de Laurell) determinados en las fracciones iniciales de concentrado plaquetario (CP), crioprecipitado (CR), plasma fresco (PF) y plasma envejecido (PV), se corresponden con los valores medios de una población control. En la tabla I se especifican los valores obtenidos de Fn purificada mediante columna Sepharosa-Hemoce y Sepharosa-Gelatina, tanto por el método de Lowry como por el de Laurell; sin embargo, para una mayor comprensión de los resultados se han referido éstos como tanto por ciento de rendimiento total.

La valoración de proteínas del segundo pico de elución obtenido daba para la columna de Sepharosa-Gelatina un rendi-

miento del 64-74 % y para Sepharosa-Hemoce del 46-97 %.

Simultáneamente se realizaron una serie de «batch» con gelatina y Hemoce para la purificación de Fn. Los resultados de estos «batch» (tabla II) son comparables con los obtenidos en columna (tabla I) para la misma fracción de plasma (PF). Así, los valores del rendimiento en la obtención de Fn son iguales para los «batch» de Sepharosa-Hemoce y Sepharosa-Gelatina; mientras que el rendimiento de Fn reconocida por el método de Laurell es mayor para los «batch» en los que se utilizó Sepharosa-Hemoce que para aquellos en que se utilizó Sepharosa-Gelatina.

Comparándose el rendimiento obtenido en columna y en «batch» se observa que el rendimiento en la fracción proteica conteniendo Fn es sensiblemente mayor

Tabla I. Rendimiento de la purificación de Fibronectina en columna.

Fracción de plasma	Volumen inicial (ml)	Prot. totales antes ^A purificación (mg)	Fibronect. antes ^B purificación (mg)	Fibronect. ^A obtenida (mg)	Fibronect. ^B obtenida (mg)	prot. (%) rec. antígen.	Rendimiento (%)
SEPHAROSA-GELATINA							
Crioprecipitado	50	3.300	20,5	13,3	N.D.	65	N.D.
Conc. plaquetario	60	5.250	17,3	11,1	1,2	64	7
Plasma fresco	65	4.062	20,1	14,9	2,3	74	11
Plasma envejecido	75	3.967	27,5	19,8	3	72	11
SEPHAROSA-HEMOCE							
Crioprecipitado	14	991	3,1	3	131,9 µg	97	4
Conc. plaquetario	14	1.225	4	3,6	13,1	90	0,3
Plasma fresco	14	859	3,7	2	9,4	54	2,5
Plasma envejecido	14	1.761	2,6	1,2	7,7	46	0,3

N.D. No determinado. ^A Determinación de proteínas por método de Lowry. ^B Determinación de proteínas por método de Laurell.

Tabla II. Rendimiento de la purificación de Fibronectina en «batch» de plasma fresco. Valores medios de 4 determinaciones. ^A Determinación de proteínas por método de Lowry. ^B Determinación de proteínas por método de Laurell.

Prot. totales antes ^A purificación (mg)	Fibronectina antes ^B purificación (mg)	Proteína total ^A obtenida (mg)	Fibronectina ^B obtenida (mg)	prot. (%) rec. antígen.	Rendimiento (%)
SEPHAROSA-GELATINA					
7,2 ± 0	2 ± 0	0,78 ± 0,15	0,320 ± 0,13	39 ± 7	16 ± 6
SEPHAROSA-HEMOCE					
7,2 ± 0	2 ± 0	0,78 ± 0,19	0,417 ± 0,79	39 ± 9	21 ± 4

Tabla III. Afinidad de sepharosa y fibronectina por gelatina y hemoce mediante el método de «batch» en la fracción de plasma fresco.

Valores medios de 4 determinaciones.

	Gelatina unida a sepharosa (%)	Gelat./Sepha. (mg)	Fibronectina/Gelat. ¹ (mg)	Fibronectina/Gelat. ² (mg)
Sepharosa-gelatina	6 ± 0,7	2 ± 0,28	0,37 ± 0,1	0,16 ± 0,07
	Hemoce unido sepharosa (%)	Hemc./Sepha. (mg)	Fibronectina/Hemc. ¹ (mg)	Fibronectina/Hemc. ² (mg)
Sepharosa-hemoce	5 ± 0,8	1,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,07

¹ Determinación de proteínas por método de Lowry.² Determinación de proteínas por método de Laurell.

para la columna, mientras que el reconocimiento antigénico era mayor para la Fn obtenida mediante el método de «batch», tanto en Sepharosa-Hemoce como en Sepharosa-Gelatina.

En la tabla III se muestra la unión de gelatina y Hemoce a la Sepharosa, así como la afinidad de la Fn por estos dos compuestos. En ella se pone de manifiesto cómo la unión de gelatina y Hemoce a Sepharosa, está comprendida entre un 4-7 %.

La unión de gelatina a Sepharosa es superior a la que tiene lugar con Hemoce. Si bien, la cantidad de Fn que se une a la gelatina es sensiblemente inferior a la que se une al Hemoce; ocurriendo lo mismo con la cantidad de Fn obtenida por el método de «batch» y reconocida mediante Laurell.

Discusión

Los resultados muestran cómo la eliminación de fibrinógeno por calentamiento del plasma permite la separación en un paso único de Fn altamente purificada, desde el punto de vista cuantitativo.

Aunque se pueden conseguir porcentajes de purificación del 97 % (partiendo de crioprecipitado, utilizando Sepharosa-Hemoce), la pérdida en un 93 % del reconocimiento inmunológico de la Fn obtenida plantea la duda de la conservación funcio-

nal de dicha proteína y, por tanto, su utilización como base de un tratamiento sustitutivo. Asimismo, se ha comprobado que la afinidad de la Fn por la matriz de Sepharosa-Hemoce es comparable con la de Sepharosa-Gelatina, obteniéndose un rendimiento igual o superior al de ésta.

La utilización de la matriz Sepharosa-Hemoce permite recuperaciones de la actividad inmunológica de un 24 %, lo cual indica la existencia de un mayor porcentaje de Fn en su conformación nativa. Este hecho puede deberse a que la liberación de la Fn unida al Hemoce resulta más fácil que la unida a la gelatina.

Si bien la unión de Hemoce a Sepharosa parece menor que en el caso de gelatina, se ha comprobado (tabla III) una mayor proporción de Fn unida a la matriz Sepharosa-Hemoce, manteniendo su conformación nativa. Por ello, esta matriz podría resultar más interesante a la hora de la purificación de la Fn.

No se han encontrado diferencias significativas según las distintas fracciones de plasma utilizadas (no obstante el rendimiento es mayor al utilizar crioprecipitados); contrariamente a lo descrito por HOROWITZ (5).

La obtención de Fn con actividad inmunológica es de suma importancia, ya que el reconocimiento inmunológico de esta proteína en su estado nativo es imprescindible

para el mantenimiento de sus propiedades fisiológicas.

Por tanto, es recomendable la utilización de derivados de gelatina (Hemoce y similares), para obtener Fn purificada manteniendo su conformación nativa.

Agradecimientos

A la Dra. Consuelo Jiménez por sus inestimables consejos en la discusión de este trabajo.

Resumen

Se comparan dos métodos distintos, columna y «batch», de purificación de fibronectina, utilizando gelatina y uno de sus derivados (Hemoce, Behring), a partir de diversas fracciones plasmáticas. Se valoran los rendimientos de ambas técnicas, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (niveles de fibronectina reconocible inmunológicamente). Los resultados indican que la mejor conservación de las características inmunológicas se obtienen con el uso de derivados de gelatina (Hemoce). La fracción de plasma utilizada no parece influir significativamente en el rendimiento del proceso.

Bibliografía

1. Brodin, B., Hesselvik, F. y Von Schenck, H.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **44**, 529-533, 1984.
2. Burnette, W. N.: *Anal. Biochem.*, **15**, 45-52, 1966.
3. Greenwood, F. C., Hunter, N. H. y Glover, J. S.: *Biochem. J.*, **89**, 114-121, 1963.
4. Hynes, R. O. y Yamada, K. M.: *J. Cell. Biol.*, **95**, 369-377, 1982.
5. Horowitz, B., Lippin, M. Y., Chang, R., Sholman, J., Vandersande, J., Stryker, M. H., y Woods, K. R.: *Transfusion*, **24**, 357-362, 1984.
6. Keski-Oja, J., Mosher, D. F. y Vaheri, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 699-706, 1977.
7. Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
8. Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, **15**, 45-52, 1966.
9. Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
10. Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E.: *Anal. Biochem.*, **87**, 206-210, 1978.
11. Molnar, J., Gelder, F. B., Lai, M. Z., Siefring, G. E., Jr., Credo, R. B. y Lorana, L.: *Biochemistry*, **18**, 3909-3916, 1979.
12. Morgenthaler, J. J., Baillo, P. y Friedli, H.: *Vox Sang.*, **47**, 41-46, 1984.
13. Mosesson, M. W. y Amrani, D. L.: *Blood*, **56**, 145-158, 1980.
14. Renart, J., Reiser, J. y Stark, G. R.: *Proc. Natl. Sci. USA*, **76**, 3116-3120, 1979.
15. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, 1979.
16. Vaheri, A. y Mosher, D. F.: *Biochem. Biophys. Acta*, **516**, 1-25, 1978.
17. Yamada, K. M.: *J. Cell. Biol.*, **95**, 369-377, 1982.

