



Establiment de metodologia analítica per a la purificació, separació i caracterització de biomarcadors proteics de malalties neurodegeneratives

Marta Borges Álvarez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

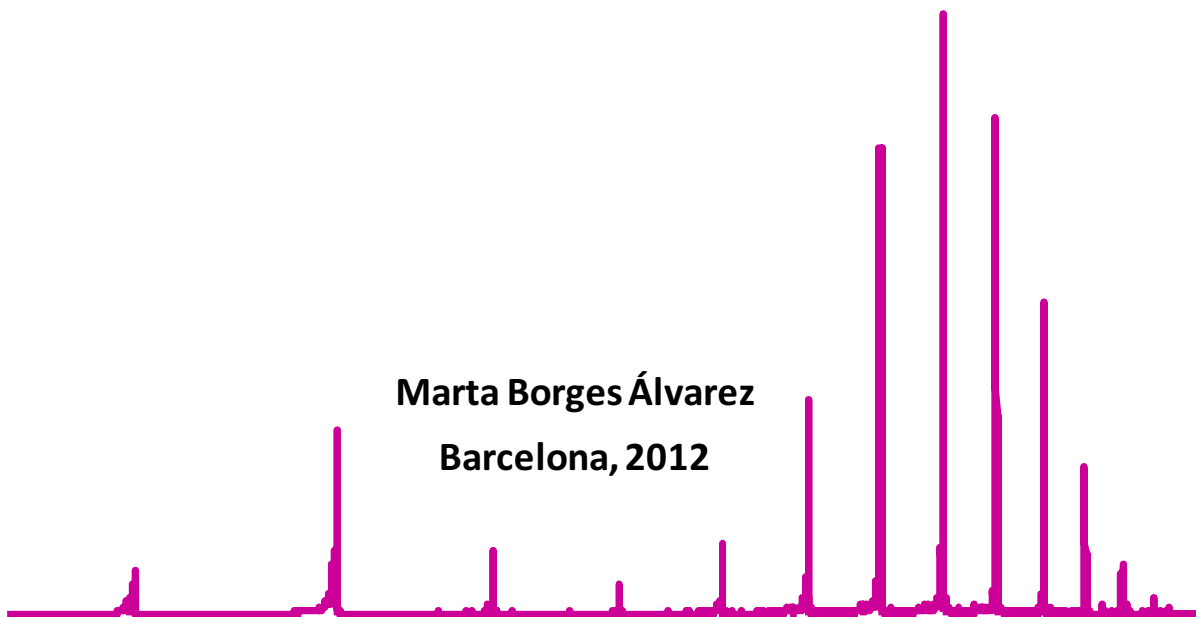
U

B

Departament de Química Analítica
Tesi Doctoral

**Establiment de metodologia analítica
per a la purificació, separació i
caracterització de biomarcadors proteics
de malalties neurodegeneratives**

Marta Borges Álvarez
Barcelona, 2012





UNIVERSITAT DE BARCELONA



DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
Facultat de Química

Programa de Doctorat:
Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució
(Bienni: 2006-2008)

ESTABLIMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER A LA
PURIFICACIÓ, SEPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE
BIOMARCADORS PROTEICS DE MALALTIES
NEURODEGENERATIVES

Memòria presentada per Marta Borges Álvarez per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Directors: Dra. Victòria Sanz Nebot i Dr. Fernando J. Benavente Moreno.

Barcelona, Setembre 2012

La Dra. Victòria Sanz Nebot, Professora Titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i el Dr. Fernando J. Benavente Moreno, Professor Agregat del mateix departament,

FAN CONSTAR

Que el present treball d'investigació titulat: "Establiment de metodologia analítica per a la purificació, separació i caracterització de biomarcadors proteics de malalties neurodegeneratives", ha estat realitzat sota la nostra direcció per la Sra. Marta Borges Álvarez en els laboratoris del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per la citada doctoranda.

I per a que així consti, expedim el present certificat.

Barcelona, Setembre 2012

Dra. Victòria Sanz Nebot

Dr. Fernando J. Benavente Moreno

“El que lee mucho y anda mucho,
ve mucho y sabe mucho”

Miguel de Cervantes

Als meus pares

A l'Ivan

AGRAÏMENTS

PER FI! No creia que arribaria mai aquest moment! Sí, Sí, Sí, ja puc escriure els agraïments! Com que es possible que el meu cap em faci una juguesca (tot i que m'he fet una llista), m'agradaria començar donant les gràcies a totes aquelles persones que han fet possible que ara mateix estigui davant l'ordinador escrivint aquestes ratlles.

En primer lloc, voldria agrair al Dr. José Barbosa Torralbo, Catedràtic del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, la confiança que va dipositar en mi al donar-me l'oportunitat de formar part del seu grup de recerca.

En segon lloc, voldria agrair als meus directors de tesi, la Dra. Victòria Sanz, Professora Titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i al Dr. Fernando J. Benavente, professor agregat del mateix departament, el recolzament i l'orientació rebuda en tots aquests anys i la confiança que sempre m'han demostrat.

Quería darte las gracias, Fernando, porque sin tu ayuda, creo que ahora mismo no estaría escribiendo estas líneas y habría tirado la toalla hace mucho tiempo. Gracias por creer que "esto" iba a salir adelante, por haber estado siempre disponible cuando he necesitado ayuda y por animarme a continuar aunque los resultados no fuesen los esperados. Gracias por tus sugerencias, ideas, dedicación y paciencia. Has sido, y sigues siendo, un ejemplo de esfuerzo, tenacidad y constancia.

També voldria donar les gràcies a totes les meves companyes (ho sento, sempre hem estat majoria), amb qui he compartit laboratori (i perquè negar-ho, alguna que altra "discussió"), tots els bons records que me'n duc d'aquesta etapa de la meva vida. Espero que no em deixi a ningú. A les veteranes (Estela, Pilu i Elena) per acompanyar-me en els primers passos pel laboratori. Estela, moltes gràcies per les teves aportacions, suggeriments i per no negar-me mai la teva ajuda. MI PILI, gracias por todo. ¡No sólo me abriste las puertas del laboratorio, sino otras que son mucho más importantes para mí, tu amistad! Gracias por estar siempre ahí y nunca negarme tu ayuda (ni dentro ni fuera del laboratorio). Gracias por todos los buenos momentos que hemos vivido juntas (y los no tan buenos, pero que igualmente me llenan de felicidad) y por los que nos quedan por vivir. ¡Gracias! Míriam i Nuri (de la competència d'Electroanàlisi), ja sé que la vida ens ha fet seguir camins diferents, però tinc moments molt bons a la memòria. Sandra, moltes gràcies per l'amistat que

em vas donar. Vas ser un dels pilars més importants per a mi en els moments que ho vaig necessitar. Moltes gràcies, i a Carlos també, per haver-me presentat a la persona que més feliç em fa. A vegades maleeixo haver-me trencat el genoll. Sergio, ¡te voy a matar! Mira que hacernos limpiar a Silvia y a mí los masas, ¡y ahora bien que lo haces tú! Me alegro mucho por ti. Gracias por haber hecho del laboratorio un lugar de trabajo más divertido y por los días de fiesta. Ahhhh! que no em deixi a les noves promeses del laboratori: Albert, Lorena i Laura. Gràcies per permetre'm exercir de "veterana", pels riures que hem compartit i l'ajuda que m'heu donat (moltes vegades a distància: "em pots mirar això, em pots enviar això altre,..."). Rafa, gracias por aportar una visión distinta, digamos que gallega, a las tertulias del "tupper". Mandonguilles? Ahhhh! Silvia, ¡que no me he olvidado de ti! Gracias por tu amistad y por ser como eres. Siempre he valorado, valoro y valoraré tu sinceridad, tus consejos, tu opinión y tu forma clara de decir las cosas. Todo un ejemplo a seguir. Sin tu ayuda, muchas veces las habría pasado canutas. ¡Raquel! Recuerdo les llargues tardes, una al davant de l'altra, mirant-nos fixament als ulls amb una melòdica i harmoniosa música d'acompanyament: el soroll de les bombes de buit dels masses! Quan vas entrar al laboratori, no pensava que et convertiries en una persona tan important per a mi. Gràcies per escoltar-me, donar-me consells, alguna que altra "bronquilla" i compartir els teus coneixements amb mi. M'has fet créixer com a persona. Seràs una professora "collonuda". Per últim, voldria recordar a tots i a totes les companyes que han passat fugaçment pel laboratori (fent estades, pràctiques, etc) i han contribuït a crear un ambient de treball distès i agradable. GRÀCIES A TOTES per haver-me permès estar tant a gust al laboratori i us desitjo, amb tota l'ànima, que aconseguiu tot allò que us proposeu. No vull oblidar-me'n dels nois d'Enginyeria Química: gràcies pels bons moments compartits als Menjadors Universitaris.

Aquest treball tampoc hagués estat possible sense la col·laboració de molts companys. Espero recordar me'n de tots. Gràcies a la Unitat de Cromatografia (el recol·lector de fraccions em va salvar la vida) i a la Unitat de Confocal del Parc Científic (sense la vostra centrífuga no hagués pogut tirar endavant el meu Màster). Tampoc no sé que hauria estat de mi sense la col·laboració, consells i ajuda de la Dra. Mercè Márquez del Banc de Teixits Animals de Catalunya; la Dra. Marta Vilaseca de l'Institut de Recerca Biomèdica, la Dra. Irene Fernández del Servei d'Espectrometria de Masses de la UB i la Dra. Mónica Povedano del Instituto de Neuropatologia del

Hospital Universitari de Bellvitge. Gràcies al Dr. Santiago Hernández del Departament de Química Analítica i al Dr. Vicent Casadó del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UB i als seus col·laboradors, per permetre'm fer servir la infraestructura disponible i per l'hospitalitat rebuda quan m'han hagut d'acollir als seus laboratoris. També voldria agrair la disponibilitat i ajuda de la meua vampiressa particular, Noemí Martínez, per extreure'm sang sempre que ho he necessitat. Moltes gràcies a tots els professors, professores i companys del Departament de Química Analítica per haver fet la meua estada en aquesta casa més agradable. No voldria descuidar-me de donar les gràcies a tot el Personal d'Administració i Serveis que m'ha ajudat a que les meves tramitacions fossin més senzilles. En concret voldria destacar la Sra. Nuria Sánchez i la Sra. Ana Salamià per ajudar-me sempre que els hi he demanat i al Sr. Íñigo Aura per fer "volar" les comandes.

Què hauria estat de mi sense l'amistat i el suport dels meus amics? Gracias a tod@s ell@s por formar parte de mi tesoro personal. Pili, aunque me repita, muchas gracias por ser como eres y por permitirme formar parte de tu vida. Toni, no cambies nunca. Muchas gracias por tu apoyo y por haberme abierto las puertas de tu casa junto con tu "sister". Pero una cosa: "Mírame a los ojos y dime la verdad, ¿Eh?". Row, Ire y Gem, "¿Dónde está Marta?". ¡Todavía estoy aquí, delante del ordenador, ya desvarío! ¿Quién diría que aquel viaje que empezó en Torredembarra iba a forjar esta maravillosa amistad? Ire, ¡que ahora ya somos seis! (¡todavía no me lo creo!). Dedi, me alegro mucho por ti, te lo mereces y gracias por apoyarme cuando lo necesité. ¿Y qué decir de mi Anna? Aunque ahora estés lejos, nunca me he sentido sola. Gracias por enseñarme qué es tener confianza en alguien y por poder compartir contigo todas mis penas y alegrías. A todos vosotros, gracias por no haberme hecho sentir una extraña cuando llegué y por darme lo que más aprecio de vosotros, vuestra amistad. Xavi, a vegades et renyo com si fossis el meu germà petit. Gràcies per la teua confiança i amistat. Carmen y Virginia, muchas gracias por acogerme cuando lo necesité. Os deseo lo mejor del mundo. A tots vosaltres, us estimo i moltes gràcies per tot.

Tampoc m'agradaria deixar d'agrair a totes aquelles persones amb les quals he conviscut al llarg de la meua vida i que, en diferent grau, han forjat el meu caràcter i m'han permès arribar on estic. Als profes i companys del "cole"; a les "compis" de rítmica; als professors de la "uni"; al grup del Centre de Projectió Tèrmica de la UB

(per mostrar-me que m'agradava més la Química Analítica que no pas la Ciència de Materials); els consells i punt de vista pràctics dels companys de Control de Qualitat d'Antonio Puig S. A.; als companys de gimnàs (Defensa, Dansa del Ventre i Balls de Saló). Gràcies pels bons, i no tan bons, moments compartits.

¡MADRE! ¡MICHAEL! ¡Que ya acabo la tesis! ¡Os quiero mucho! Us estimo molt! Sou els millors pares que podia haver tingut! Gracias por apoyarme siempre que lo he necesitado y darme un empujón cuando me han asaltado las dudas. Sin vosotros no sería quien soy, ni habría llegado hasta aquí. Gracias por ser mis mejores amigos y habérmelo dado todo. Esta tesis también es vuestra, ya que sin vuestro apoyo y ánimos, creo que habría desistido. Gracias por correr conmigo la carrera de fondo de la vida y avituallarme siempre que lo he necesitado. OS QUIERO. US ESTIMO. A les meves iaies i avis. Mai ningú m'hauria dit que us trobaria tant a faltar. Ah! Que no m'he oblidat de tu! Guau, guau, guau: por tu compañía y "obligarme" a salir a dar vueltas, que muchas veces me han ayudado a pensar. I a l'Ivan: el meu "nene", el meu "petuto", el meu amor. T'ESTIMO. Gràcies per fer-me tan feliç, per voler compartir la teva vida amb mi, per deixar de ser tu i jo i passar a ser nosaltres i per tot el suport que em dones dia a dia. Ets un dels millors regals que m'ha fet la vida.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

A

A β	Proteïna beta amiloide
AC	Cromatografia d'afinitat
ADP	Difosfat d'adenosina o adenosinadifosfat
AGP	Alfa 1-àcid glicoproteïna
Ala-Met	[Ala]-Met-encefalina
ALB	Ovoalbúmina
ALS	Esclerosi lateral amiotròfica

Aminoàcids

Aminoàcid	Codi (3 lletres)	Codi (1 lletra)
Àcid aspàrtic	Asp	D
Àcid glutàmic	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteïna	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptòfan	Trp	W
Valina	Val	V

Apo-SOD-1

Superòxid dismutasa 1 desmetal·lada

B

BGE	Electròlit de separació (<i>background electrolyte</i>)
BPE	Electroferograma del pic base
BSA	Albúmina de sèrum boví
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina

C

CA	Anhidrasa carbònica
CCS	Secció transversal de col·lisió
CDG	Defectes congènits de glicosilació
CE	Electroforesi capil·lar
CEC	Electrocromatografia capil·lar
CE-ESI-MS	CE acoblada en línia a l'ESI-MS
CE-IT-MS	CE-ESI-MS amb analitzador d'IT
CE-MS	CE acoblada en línia a la MS (en general, CE-ESI-MS)
CE-oa-TOF-MS	CE-ESI-MS amb un analitzador d'oa-TOF
CE-TOF-MS	CE-ESI-MS amb un analitzador de TOF
CE-UV	CE amb detecció per UV
CGE	CE en gel
CIEF	Isoelectroenfocament capil·lar
CJ	Malaltia de Creutzfeldt-Jakob
Cu,Zn-SOD-1	Superòxid dismutasa 1 parcialment metal·lada (monòmer)
Cu ₂ ,Zn ₂ -SOD-1	Superòxid dismutasa 1 totalment metal·lada (dímer)
CZE	CE de zona (en general, CE)

D

Da	Dalton
Des-Tyr	des-Tyr-Leu-encefalina
DHB	Àcid 2,5-dihidroxibenzoic
DNA	Àcid desoxirribonucleic
2D-PAGE	PAGE en 2 dimensions
DTIMS	Espectrometria de mobilitat iònica de temps de deriva (<i>Drift-Time ion mobility spectrometry</i>)
Dyn	Dinorfina A (1-7)

E

EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
EIE	Electroferograma de l'ió extret
EIM	Mobilitat iònica extreta
ELISA	Assaig d'immunoabsorció enzimàtica
Endo	Endomorfina 1
EOF	Flux electroosmòtic
EPO	Eritropoetina
ESI	Ionització per electrosprai
ESI-MS	Espectrometria de masses amb font d'ESI

F

FA	Àcid fòrmic
FAD	Dinucleòtid de flavina i adenina
fALS	Esclerosi lateral amiotròfica familiar
FFI	Insomni fatal familiar
FMN	Mononucleòtid de flavina
FT-ICR	Analitzador de ressonància ciclotrònica d'ions amb transformada de fourier
FWHM	Amplada de pic a mitja alçada (<i>full width at half maximum</i>)

G

GE	Electroforesi en gel
GSH	Glutatió
GSS	Malaltia de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

H

HAc	Àcid acètic
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina subunitat A
HbB	Hemoglobina subunitat B
HILIC	Cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
HPLC-MS	HPLC acoblada en línia a la MS (en general, HPLC-ESI-MS)
HTT	Huntingtina
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge

I

IAC	Cromatografia d'immunoafinitat
IDA	Àcid iminodiacètic
IEC	Cromatografia de bescanvi iònic
IEF	Isoelectroenfocament
IM	Mobilitat iònica
IMAC	Cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat
IM-MS	Espectrometria de masses de mobilitat iònica
iPrOH	Isopropanol
IT	Analitzador de trampa d'ions

L

LC	Cromatografia de líquids (en general, HPLC)
LC-ESI-MS	LC acoblada en línia a l'ESI-MS
LC-MS	LC acoblada en línia a la MS (en general, LC-ESI-MS)

LOD Límit de detecció

M

M Massa molecular (estricament massa molecular relativa sinó s'indica el contrari)

m/z Relació massa càrrega

MALDI Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu

MALDI-TOF-MS Espectrometria de masses amb font de MALDI i analitzador de TOF

m_e (μ_e) Mobilitat electroforètica

Met Met-encefalina

Met-NH₂ Met-encefalinamida

m-HPLC (μ -HPLC) Micro-HPLC

MS Espectrometria de masses

MS/MS Espectrometria de masses en tàndem

MSⁿ n etapes d'MS/MS

MWCO Tall per pes molecular (*molecular weight cut off*)

N

n-ESI Nano ESI

n-ESI-IM-MS IM-MS amb font de n-ESI

n-HPLC Nano-HPLC

O

oa Acceleració ortogonal

O-GlcNAc N-acetilglucosamina unida per enllaç o-glicosídic

P

PAGE Electroforesi en gel de poliacrilamida

PCR Reacció en cadena de la polimerasa

pI Punt isoelèctric

PrP Proteïna priònica o prió

PrP^C Prió cel·lular

PrP^{Sc} Prió patològic

PSA Antigen prostàtic específic

PTM Modificació post-transduccional

Q

Q Analitzador de quadrupol senzill

QqQ Analitzador de triple quadrupol

R

RNA	Àcid ribonucleic
RNase A	Ribonucleasa A de pàncrees boví
RPLC	LC de fase inversa (en general, HPLC de fase inversa)
rPrP	Prió recombinant
Rs	Resolució

S

S/N	Relació senyal-soroll
SA	Àcid sinapínic
Sc	<i>Scrapie</i> (de l'anglès, <i>scraping</i>)
SDS	Dodecil sulfat de sodi
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat de sodi
SEC	Cromatografia d'exclusió molecular o filtració en gel
SOD-1	Superòxid dismutasa 1
SRM/MRM	Monitorització de reacció múltiple/seleccionada

T

Tf	Transferrina
TFA	Àcid trifluoroacètic
TOF	Analitzador de temps de vol
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissible
TTR	Transtiretina

U

UV	Espectrofotometria ultraviolada
----	---------------------------------

W

WB	Western blot
----	--------------

Z

z	Càrrega elèctrica
---	-------------------

ÍNDEX

ÍNDEX

	Pàgina
OBJECTIU	1
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. Genoma, transcriptoma, proteoma i metaboloma	8
1.2. Biomarcadors	8
1.3. Pèptids i proteïnes	9
1.3.1. Hormones peptídiques	11
1.3.2. Enzims. Metal·loproteïnes	11
1.3.3. Modificacions post-transduccionals (PTMs).....	12
1.3.3.1. Glicosilació	12
1.3.4. Oligòmers i agregats	14
1.3.4.1. Agregació de proteïnes. Malalties neurodegeneratives	15
1.4. Anàlisi de pèptids i proteïnes	15
1.4.1. Tècniques de lisi cel·lular i extracció de proteïnes	16
1.4.2. Tècniques de purificació i anàlisi tradicionals	17
1.4.2.1. Solubilitat.....	17
1.4.2.2. Centrifugació	17
1.4.2.3. Diàlisi i diafiltració	18
1.4.2.4. Cromatografia de líquids (LC)	18
Cromatografia de bescanvi iònic (IEC).....	19
Cromatografia hidrofòbica	19
Cromatografia d'afinitat (AC)	19
Cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC).....	19
Cromatografia d'exclusió molecular o filtració en gel (SEC)	20
1.4.2.5. Electroforesi en gel (GE)	21
Electroforesi en gel bidimensional (2D-PAGE)	23
1.4.2.6. Tècniques immunoquímiques	23
Immunoprecipitació	24
Assaig d'immunoabsorció enzimàtica (ELISA)	24
Western Blot (WB).....	24
1.4.3. Tècniques de separació i caracterització d'alta resolució	25

1.4.3.1. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)	25
1.4.3.2. Electroforesi capil·lar (CE)	27
1.4.4. Espectrometria de masses (MS)	29
1.4.4.1. Ionització	30
Ionització per electrosprai (ESI).....	30
Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI).....	32
1.4.4.2. Analitzadors d'espectrometria de masses (MS)	33
1.6. Biomolècules estudiades. Malalties relacionades.....	35
1.6.1. Neuropèptids. Pèptids opiacis.....	35
1.6.2. Superòxid dismutasa 1 (SOD-1). Esclerosi lateral amiotròfica (ALS)	36
1.6.3. Prió cel·lular (PrP ^C). Encefalopatia espongiforme transmissible (TSE)	38
CAPÍTOL 2. EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ DE PrP^C	41
Article 2.1.....	45
CAPÍTOL 3. ANÀLISI DE SOD-1 PER MALDI-TOF-MS, CE-UV I CE-IT-MS	53
Article 3.1.....	57
CAPÍTOL 4. ANÀLISI DE NEUROPÈPTIDS I SOD-1 PER CE-TOF-MS	65
Article 4.1.....	69
Article 4.2.....	79
CAPÍTOL 5. ANÀLISI DE SOD-1 PER n-ESI-IM-MS	89
Article 5.1.....	93
CAPÍTOL 6. RESULTATS I DISCUSSIÓ	103
6.1. Extracció i purificació de PrP^C	105
6.1.1. SEC vs diafiltració.....	106
6.1.2. IMAC	108
6.2. Anàlisi de SOD-1 per MALDI-TOF-MS, CE-UV, CE-IT-MS	109
6.2.1. MALDI-TOF-MS	110
6.2.2. CE-UV i CE-IT-MS.....	111
6.3. ANÀLISI DE NEUROPÈPTIDS I SOD-1 PER CE-TOF-MS	115
6.3.1. Influència dels paràmetres instrumentals del TOF en CE-TOF-MS.....	115
6.3.1.1. Neuropèptids i SOD-1 bovina i humana	115
6.3.2. Caracterització de SOD-1 bovina i humana	119
6.3.3. Aplicació a mostres de pacients d'ALS	126
6.4. ANÀLISI DE SOD-1 PER n-ESI-IM-MS.....	127
6.4.1. Optimització dels paràmetres instrumentals	128

6.4.2. Anàlisi de SOD-1 bovina.....	130
6.4.3. Anàlisi de SOD-1 humana	132
6.4.4. Aplicació a mostres de pacients d'ALS	134
6.5. Treballs futurs	136
CAPÍTOL 7. CONCLUSIONS	139
CAPÍTOL 8. BIBLIOGRAFIA.....	143
ANNEX.....	161
Resum Article 2.1.....	163
Resum article 3.1	163
Resum article 4.1	165
Resum article 4.2	166
Resum article 5.1	167

OBJECTIU

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha estat l'establiment de metodologia analítica per a la purificació, separació i caracterització de pèptids i proteïnes relacionats amb malalties neurodegeneratives fent servir tècniques de purificació i anàlisi tradicionals, així com també tècniques de separació i caracterització d'alta resolució, especialment l'electroforesi capil·lar (CE) i l'espectrometria de masses (MS). Aquest objectiu principal engloba d'altres més concrets que es detallen a continuació:

- Desenvolupar un procés d'extracció i purificació de prió cel·lular (PrP^C) a partir de cervell boví amb la finalitat d'aïllar una quantitat suficient per a la seva futura separació i caracterització mitjançant electroforesi capil·lar acoblada en línia a l'espectrometria de masses (CE-MS). Després de l'extracció del PrP^C, s'avaluaran diferents tècniques no immunoquímiques per a la seva purificació, concretament la cromatografia d'exclusió molecular o filtració en gel (SEC), la diafiltració i la cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC).
- Establir metodologia analítica per a la separació i caracterització de proteïnes especialment làbils en certes condicions d'anàlisi com ara medis àcids o paràmetres instrumentals que dificulten o impossibiliten la detecció de la seva forma nativa. És el cas d'alguns pèptids, metal·loproteïnes i proteïnes oligomèriques. S'utilitzarà la superòxid dismutasa 1 (SOD-1) com a proteïna model per a la realització dels següents estudis:
 - Estudi de diverses matrius per a la ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI), així com de les condicions de preparació de la SOD-1 bovina.
 - Desenvolupament de mètodes de separació d'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada (CE-UV), compatibles amb la detecció en línia per espectrometria de masses amb font d'ionització d'electrosprai (ESI-MS) emprant SOD-1 bovina.
 - Purificació de SOD-1 a partir de sang humana.
 - Separació i caracterització de neuropèptids i SOD-1 mitjançant CE-MS amb un analitzador de trampa d'ions o un analitzador de temps de vol (CE-IT-MS i CE-TOF-MS, respectivament). Comparació dels resultats obtinguts amb els dos analitzadors.

- Caracterització de SOD-1 bovina i humana mitjançant espectrometria de masses de mobilitat iònica amb font d'ionització de nano-electrosprai (n-ESI-IM-MS).
- Aplicació de les metodologies analítiques desenvolupades a l'anàlisi de mostres de pacients d'esclerosi lateral amiotròfica (ALS).

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ

L'“Òmica” o les “Ciències Òmiques” són un conjunt de tècniques dedicades a l'estudi integral del funcionament, l'evolució i l'origen dels éssers vius. Inicialment es va dedicar a la investigació del DNA, és el que coneixem com a genòmica, però ràpidament es va expandir cap a un nivell molt més funcional, l'estudi del perfil expressiu i el rol tant dels gens com de les proteïnes, passant per l'anàlisi de l'àcid ribonucleic (RNA) [1]. La informació que ens proporciona la proteòmica [2], que inclou la peptidòmica, és fonamental per explicar el funcionament dels organismes, però el repte no és senzill, perquè a diferència del genoma, les proteïnes i els pèptids estan canviant contínuament i interaccionen amb altres molècules mitjançant una complicada xarxa bioquímica [3, 4]. Així, l'expressió proteica ve condicionada, entre d'altres factors, per la resposta cel·lular a les condicions ambientals i a la salut [5]. El gran nombre de pèptids i proteïnes expressats en un organisme, la seva complexitat, les seves interaccions i els seus nivells de concentració, de vegades extremadament baixos, exigeixen el desenvolupament continu de noves metodologies analítiques.

1.1. GENOMA, TRANSCRIPTOMA, PROTEOMA I METABOLOMA

Els pèptids i les proteïnes són peces fonamentals en el trencaclosques biològic de les xarxes moleculars interconnectades que constitueixen el cos humà i contenen moltes de les respostes als misteris de la vida [6-7]. El terme proteoma es refereix a l'estructura, funció i interaccions del conjunt de pèptids i proteïnes que s'expressen en un moment determinat i sota unes condicions definides en una unitat subcel·lular, cèl·lula, teixit, òrgan o organisme viu complet. Atenent a aquesta definició, part del conjunt de compostos de baix pes molecular que configura el metaboloma també formaria part del proteoma perquè està constituït per substàncies de natura peptídica producte del metabolisme cel·lular [8]. Els 20 α -aminoàcids naturals són els blocs amb els quals es construeixen les seqüències d'aquests pèptids i proteïnes [9]. Aquestes seqüències i les seves modificacions post-transduccionals (PTMs) [10] s'especifiquen al genoma, el material genètic d'un organisme, constituït pel DNA en la majoria dels casos [1]. Finalment, el transcriptoma està constituït per l'RNA i de la mateixa forma que el proteoma, és molt variable perquè determina els gens que s'expressen en un moment determinat.

La genòmica, la transcriptòmica, la proteòmica i la metabolòmica són les disciplines que estudien el genoma, el transcriptoma, el proteoma i el metaboloma, respectivament [1, 6-9].

1.2. BIOMARCADORS

L'institut nacional de la salut dels EUA (*National Institute of Health*, NIH, Bethesda, Maryland, USA) defineix biomarcador com una característica que es pot mesurar objectivament i avaluar com a indicador d'un procés biològic normal, d'un procés patològic o com a resposta farmacològica a una intervenció terapèutica [11]. Els biomarcadors es poden dividir en dos grups: marcadors per al diagnòstic o per a la informació de l'estat fisiològic no lligat a una resposta farmacològica i marcadors per a determinar l'efecte o la resposta fisiològica d'un fàrmac.

El descobriment, caracterització, determinació, i validació de biomarcadors constitueix un objectiu fonamental per al diagnòstic, seguiment, pronòstic i prevenció

de nombroses patologies. Els fluids i altres materials biològics contenen un gran nombre de substàncies, entre elles pèptids i proteïnes, que poden o podrien emprar-se com a biomarcadors específics de certes malalties. No obstant, donada la complexitat que presenten aquestes mostres biològiques i la baixa concentració dels components més interessants en la majoria de les ocasions, és d'especial importància l'establiment de nous mètodes analítics per a la purificació, preconcentració, separació i caracterització. A la taula 1.1 es descriuen algunes proteïnes d'interès biomèdic que estan relacionades amb diferents malalties. Algunes d'elles es fan servir com a biomarcadors en l'actualitat, com és el cas de l'antigen prostàtic específic (PSA) amb el càncer de pròstata.

1.3. PÈPTIDS I PROTEÏNES

Les proteïnes són molècules extremadament complexes que poden desenvolupar una enorme varietat de funcions: transport i emmagatzematge com la transferrina [12]; organització estructural com el col·lagen [13]; enzimàtica com la superòxid dismutasa 1 (SOD-1) [14]; o bé hormonal com l'eritropoetina (EPO) [15, 16].

Els pèptids i les proteïnes estan formats per la unió covalent de diferents aminoàcids mitjançant enllaç peptídic (amida) entre el grup α -carboxil d'un aminoàcid i el grup α -amino d'un altre [17]. Cada proteïna té una seqüència definida de residus d'aminoàcids, i de vegades, unes PTMs característiques, que tenen lloc després de la síntesi de la seqüència peptídica (estructura primària). L'estructura secundària als polipèptids i proteïnes es forma en plegar-se els diferents segments de la cadena peptídica per originar estructures regulars com les hèlix α i les làmines β . Aquestes estructures es poden plegar de nou i compactar-se. Aquest nivell superior de plegament, que confereix la forma tridimensional, es denomina estructura terciària i només la presenten les proteïnes. L'organització pot arribar a un últim nivell, l'estructura quaternària, que s'origina per la interacció entre les diferents subunitats que formen la proteïna. Els nivells estructurals superiors d'una proteïna s'estabilitzen mitjançant ponts disulfur entre els residus de cisteïna, ponts d'hidrogen, interaccions electrostàtiques, forces de Van der Waals o interaccions hidrofíliques [17].

Taula 1.1. Exemples d'algunes proteïnes d'interès biomèdic.

Proteïna	Acronim	Codi a UniProt ^a	M ^b (Da)	PTM	Estructura	Afinitat per metalls	Malalties relacionades	Tècnica d'anàlisi de referència	Bibliografia
Alfa 1-àcid glicoproteïna	AGP	P02763	42000-44000	Glicosilació Pont disulfur Pirrolidina Àcid carboxílic	Monòmer		Malaltia hepàtica	CE-UV CE-MS	[18-21]
Alfa-sinucleïna		P37840	14000	Fosforilació	Monòmer		Parkinson	SDS-PAGE	[21-25]
Antigen prostàtic específic	PSA	P07288	33000	Glicosilació Pont disulfur	Monòmer		Càncer de pròstata	SDS-PAGE	[21, 26-27]
Proteïna Beta amiloide	Aβ	P05067	85200	Glicosilació Pont disulfur Fosforilació	Monòmer	Metal·loproteïna que coordina un Cu. Presenta afinitat per Cu, Zn i Fe	Alzheimer	SDS-PAGE	[21-22, 25, 28-31]
Eritropoetina	EPO	P01588	30400	Glicosilació Pont disulfur	Monòmer		Anèmia Control antidiopatge	CE-UV	[21, 32-34]
Hemoglobina	HbA HbB	P69905 P68871	64500	Acetilació Glicosilació Nitrosació Fosforilació	Hetero-tetràmer format per dues subunitats constituïdes per una cadena α i una β	Metal·loproteïna. Les dues subunitats coordinen un Fe	Anèmia Diabetis	MS LC-MS	[21, 28, 35-39]
Huntingtina	HTT	P42858	347000	Acetilació Fosforilació	Monòmer		Malaltia de Huntington	WB	[21-22, 28, 40]
Proteïna priònica	PrP	P04156	33000-35000	Glicosilació Pont disulfur	Monòmer	Presenta afinitat per diversos metalls entre ells el Cu i el Zn	TSE	WB	[21, 25, 28, 41-44]
Superòxid dismutasa -1 bovina	SOD-1 bovina	P00442	31400	Acetilació Pont disulfur	Homodímer	Metal·loproteïna. Un Cu i un Zn per monòmer		MS LC-MS	[21, 45]
Superòxid dismutasa -1 humana	SOD-1 humana	P00441	32000	Acetilació Pont disulfur Glutacionització Fosforilació	Homodímer	Metal·loproteïna. Un Cu i un Zn per monòmer	ALS	MS LC-MS	[21-22, 28 45-49]
Transferina	Tf	P02787	79600	Metilació Glicosilació Pont disulfur Fosforilació	Monòmer	Metal·loproteïna que coordina un Fe	Alcoholisme CDG	CE-UV CE-MS	[21, 49-53]
Transtiretina	TTR	P02766	55200	Glutacionització Glicosilació	Homotetràmer		Amiloidosi, marcador de l'estat nutricional	MS 2D-PAGE	[21, 28, 54-57]

^a Uniprot: www.uniprot.org ^b Massa molecular (M) mitjana de la isoforma més abundant

1.3.1. Hormones peptídiques

Les hormones són substàncies que se sintetitzen en cèl·lules especialitzades i que es transporten pel torrent sanguini fins a les cèl·lules diana on interactuen amb receptors específics donant lloc a canvis metabòlics concrets [17]. Hi ha dos tipus de resposta metabòlica: i) la produïda per les hormones esteroides, com l'adrenalina, que comporta modificacions de l'expressió gènica per a la regulació de les concentracions intracel·lulars de pèptids i proteïnes i ii) la produïda per la resta d'hormones, com el glucagó, que s'uneixen a un receptor de la membrana de la cèl·lula diana per desencadenar tot un seguit de reaccions intracel·lulars concretes [17, 58]. La majoria de les hormones peptídiques actuen d'aquesta última forma i, tant les naturals com els seus anàlegs obtinguts artificialment, són en l'actualitat les biomolècules amb un ús farmacològic més ampli [17, 59].

Les hormones peptídiques poden ser de baix pes molecular, com els neuropèptids o l'oxitocina o d'elevat pes molecular com l'hormona del creixement i l'eritropoetina (EPO). En aquestes últimes, les PTMs i la presència de diferents isoformes¹ o glicofomes² juguen un paper molt important [16, 60].

1.3.2. Enzims. Metal·loproteïnes

Les proteïnes també poden funcionar com enzims catalitzant selectivament un gran ventall de reaccions químiques [61]. Alguns enzims requereixen de certs components no peptídics, de tipus orgànic o inorgànic anomenats cofactors, per assolir plena funcionalitat [61]. Entre els cofactors inorgànics destaquen els metalls, que també juguen un paper molt important en l'estructura i funció d'altres proteïnes [45].

Aproximadament una tercera part de totes les proteïnes del cos humà contenen metalls [62-63]. Els elements metàl·lics poden tenir també altres funcions: transport i reservori [64-65]; transferència i emmagatzematge d'electrons [66]; enllaç d'O₂ o catalítica [67].

¹ Formes d'una mateixa proteïna que difereixen en la seqüència aminoacídica o en les seves PTMs. Per a alguns autors el terme isoforma solament es pot utilitzar per a referir-se a proteïnes que presenten exclusivament diferències en la seva seqüència aminoacídica. Amb aquesta definició, les glicofomes no serien isoformes.

² Formes d'una mateixa proteïna que difereixen exclusivament en la seva glicosilació

Els principals ions metàl·lics presents a les metal·loproteïnes són el Fe (als citocroms, l'hemoglobina (Hb), la transferrina (Tf) i molts enzims), el Zn (a la insulina, l'anhidrasa carbònica (CA) i la superòxid dismutasa (SOD-1)), el Cu (a les oxidoreductases i la SOD-1) i el Mn (als enzims glicolítics i les proteases). A la taula 1.1 es mostren els metalls que es troben relacionats amb algunes proteïnes d'interès biomèdic. La SOD-1, que s'estudia en aquesta tesi doctoral, és un metal·loenzim homodimèric, amb dues subunitats idèntiques que contenen un àtom de Cu i un de Zn per cadascuna d'elles. El Cu té funció catalítica mentre que el Zn és estructural [45] (figura 1.1).

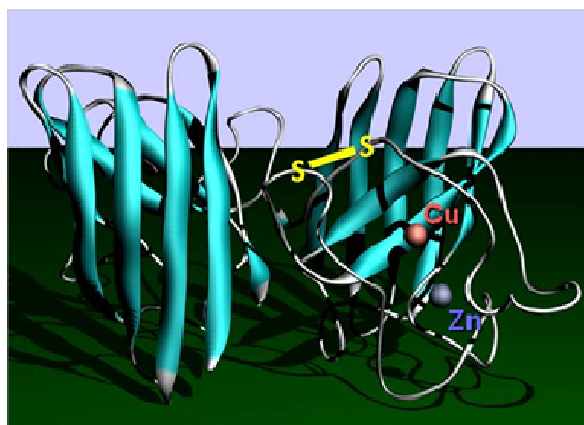


Figura 1.1. Estructura de la SOD-1.

1.3.3. Modificacions post-transduccionals (PTMs)

Algunes proteïnes són funcionals en acabar de sintetitzar-se, mentre que d'altres han d'experimentar amb posterioritat alguna modificació per poder exercir la seva funció [10, 68-69]. La diversitat del proteoma supera àmpliament el nombre de proteïnes que prediu la capacitat codificadora del DNA i està directament relacionada amb les PTMs [4, 68]. Les PTMs alteren l'estructura i les propietats de les proteïnes mitjançant l'enllaç covalent o l'eliminació de diferents grups químics. S'han descrit moltes PTMs tal i com es pot observar al petit recull de la taula 1.2, on s'han destacat les PTMs presents a les proteïnes estudiades en aquest treball, a excepció de la glicosilació que es tracta tot seguit.

1.3.3.1. Glicosilació

La glicosilació proteica és una de les PTMs més comunes [10] i potser la més complexa. Consisteix en la unió covalent al nucli peptídic, mitjançant enllaços glicosídics, de cadenes de carbohidrats de diferent mida i estructura [71].

PTM	$\Delta M_{\text{mitjana}}$ (Da)	PTM	$\Delta M_{\text{mitjana}}$ (Da)
Pyruvic acid (Cys)	-33,10	Bromination	78,90
3-oxoalanine (Cys)	-18,08	Phosphorylation	79,98
2,3-didehydroalanine (Ser)	-18,02	Sulfation	80,06
2,3-didehydrobutyrine	-18,02	Hypusine	87,12
Pyrrolidone carboxylic acid (Glu)	-18,02	Pyrrolysine	109,13
2-oxobutanoic acid	-17,03	n-Octanoate	126,20
Pyruvic acid (Ser)	-17,03	Diphthamide	143,21
Pyrrolidone carboxylic acid	-17,03	C-Mannosylation	162,14
(Z)-2,3-didehydrotyrosine	-2,02	Glucosylation (Glycation)	162,14
3-oxoalanine (Ser)	-2,02	Lipoyl	188,30
Disulphide bond formation (Cysteine)	-2,02	O-GlcNAc	203,20
Allysine	-1,03	S-farnesyl cysteine	204,36
Amidation	-0,98	Myristoylation	210,36
3-phenyllactic acid	0,98	S-12-hydroxyfarnesyl cysteine	220,35
Citrullination	0,98	Biotin	226,30
Deamidation	0,98	Pyridoxal phosphate	229,13
Methylation	14,03	S-palmitoleyl cysteine	236,39
Deamidation followed by a methylation	15,01	Palmitoylation	238,41
Cysteine sulfinic acid (-SOH)	16,00	n-Decanoate	241,33
Hydroxylation	16,00	Geranyl-geranylation	272,47
1-thioglycine	16,06	Cis-14-hydroxy-10,13-dioxo-7-heptadecenoic	294,39
Formylation	28,01	Glutathionylation	305,31
Dimethylation	28,05	Phosphopantetheine	339,32
S-Nitrosylation	29,00	Cholesterol	368,64
Dimethylation of proline	29,06	N6-poly(methylaminopropyl)lysine	426,73
2',4',5'-topaquinone	29,98	FMN conjugation (Ser/Thr)	438,33
Methionine sulfone	31,99	FMN conjugation (His)	454,33
Cysteine sulfinic acid (-SO ₂ H)	32,00	FMN conjugation (Cys)	456,34
Dihydroxylation	32,00	Triiodothyronine	469,78
Cysteine persulfide	32,06	ADP-ribosylation	541,30
Acetylation	42,04	S-diacylglycerol cysteine	576,94
Trimethylation	42,08	Thyroxine	595,68
Gamma-carboxyglutamic acid	44,01	S-archaeol	635,14
Beta-methylthiolation	46,09	Phosphatidylethanolamine amidated glycine	699,98
N6,N6,N6-trimethyl-5-hydroxylysine	59,09	Omega-hydroxyceramide glutamate ester	761,30
N6-1-carboxyethyl lysine	72,06	FAD	783,54

Taula 1.2. Variacions de M mitjana degudes a les PTMs més comunes [21, 70].

Les proteïnes que, com el prió cel·lular (PrP^C), presenten aquestes modificacions reben el nom de glicoproteïnes. Una característica destacada de les glicoproteïnes és l'elevada heterogeneïtat dels glicans, que contrasta amb la uniformitat de la cadena polipeptídica on es troben enllaçats. Les espècies químiques de glicoproteïnes, que posseeixen la mateixa cadena polipeptídica però que difereixen en el conjunt de glicans, reben el nom de glicofomes. S'ha de destacar que el contingut i composició de les glicofomes d'una glicoproteïna sol ser relativament constant entre individus d'una mateixa espècie.

1.3.4. Oligòmers i agregats

Les proteïnes oligomèriques, que comprenen dues o més cadenes aminoacídiques associades, representen un dels nivells més complexos d'organització estructural en les molècules biològiques. Les cadenes polipeptídiques de les diferents subunitats d'aquestes proteïnes, no solament s'han de plegar per formar les estructures secundària i terciària, sinó que han de formar les interfícies necessàries per a permetre les interaccions apropiades entre les diferents subunitats. L'oligomerització pot ser considerada una característica molt avantatjosa per un gran nombre de raons, entre les que es destaquen la regulació de l'expressió gènica i l'activitat enzimàtica. D'altra banda, la transició entre diferents estats oligomèrics s'ha demostrat que pot ser molt important en la formació de tumors i d'altres malalties greus [72-74].

Estudis recents suggereixen que el 35% de les proteïnes presents a les cèl·lules són tetràmers [73]. No obstant això, les bases de dades actuals no ho reflecteixen. Es creu que les limitacions de les tècniques analítiques emprades en la seva caracterització afavoreixen el trencament i la detecció dels oligòmers més petits. Si les subunitats que formen la proteïna oligomèrica són idèntiques, es denominen proteïnes homo-oligomèriques i si són diferents proteïnes hetero-oligomèriques. La formació d'oligòmers d'ordre superior, sovint per la desnaturalització proteica, pot acabar provocant l'aparició d'agregats insolubles, com els relacionats amb diverses malalties neurodegeneratives.

1.3.4.1. Agregació de proteïnes. Malalties neurodegeneratives

L'agregació de les proteïnes és un problema complex que té implicacions importants a la biologia, biotecnologia, medicina i a la indústria farmacèutica. Generalment s'ha suposat que l'agregació de les proteïnes involucra tant el seu estat natiu com desplegat. Es pensa que alguns agregats es formen durant el procés de plegament de les proteïnes mentre que d'altres, com les fibres amiloides, s'originen a partir d'intermedis parcialment desplegats quan totes les condicions que afavoreixen aquests intermedis són propícies [75]. En proteïnes oligomèriques com la SOD-1, alguns autors suggereixen mecanismes basats en la dissociació dels oligòmers fins a monòmers abans de l'agregació [76-78]. També s'ha arribat a plantejar la contribució dels metalls o les PTMs [79].

Existeix un elevat nombre de malalties que es caracteritzen per la formació d'agregats insolubles de proteïnes específiques, encara que, com s'apuntava anteriorment, es desconeixen els factors que inicien i modulen les interaccions anormals que condueixen a la seva formació [79]. Les més conegudes són les malalties neurodegeneratives amiloides com per exemple la malaltia d'Alzheimer [76-80] i les encefalopaties espongiformes transmissibles (TSE) (p. e. l'encefalopatia espongiforme bovina o de les vaques boges (BSE) i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJ) en humans) [79-80]. D'altres malalties impliquen altres tipus de dipòsits com per exemple les cataractes (que en aquest cas no és una malaltia neurodegenerativa), el Parkinson, el Huntington i l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) [76, 80]. Milers de persones moren cada any per alguna d'aquestes malalties, el que fa que siguin de gran interès per a la població.

1.4. ANÀLISI DE PÈPTIDS I PROTEÏNES

La major part de les investigacions bioquímiques demanen l'extracció i purificació de les substàncies objecte d'estudi a partir de teixits i d'altres mostres biològiques. Això suposa un gran esforç ja que les mostres a analitzar solen contenir milers de substàncies i les proteïnes d'interès es poden trobar a concentracions molt baixes o ser inestables. Existeixen nombroses tècniques per abordar el problema, a continuació se'n fa una breu recopilació.

1.4.1. Tècniques de lisi cel·lular i extracció de proteïnes

Tradicionalment, el primer pas en l'aïllament d'una proteïna d'una mostra biològica consisteix en la lisi cel·lular. El mètode a escollir depèn de les característiques físiques de la mostra o el tipus de cèl·lules de les què es vol aïllar la proteïna, així com de la seva localització. Entre les diverses tècniques destaquen:

- Xoc o estrès osmòtic. Consisteix en afegir a la suspensió de cèl·lules aigua destil·lada o un altre medi extremadament hipotònic. La diferència osmòtica fa que l'aigua es difongui cap a l'interior de la cèl·lula, provocant que s'infla i es trenqui si la paret no és rígida.
- Destrucció mecànica. Entre aquests mètodes es troba l'homogeneïtzació per compressió i fricció emprant sistemes de tipus batedor o triturador (p. e. Polytron™); moldre en morters (amb sorra o alúmina) o en molins amb perles de vidre; utilitzar la premsa de *French* (que fa passar les cèl·lules a gran velocitat a través d'un petit orifici) o la sonicació.
- Congelació-descongelació. La lisi es produeix al sotmetre a les cèl·lules a un canvi bruscat de temperatura, congelant primer a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (amb nitrogen líquid) i incrementant ràpidament fins a temperatura ambient ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

El resultat de la lisi cel·lular és un homogeneïtzat que conté una suspensió on es barregen enzims, membranes i d'altres fragments cel·lulars. Tot seguit, s'ha de separar la proteïna d'interès tant dels residus cel·lulars com de la resta de components solubles. Les proteïnes ancorades a les membranes s'han de solubilitzar mitjançant un tractament addicional, en general, amb detergents. L'elecció dels detergents s'ha de fer amb molta cura ja que poden desnaturalitzar les proteïnes [48]. Entre els detergents més emprats destaca l'*octylglucoside*, un detergent no iònic suau, que manté l'estructura nativa i l'activitat de les proteïnes en una gran varietat de condicions [81]. Una possible alternativa per alliberar la proteïna és fer servir enzims com les fosfolipases [82].

Durant l'extracció i un cop la proteïna s'ha aïllat del seu entorn natiu, està exposada a molts agents que poden fer-la malbé. Els canvis de pH o temperatura i l'acció de les proteases, que hidrolitzen els enllaços peptídics, són els principals factors a tenir en compte. Per a evitar o minimitzar aquests factors es fan servir dissolucions

amortidores, temperatures baixes (4 °C) i es procura minimitzar la durada del procés. En alguns casos, l'addició d'inhibidors de les proteases com la leupeptina i la pepstatina és aconsellable [81-84].

Després de l'extracció, la proteïna d'interès s'ha de purificar emprant les tècniques i metodologies més apropiades abans de ser convenientment caracteritzada.

1.4.2. Tècniques de purificació i anàlisi tradicionals

Per arribar a tenir un material de puresa suficient s'acostumen a combinar seqüencialment varies de les tècniques que s'indiquen tot seguit.

1.4.2.1. Solubilitat

Una de les formes més antigues, simple i força eficaç per dur a terme la separació d'una mescla de proteïnes és realitzar una precipitació fraccionada, aprofitant les diferències de solubilitat que presenten en certes condicions (dissolvents orgànics, pH baixos, solucions salines concentrades, etc.). Moltes proteïnes són insolubles en presència de sals a concentracions elevades, especialment les més bàsiques quan estan totalment carregades [17, 85]. El sulfat d'amoni és una de les sals més emprades en aquests procediments de "*salting out*".

1.4.2.2. Centrifugació

La centrifugació és una tècnica per a separar substàncies de diferent densitat mitjançant una força rotatòria superior a la de la gravetat. S'utilitza per a la sedimentació de precipitats, preparació de cèl·lules i òrgans subcel·lulars, purificació de DNA, separació de proteïnes i estimació de la seva massa molecular (M), el seu coeficient de sedimentació o la seva densitat. També s'utilitza en l'estudi de l'estabilitat d'oligòmers proteics [78].

La modalitat de centrifugació més emprada en la purificació de proteïnes és la ultracentrifugació que permet estudiar la sedimentació d'estructures subcel·lulars (lisosomes, ribosomes i microsomes) i biomolècules. Es necessiten velocitats de centrifugació molt més elevades que requereixen l'ús de centrifugues amb rotors especials i sistema de buit, per treballar a baixa pressió.

1.4.2.3. Diàlisi i diafiltració

La diàlisi permet separar les molècules d'una solució a través de membranes semipermeables amb diàmetres de porus apropiats.

Existeixen comercialment membranes semipermeables, en general de cel·lulosa, per a la dessalinització i purificació de solucions de proteïnes i altres biopolímers. Quan el volum és gran, la diàlisi s'implementa introduint la mostra en unes bosses especials que contenen les membranes i es col·loca el conjunt en un recipient amb aigua o una solució hipotònica (figura 1.2-A). És un procés passiu, llarg i que, per a que sigui efectiu, en general, provoca la dilució de la mostra.

La diafiltració és una diàlisi forçada on s'utilitzen membranes semipermeables de cel·lulosa amb diàmetre de porus d'una determinada mida molecular (filtres de tall per pes molecular (MWCO)) que permeten la filtració emprant centrifugues. D'aquesta forma s'aconsegueix dessalar i concentrar les proteïnes d'interès més ràpidament (figura 1.2-B).

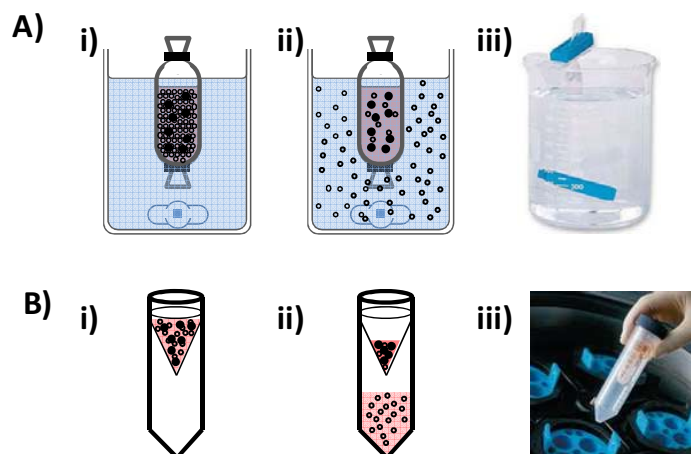


Figura 1.2. A) Diàlisi: i) Estadi inicial; ii) Estadi final; iii) Bossa de diàlisi comercial. B) Diafiltració: i) Estadi inicial; ii) Estadi final; iii) Filtre de tall per pes molecular (MWCO) comercial.

1.4.2.4. Cromatografia de líquids (LC)

La LC en columna és una de les tècniques més emprades per a la purificació de proteïnes en grans quantitats. Tot i que l'eficàcia i la resolució són limitades al treballar a pressions baixes o moderades, es poden obtenir separacions apropiades. Sovint es combina amb la utilització de recol·lectors de fraccions per a treballar de forma automatitzada, emprant, en general, detecció per espectrofotometria

ultraviolada (UV). S'acostuma a treballar seleccionant una longitud d'ona entre 220 i 280nm per l'absorció de l'enllaç peptídic o de les cadenes laterals dels residus d'aminoàcids. En funció de la fase estacionària utilitzada podem diferenciar diferents tipus:

Cromatografia de bescanvi iònic (IEC)

S'utilitza per a separar les proteïnes segons la seva càrrega. La fase estacionària és una resina de bescanvi iònic (catiònic o aniònic) on les proteïnes que tenen la càrrega apropiada són retengudes per interaccions electrostàtiques. La separació s'aconsegueix amb un gradient salí, normalment de clorur de sodi, a la fase mòbil aquosa [83].

Cromatografia hidrofòbica

La fase estacionària és apolar. La proteïna és retinguda per la interacció dels residus apolars dels aminoàcids. Per a l'elució s'augmenta la polaritat de la fase mòbil.

Cromatografia d'afinitat (AC)

Moltes proteïnes tenen la capacitat d'interaccionar selectivament amb molècules que actuen com a lligands específics i que es poden immobilitzar en un suport adequat per utilitzar-se com a fase estacionària [86-88]. Normalment, les interaccions són fortes però reversibles quan s'utilitzen les fases mòbils adequades. L'elució s'aconsegueix, en la majoria dels casos, disminuint el pH, augmentant la força iònica, introduint additius desnaturalitzants o competidors específics a la fase mòbil.

Generalment s'utilitza per a preconcentrar la proteïna d'interès o eliminar les impureses (p. e. les proteïnes més abundants en el sèrum). Un cas particular de l'AC és la cromatografia d'immunoafinitat (IAC) on es fan servir anticossos o fragments d'anticossos específics contra la proteïna d'interès, la fase estacionària.

Cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC)

L'IMAC és un altre tipus d'AC, que per la seva rellevància en aquesta tesi doctoral, mereix una especial atenció.

Aquesta tècnica es va desenvolupar originalment pel fraccionament de proteïnes a partir de mostres biològiques [89]. Des d'aleshores, el mètode ha guanyat popularitat i ha estat àmpliament utilitzat per a la purificació de pèptids i proteïnes que tenen

afinitat per alguns dels metalls de transició [81-82, 90-91]. La interacció reversible amb els ions metàl·lics immobilitzats a la fase estacionària té lloc a través de les cadenes laterals de certs aminoàcids quan es troben a la superfície peptídica (majoritàriament His i en menor extensió Cys i Trp) [89]. La magnitud de la interacció depèn del tipus, el nombre i la distribució espacial d'aquests aminoàcids, juntament amb el metall implicat. Les condicions cromatogràfiques (pH, força iònica, additius adequats, etc.) també influeixen decisivament en la retenció.

Es troben disponibles comercialment diverses columnes d'IMAC. Normalment contenen un suport sòlid amb un agent quelatant, com ara l'àcid iminodiacètic (IDA), que permet immobilitzar el metall apropiat. A la figura 1.3 es mostra esquemàticament el procediment emprat per a treballar amb una columna de Cu^{2+} -IMAC, on teòricament, només es retindran les proteïnes que interaccionin amb el Cu^{2+} . Durant l'equilibració i la introducció de la mostra, s'aconsella treballar amb solucions tampó de pH neutre o lleugerament bàsic. La forma més utilitzada per a l'elució de les proteïnes retingudes és la que es basa en el seu desplaçament competitiu emprant imidazol (50-100mM, tampó 2, figura 1.3). Altres alternatives consisteixen en la disminució del pH o en l'ús d'agents quelatants més forts com l'EDTA que elimina també el metall immobilitzat del suport sòlid [89].

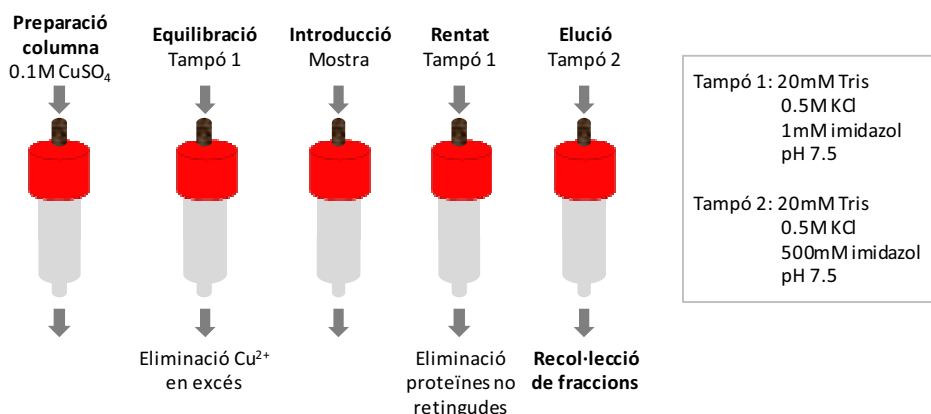


Figura 1.3. Cu^{2+} -IMAC. Metodologia de treball.

Cromatografia d'exclusió molecular o filtració en gel (SEC)

Aquesta tècnica de separació s'ha utilitzat àmpliament, tant a escala preparativa com semipreparativa, per a la separació i purificació de proteïnes, ja que és un mètode de fàcil accés, simple, robust i que permet separacions i recuperacions adequades [10, 92]. Les molècules se separen en funció de la seva mida al passar a través d'una fase estacionària polimèrica amb una determinada mida de porus. En general, la

composició de la fase mòbil és compatible amb la conservació de l'estructura nativa de les proteïnes i, per la forma d'operar, és una alternativa més suau a la centrifugació. Els seus principals inconvenients són el limitat rang dinàmic de treball, la baixa eficàcia i capacitat de càrrega, la possibilitat d'adsorció de les proteïnes a la columna i la dificultat de l'acoblament amb l'espectrometria de masses (MS) [10]. En l'actualitat és una de les tècniques més emprades per a la separació d'oligòmers proteics [93].

A la figura 1.4 es mostra esquemàticament la metodologia de treball en SEC. Les proteïnes petites penetren dins dels porus de la fase estacionària mentre travessen la columna a mesura que va circulant fase mòbil. En canvi, les més grans romanen a l'espai intersticial, si s'ha seleccionat adequadament la porositat de la fase estacionària. Aquest mecanisme produeix la separació. Si s'utilitzen patrons de pesos moleculars adients per calibrar, també es pot obtenir una estimació del pes molecular de les substàncies separades [94-96]. No obstant això, els resultats obtinguts són sovint poc acurats, perquè el temps de retenció d'una proteïna en SEC no només depèn del seu pes molecular sinó també de la seva forma, la seva tendència a les interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques amb la fase estacionària i de les variacions del cabal de fase mòbil [96].

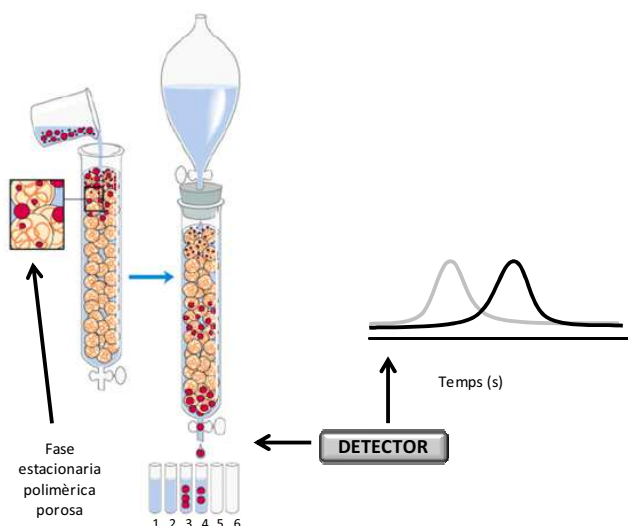


Figura 1.4. SEC. Metodologia de treball.

1.4.2.5. Electroforesi en gel (GE)

El principi general d'aquesta separació es basa en el fet que a l'aplicar un camp elèctric a una solució, les molècules de solut amb càrrega positiva es desplacen cap el

càtode i les de càrrega negativa cap a l'ànode. Aquest desplaçament s'anomena electroforesi. La velocitat d'aquest desplaçament depèn, majoritàriament, de la mida i de la càrrega neta de l'anàlit [17]. Encara que l'electroforesi es produeix directament en solució, sovint es realitza sobre un medi suport com pot ser el paper (electroforesi en paper) o un gel (electroforesi en gel, GE). La primera està indicada per a molècules petites carregades mentre que la segona és àmpliament utilitzada per a proteïnes i àcids nucleics [17]. En aquest últim cas, es col·loca un gel (els més comuns són els de poliacrilamida, electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE)), que contingui una solució amortidora adequada, a mode de làmina entre dues plaques i els compartiments dels elèctrodes (figura 1.5-A). A la part superior es diposita la mostra i s'aplica una diferència de potencial fins que es comprova que el front de l'elució està proper a la base de la cubeta. Un cop finalitzada la separació es procedeix a la tinció de les molècules separades per a detectar-les. Els reactius per a la detecció més emprats són el bromur d'etidi, el blau de *Coomassie*, el nitrat de plata o lligands adequats per a la detecció fluorescent (figura 1.5-B). També són comuns els mètodes de detecció que utilitzen anticossos, com per exemple, el western blot (WB), del que es parlarà al següent apartat.

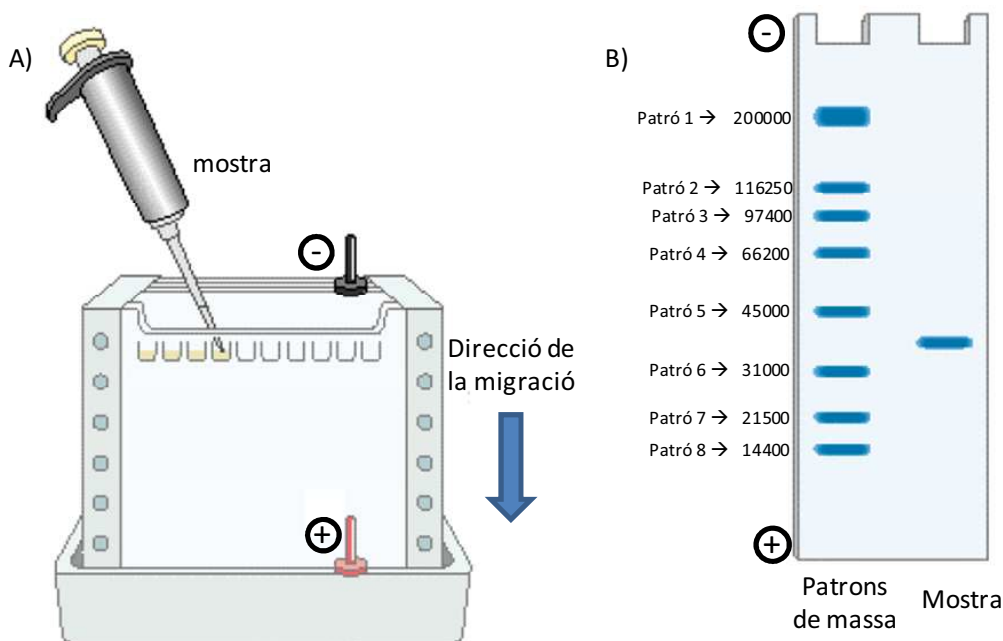


Figura 1.5. A. Esquema de la cubeta per realitzar SDS-PAGE. B. Electroferograma (gel).

La SDS-PAGE és una modalitat de PAGE a la que s'afegeix dodecil sulfat de sodi (SDS) a la solució amortidora. Així, totes les proteïnes presents a la mostra es desnaturalitzen

a l'interaccionar amb el detergent aniònic i tenen una càrrega negativa similar. D'aquesta forma, la separació es produeix en funció, únicament, de la mida de les proteïnes. Una altra modalitat, l'isoelectroenfocament (IEF), permet separar les molècules segons la seva càrrega i està especialment pensada per a separar amfòters. En aquest cas, la separació es realitza sobre un gel amb una mescla d'amfòlits que proporcionen un gradient de pH estable en un ampli interval de valors de pH. Els anàlits es desplacen i "s'enfoquen" (acumulen) a la regió del gradient que coincideix amb el seu punt isoelèctric, amb el que es produeix la separació.

Electroforesi en gel bidimensional (2D-PAGE)

La 2D-PAGE permet separar les proteïnes combinant l'IEF i la PAGE. En la primera dimensió les proteïnes se separen en funció del seu punt isoelèctric mitjançant gradients de pH immobilitzats. En la segona dimensió les proteïnes se separen segons la seva mida en PAGE, però sense utilitzar SDS (figura 1.6). Finalment, les proteïnes es detecten emprant algun dels mètodes més sensibles esmentats anteriorment (nitrat de plata o lligands fluorescents).

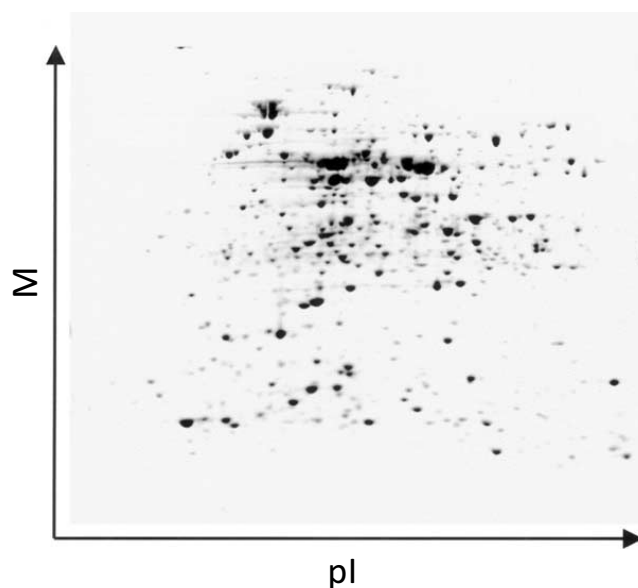


Figura 1.6. Electroferograma de 2D-PAGE d'una mescla complexa de proteïnes.

1.4.2.6. Tècniques immunoquímiques

Les tècniques immunoquímiques es basen en el reconeixement d'una determinada proteïna per anticossos específics [97-98]. Aquestes tècniques tenen una elevada sensibilitat i selectivitat, cosa que fa que siguin molt apropiades per a analitzar proteïnes minoritàries contingudes en mostres complexes. Altres avantatges

destacables són la seva senzillesa, rapidesa i cost relativament baix. En els últims anys, han millorat molt els processos de producció i purificació d'anticossos, així s'ha generalitzat la seva comercialització a preus raonables. Tots aquests factors han contribuït al desenvolupament de nombroses tècniques immunoquímiques per a la detecció de proteïnes.

A més de la cromatografia d'immunoafinitat (IAC), que es va introduir a la secció anterior (1.4.2.4), a continuació es descriuen breument altres tècniques immunoquímiques destacades.

Immunoprecipitació

L'objectiu d'aquesta tècnica és concentrar i purificar la proteïna antigènica d'interès, aprofitant la precipitació del complex antigen-anticòs. Normalment, per a que el complex sigui més insoluble, l'anticòs s'immobilitza prèviament en una matriu sòlida. Una vegada precipitat el complex antigen-anticòs és important rentar adequadament per eliminar la resta de proteïnes. Finalment, el complex es trenca emprant les condicions més adients.

Assaig d'immunoabsorció enzimàtica (ELISA)

L'ELISA és una tècnica immunoquímica basada en la mesura de l'activitat d'un enzim per tal de determinar l'extensió de la reacció antigen-anticòs. S'escull un enzim que formi productes amb alguna propietat físico-química mesurable, com ara absorció de radiació o fluorescència [99]. Habitualment s'immobilitza la mostra en un suport sòlid i s'incuba amb l'anticòs específic per l'antigen o anticòs primari que reconeixerà l'antigen immobilitzat i es quedarà unit. Posteriorment, es realitza l'incubació amb un anticòs secundari que està unit covalentment a un enzim. En afegir el substrat adequat, l'enzim generarà per acció catalítica un producte detectable mesurant l'absorbància o la intensitat de fluorescència. L'ELISA té nombroses aplicacions a l'anàlisi clínica [45], però també a la indústria farmacèutica i alimentària [100-101].

Western Blot (WB)

És una tècnica immunoenzimàtica per a la separació i detecció de proteïnes. La separació de les proteïnes es realitza normalment mitjançant SDS-PAGE. Un cop separades les proteïnes, es transfereixen a una membrana adsorbent, típicament de nitrocel·lulosa, i es fan reaccionar amb un primer anticòs que reconeix la proteïna

d'interès (anticòs primari). Seguidament es fa reaccionar l'anticòs primari amb un segon anticòs (anticòs secundari) que té alguna propietat que es pot mesurar com podria ser l'absorbància o la intensitat de fluorescència. El WB s'utilitza actualment com a tècnica per confirmar el diagnòstic de les TSEs bovines i humanes [102].

1.4.3. Tècniques de separació i caracterització d'alta resolució

Un anàlisi més acurat d'una mescla complexa de pèptids i proteïnes requereix la combinació de tècniques de separació d'alta resolució amb mètodes de detecció selectius, acurats i sensibles. En l'elecció de les tècniques a utilitzar s'han de tenir en compte les propietats físico-químiques i estructurals, tant de l'anàlit objecte d'estudi com de la matriu on es troba. Tampoc s'han d'oblidar, com ja apuntàvem anteriorment, els aspectes relatius a la selectivitat, sensibilitat, exactitud, resolució, temps d'anàlisi i tipus de detecció, així com els criteris econòmics i de disponibilitat. Per aquets motius la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) i l'electroforesi capil·lar (CE), acoblades o no a l'espectrometria de masses (MS), són àmpliament utilitzades actualment.

1.4.3.1. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC)

Com hem vist a la secció anterior (1.4.2.4), la LC ha estat la tècnica tradicionalment utilitzada per a la separació i purificació de mescles peptídiques complexes, en part, per la possibilitat de treballar tant a escala analítica com a escala preparativa. A escala analítica, l'HPLC es reconeguda com una eina indispensable per la seva velocitat d'anàlisi, el seu poder de resolució, la seva sensibilitat a més de la seva compatibilitat amb l'espectrometria de masses [10]. A més a més, el gran desenvolupament instrumental ha permès la seva implantació com a tècnica de rutina als laboratoris d'anàlisi moderns.

D'acord amb les propietats de la fase mòbil i la fase estacionària, existeixen cinc modes d'HPLC diferents per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes [10]: cromatografia de líquids de fase inversa (RPLC), SEC, IEC, cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC) i AC. Alguns d'ells ja s'han introduït a la secció 1.4.2.4 (SEC, IEC i AC) perquè s'utilitzen fonamentalment a escala preparativa i semipreparativa.

La RPLC és una de les variants més emprades per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes, tot i que suposa treballar en condicions desnaturalitzants. Malgrat això, presenta indiscutiblement una sèrie d'avantatges respecte a la resta de modalitats, ja que ofereix una gran versatilitat, poder de resolució i les fases mòbils emprades poden ser compatibles amb la detecció en línia per MS [103-104]. Les separacions es realitzen en columnes de fase estacionària hidrofòbica (octilsilà, octadecilsilà, polimèriques, etc.) i normalment amb fases mòbils hidroorgàniques de pH àcid (àcid trifluoroacètic o àcid fòrmic) [103-104]. En general, al valor de pH àcid de la fase mòbil, tots els grups ionitzables d'un pèptid o una proteïna es troben protonats, per la qual cosa, la presència d'un reactiu formador de parell iònic, com l'àcid trifluoroacètic, pot augmentar les interaccions de les molècules peptídiques amb la fase estacionària, reduint els processos d'adsorció i provocant una millora en la simetria i amplada dels pics cromatogràfics [103]. L'àcid fòrmic, tot i no ser tant bon formador de parell iònic, té l'avantatge de ser preferible per a la detecció en línia per MS [104].

L'HILIC és una variant de la LC de fase normal, en la que la fase estacionària és hidrofílica (sílice modificada o no amb diferents grups funcionals polars com amines, amides, grups ciano o diol), mentre que la fase mòbil consisteix en una barreja hidroorgànica, amb més d'un 70% de dissolvent orgànic [105]. El mecanisme de la separació es basa en una combinació d'interaccions per enllaços d'hidrogen, electrostàtiques i hidrofíliques [106]. S'ha utilitzat amb freqüència per analitzar els glicopèptids o glicans de les glicoproteïnes [10, 105]. Pel que fa a les proteïnes intactes, encara no s'ha aplicat àmpliament, degut a les condicions desnaturalitzants de les fases mòbils i a la possible adsorció irreversible de les proteïnes sobre la fase estacionària.

En els últims anys, s'ha generalitzat l'ús de la cromatografia de líquids acoblada en línia a l'espectrometria de masses (LC-MS), que permet la separació, identificació i caracterització de les substàncies presents a les mesclures complexes. Quan es tracta de fluids biològics o d'altres mostres de disponibilitat limitada, s'ha vist la necessitat de disminuir el diàmetre i la longitud de les columnes emprades per a les separacions. Això permet treballar amb volums de mostra més petits i obtenir la sensibilitat necessària per a fer front a la baixa concentració a la que sovint es troben els biomarcadors més interessants. Aquesta miniaturització ha donat lloc a la micro-HPLC (m-HPLC o μ -HPLC) i a la nano-HPLC (n-HPLC).

1.4.3.2. Electroforesi capil·lar (CE)

La CE, juntament amb altres tècniques de separació d'alta resolució miniaturitzades (μ -HPLC, n-HPLC i els sistemes basats en microxips), juga un paper molt important en camps d'investigació com la proteòmica, on en molts casos la quantitat de mostra disponible és extremadament petita [6-7]. Als avantatges inherents a la miniaturització (consum mínim de reactius, dissolvents i mostres, temps reduïts d'anàlisi en condicions òptimes, cost raonable i automatització senzilla), s'ha d'afegir la possibilitat del seu acoblament en línia amb la MS (CE-MS). L'acoblament en línia no és possible amb altres tècniques emprades tradicionalment en proteòmica, com la PAGE o la 2D-PAGE, malgrat que es poden trobar sistemes que automatitzen gairebé tot el procés. Com a contrapartida, els límits de detecció (LODs) en unitats de concentració amb aquestes tècniques miniaturitzades, són més elevats, per causa de la reduïda longitud del camí òptic i de la petita quantitat de mostra injectada [107-108]. Això fa necessari l'ús de sistemes de detecció més selectius i sensibles, com l'MS, i tècniques de purificació i preconcentració adequades.

La CE va ser un factor clau per a la finalització en un temps rècord del "Projecte del Genoma Humà" [109]. Ara bé, el repte analític de desxifrar el proteoma és superior al del genoma, degut al major nombre i complexitat dels compostos implicats i a que es troben habitualment a molt baixa concentració en mostres biològiques. En l'actualitat, la CE és una de les millors alternatives per a la separació de pèptids i proteïnes [3, 108, 110-113], especialment els que presenten PTMs que afecten a la seva relació m/z (glicopèptids o glicoproteïnes). A més, es troba disponible comercialment a un preu raonable i no necessita dissolvents orgànics per a la separació com l'HPLC. Els quatre modes més emprats per a la separació de pèptids i proteïnes són:

- Electroforesi capil·lar en gel (CGE): El fonament de la CGE és molt semblant al de la SDS-PAGE i s'ha utilitzat àmpliament per separar proteïnes en funció de la seva mida.
- Isoelectroenfocament capil·lar (CIEF): En aquest mode com en l'IEF convencional, les proteïnes són separades en funció del seu punt isoelèctric en un gradient de pH format per diferents amfòlits quan s'aplica un camp elèctric.

- Electrocromatografia capil·lar (CEC): És una tècnica híbrida, on la separació dels anàlits s'aconsegueix mitjançant la combinació de la migració electroforètica i la retenció cromatogràfica.
- Electroforesi capil·lar en zona (CZE): La separació es duu a terme per la diferent migració electroforètica que presenten els anàlits quan s'aplica un camp elèctric. És el mètode més emprat per a la separació de pèptids i proteïnes quan s'utilitza detecció en línia per MS. A més, a diferència de la majoria dels modes d'HPLC, la composició de l'electròlit de separació (*BGE, background electrolyte*) pot compatibilitzar-se amb la conservació de l'estructura nativa de les proteïnes o l'estudi d'oligòmers quan s'utilitzen solucions aquoses pròximes a la neutralitat [114]. Donat que és el mode més emprat, s'accepta l'ús del terme CE per referir-se en general a la CZE. Com que en aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat exclusivament CZE, d'ara endavant es farà servir el terme CE per referir-se a la CZE.

La separació en CE es basa en la diferent mobilitat dels ions sotmesos a una diferència de potencial en columnes capil·lars de diàmetre intern molt petit (normalment 50-75 μ m).

Quan se li aplica un camp elèctric a una solució que conté ions, aquests es començaran a moure i la seva mobilitat dependrà de la seva càrrega i de la seva mida. La mida dels ions està relacionada amb la seva M , la seva estructura tridimensional i el seu grau de solvatació. Fent balanç entre les forces d'electromobilitat i fricció, la mobilitat electroforètica (m_e , μ_e), que és constant per a cada ió determinat, pot expressar-se com: $\mu_e = q/6\pi\eta r$, on q és la càrrega de l'ió, η és la viscositat del BGE i r és el radi de l'ió solvatat. Si tenim una mescla de diferents substàncies, a l'aplicar un camp elèctric, la diferència en la μ_e , farà que els anions migrin cap al pol positiu (ànode) i els cations cap al pol negatiu (cànode). A més, els ions més petits i més carregats migraran a major velocitat que els de major mida i menys carregats [115].

Quan s'utilitzen capil·lars de sílice fosa, un constituent fonamental de les separacions electroforètiques és el flux electroosmòtic (EOF) [116-117]. La superfície de la paret interna d'aquests capil·lars conté grups silanols, que s'ionitzen a partir de pH 2. Els silanols ionitzats atreuen els contraions catiónics de l'electròlit de separació i es forma una doble capa de cations que origina una diferència de potencial coneguda com a potencial zeta [116-117] (figura 1.7). Quan s'aplica un camp elèctric, els cations de la

doble capa es mouen cap al càtode, arrossegant el BGE que omple el capil·lar. Aquest EOF catòdic provoca el moviment de totes les espècies, ja siguin positives, negatives o neutres cap al càtode, on està situat el detector, i té un efecte molt important en la separació dels anàlits, ja que minimitza els efectes de dispersió [116-117]. La mobilitat efectiva dels anàlits ve donada, doncs per la seva m_e i l'EOF. En l'actualitat, s'han descrit nombroses alternatives per controlar l'EOF. Aquestes permeten, a més d'optimitzar les separacions, evitar l'adsorció irreversible dels anàlits a les parets del capil·lar. En aquest sentit es fan servir capil·lars recoberts o l'addició de reactius adequats al BGE [15, 118].

Altres factors importants que afecten a la separació i que generalment estan interrelacionats són: la quantitat de mostra a injectar, la mida del capil·lar (longitud i diàmetre), la calor per efecte Joule, la temperatura de treball i el voltatge emprat en la separació. El control d'aquests factors és imprescindible per a poder aconseguir separacions reproduïbles i d'alta resolució [115].

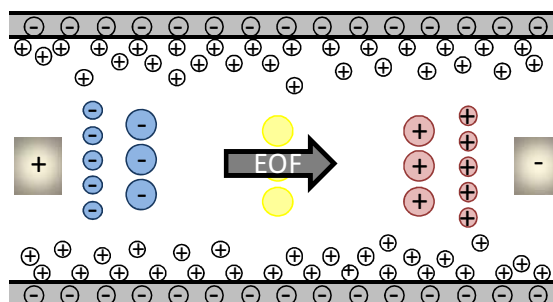


Figura 1.7. Representació de la migració electroforètica de diferents molècules i de la formació de l'EOF en un capil·lar de sílice fosa.

1.4.4. Espectrometria de masses (MS)

La MS està molt lligada a la Química Analítica moderna i s'ha convertit en una eina de gran importància per a la identificació i caracterització de molècules senzilles, macromolècules, oligòmers i estructures supramoleculares [119]. El potencial de la MS augmenta quan s'acobla en línia amb una tècnica de separació d'alta resolució (LC-MS i CE-MS) a l'afegir la dimensió de la separació cromatogràfica o electroforètica. Pel que fa a la sensibilitat, ambdues tècniques acoblades permeten la preconcentració dels anàlits en pics cromatogràfics o electroforètics. A més, la separació pot prevenir

la supressió d'ionització provocada per l'elució o migració dels anàlits amb altres components de la mescla que estiguin més concentrats o que s'ionitzin millor.

1.4.4.1. Ionització

Els espectròmetres de masses són instruments sofisticats que en general consten d'un sistema d'introducció de la mostra (p. e. bomba d'infusió, cromatògraf de líquids o electroforesi capil·lar), una font d'ionització, un analitzador i un detector.

Entre les interfases més emprades per a obtenir ions moleculars en fase gasosa, a partir dels anàlits en solució, per a la posterior anàlisi per MS, en destaquen la ionització per electrospai (ESI) i la ionització per desorció làser assistida per una matriu (MALDI). Aquestes tècniques són capaces d'ionitzar en condicions suaus molècules polars d'elevat pes molecular i en ocasions làbils, com les proteïnes intactes i els seus complexos [4, 120-123]. La seva contribució a la Química Analítica moderna es va reconèixer l'any 2002, quan es va atorgar el Premi Nobel de Química a John B. Fenn i Koichi Tanaka, descobridors d'ambdues tècniques de ionització (ESI i MALDI, respectivament) [124].

Ionització per electrospai (ESI)

L'ESI és una de les tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica més emprades per l'acoblament el línia de l'HPLC i la CE amb la MS [5, 116].

En l'ESI es produeix la ionització dels anàlits mitjançant l'aplicació d'una diferència de potencial entre l'extrem del capil·lar per on flueix la mostra líquida (normalment cabals compresos entre 1 i 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) i el contraelectrode situat a l'entrada de l'espectròmetre de masses (figura 1.8) [127]. El procés d'ionització genera ions moleculars multicarregats, la qual cosa permet l'anàlisi de molècules d'elevat pes molecular emprant analitzadors de m/z amb intervals d'escombratge convencionals. Entre els analitzadors més emprats es poden destacar el de quadrupol (Q), la trampa d'ions (IT) i el de temps de vol (TOF).

En les interfases d'ESI, és molt important ajustar correctament els paràmetres instrumentals per arribar a l'equilibri adequat entre el subministrament de suficient energia d'activació, que asseguri una bona sensibilitat, i la preservació dels grups més làbils, com les conformacions i les interaccions no covalents. Actualment, s'accepta àmpliament que alguns elements de la conformació proteica en solució, les

interaccions no covalents amb metalls, certs alguns o els oligòmers proteics es poden conservar durant el procés d'ionització si s'utilitzen les condicions apropiades [122-123, 125-126]. D'altra banda, l'eficàcia de la ionització depèn de les propietats de la molècula, del pH i de la composició de la solució on es troba dissolta [127]. Per a treballar en mode positiu (ESI+) és habitual emprar dissolucions hidroorgàniques amb concentracions moderades d'àcids orgànics volàtils (0.05-0.5% v/v d'àcid acètic o d'àcid fòrmic).

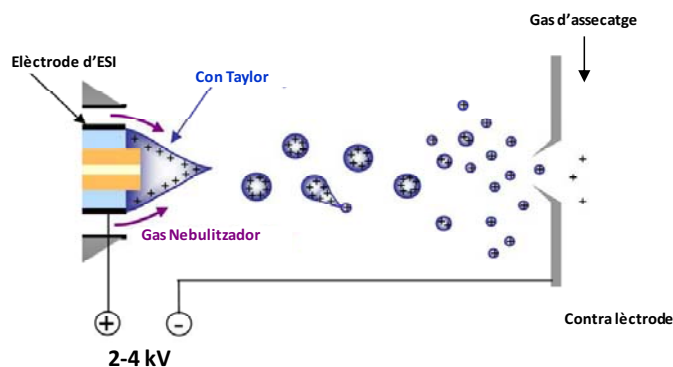


Figura 1.8: ESI.

En l'actualitat existeixen interfases d'ESI comercials per a l'acoblament en línia de l'HPLC (convencional, micro o nano) o la CE a la MS amb ionització per electrospai (LC-ESI-MS i CE-ESI-MS, o simplement LC-MS i CE-MS). En totes s'utilitza generalment N_2 com a gas nebulitzador per assistir la ionització. Entre les interfases que s'han descrit destaca especialment la que utilitza un líquid auxiliar coaxial ("*coaxial sheath-liquid*") que té una doble funció: d'una banda augmenta el cabal proporcionat per la CE i d'altra banda, tanca la connexió elèctrica a la sortida del capil·lar [3, 128]. Aquesta interfase destaca per la reproductibilitat dels resultats, la robustesa, fàcil implementació i versatilitat, però alguns autors continuen criticant que la dilució pot tenir un efecte negatiu en els límits de detecció (LODs) [4]. En general, la composició del líquid coaxial és un dels paràmetres que més afecten a l'eficàcia de la ionització i s'ha d'optimitzar per a cada aplicació concreta [128].

En l'actualitat, l'ús de l'ESI no està exempt de reptes per a l'anàlisi de biomolècules. Les condicions necessàries per a una ionització i desolvatació òptimes (dissolvents orgànics, àcids volàtils, potencials d'ionització i temperatures relativament elevades) poden ser negatives per a l'estabilitat d'algunes biomolècules [129]. Una bona alternativa per a superar aquests inconvenients, són les fonts miniaturitzades de nano-ionització per electrospai (n-ESI), en les que s'ha reduït el diàmetre intern de

l'elèctrode, el cabal de treball i la quantitat de mostra necessàries. El seu principal avantatge rau en una ionització molt eficaç i suau, apropiada per a l'obtenció d'ions moleculars en fase gas de molècules especialment làbils [130-131]. A més, s'augmenta la sensibilitat, la tolerància a les sals [130] i s'elimina la necessitat de fer servir dissolvents i àcids orgànics, així com temperatures massa elevades [121, 129]. També s'ha observat que es minimitza la supressió iònica i els efectes de matriu que dificulten l'ESI convencional [131]. Amb tots aquests avantatges, la n-ESI s'està convertint en la tècnica escollida per molts autors per a dur a terme estudis de metal·loproteïnes, glicoproteïnes, oligòmers i complexos proteics especialment làbils emprant solucions tampó aquoses neutres [131-132].

Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI)

El MALDI és una tècnica que no es pot acoblar en línia a l'HPLC o a la CE [5,116] tot i que s'han dissenyat diferents sistemes per automatitzar-la quan es vol combinar amb aquestes tècniques de separació [128].

En MALDI es produeix la ionització dels anàlits quan es fa incidir sobre la mostra un làser d'energia adequada en el buit elevat de l'espectròmetre de masses (figura 1.9) [133-134]. Per a que això succeeixi, primer s'ha de barrejar una solució de la mostra amb un gran excés d'una solució de la matriu adequada. Quan el dissolvent s'evapora, les molècules de matriu i anàlit cocrystal·litzen per a que la matriu, a l'absorbir els fotons de la radiació làser, permeti la ionització de les molècules de l'anàlit. Aquestes matrius solen ser àcids orgànics de baix pes molecular [135]. El làser més emprat és el de N_2 i es pot operar tant en mode positiu com negatiu, depenent de la matriu seleccionada. Els ions que es generen tenen poques càrregues, fins i tot els de les molècules de pes molecular elevat, el que dóna com a resultat espectres de major simplicitat que els obtinguts amb ESI [133-134].

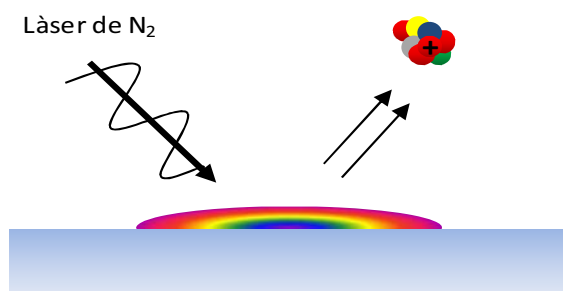


Figura 1.9. MALDI

Com passa amb l'ESI, el mecanisme pel què es produeix la ionització no s'entén completament i la selecció d'una matriu adequada i la forma de preparar i cristal·litzar la mescla es realitza moltes vegades empíricament. Les matrius més emprades per a pèptids són derivats de l'àcid cinàmic (àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic) i l'àcid dihidroxibenzoic (àcid 2,5-dihidroxibenzoic), mentre que els derivats de l'àcid sinapínic (àcid trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinàmic, SA) són els més emprats per a l'anàlisi de proteïnes [133-134]. A diferència del que succeeix amb ESI, els ions s'originen des de l'estat sòlid i no es produeixen de forma contínua, sinó en paquets discrets i això limita, com ja s'ha comentat, el seu acoblament en línia amb l'HPLC o la CE, i també el tipus d'analitzadors que s'utilitzen. En general, solen emprar-se espectròmetres de masses amb analitzadors de temps de vol (MALDI-TOF-MS).

1.4.4.2. Analitzadors d'espectrometria de masses (MS)

Entre els avantatges de molts dels nous espectròmetres de masses es destaquen: l'elevada resolució (permeten distingir les distribucions isotòpiques d'ions moleculars multicarregats així com identificar la seva càrrega); l'exactitud (millora la fiabilitat en la identificació dels anàlits); l'excel·lent sensibilitat i l'ampliació dels intervals dinàmics (permeten determinar simultàniament components de la mescla a diferents nivells de concentració) [136].

A l'hora d'acoblar-los en línia amb la CE, els espectròmetres de masses han de presentar també una velocitat d'escombratge elevada, per poder aprofitar la majoria dels ions formats, i un temps d'adquisició reduït, de manera que es puguin adquirir diversos espectres per cadascun dels pics electroforètics si són molt estrets [137].

L'analitzador de quadrupol (Q) va ser el que es va utilitzar en el primer instrument comercial de CE-MS. Malgrat les bones prestacions i el cost raonable, aquests analitzadors són poc adequats per a l'estudi de mostres complexes, ja que proporcionen poca informació estructural [128]. A més, solen presentar velocitats d'escombratge petites [128]. L'analitzador de triple quadrupol (QqQ) pot treballar en el mode de monitorització de reacció seleccionada/múltiple (SRM/MRM) que és molt selectiu i permet una gran sensibilitat, però els ions s'han de seleccionar abans de l'anàlisi [138-139]. Els analitzadors de trampa d'ions (IT) són més ràpids, capaços d'adquirir diversos espectres per segon i permeten realitzar experiments de masses

en tàndem (MS/MS i MSⁿ), però tenen un interval dinàmic bastant estret a causa de la capacitat limitada de la IT.

Els espectròmetres de masses de ressonància ciclòtrica amb transformada de Fourier (FT-ICR) tenen una excel·lent exactitud, resolució i sensibilitat [4, 138, 140-141], però són poc recomanables quan l'eficàcia de les separacions és molt gran i els pics són molt estrets [128, 141]. A més, el seu preu és especialment elevat [3, 128, 138, 141-140]. Avui dia, una de les millors alternatives per acoblar en línia la CE amb la MS són els analitzadors de temps de vol (TOF). La majoria dels TOF actuals amb font d'ESI són d'acceleració ortogonal (oa), on un camp elèctric polsant extrau perpendicularment els ions moleculars abans d'arribar al detector. Les seves prestacions d'exactitud i resolució són, en principi, lleugerament inferiors a les d'altres analitzadors com l'FT-ICR, l'orbitrap o el de sector magnètic, però presenten una velocitat d'escombratge elevada i un preu més econòmic [137, 142-143].

No obstant l'excel·lent exactitud i resolució dels espectròmetres de masses que hem tractat fins ara, no permeten discriminar entre ions moleculars amb valors de m/z idèntica, com és el cas dels oligòmers d'una mateixa proteïna. Si aquests ions tenen mida diferent, es pot emprar l'espectrometria de mobilitat iònica (IM) que separa els ions en fase gas en funció de les seves mobilitats, que és aproximadament proporcional a la seva relació mida-càrrega [123, 138]. La IM és una eina molt important per a la investigació en proteòmica si s'acobla en línia amb la MS (IM-MS), ja que llavors s'obtenen espectres en tres dimensions, amb una dimensió de separació addicional (m/z , intensitat i IM) [144-145]. La IM-MS s'utilitza per separar i caracteritzar isòmers, confòrmers, oligòmers complexos i, en general, tot tipus d'ions amb la mateixa m/z que tinguin mobilitats diferents [138, 144-146].

En l'actualitat, hi ha tres dissenys instrumentals comercialment disponibles dels quals es descriurà breument el d'espectrometria de mobilitat iònica de temps de deriva (DTIMS) per la seva importància en aquesta tesi doctoral (figura 1.10). La DTIMS va ser el primer tipus d'IM que es va desenvolupar i ha esdevingut la modalitat més utilitzada. Per aquest motiu sovint es fa servir les sigles IM en comptes de DTIMS. En DTIMS els ions en fase gas es mouen a través d'un camp elèctric continu i homogeni en presència de molècules de gas neutre [138] (figura 1.10). El temps que triguen els ions en migrar, així com la seva velocitat, és directament proporcional a la seva secció

transversal de col·lisió (CCS) i inversament proporcional a la seva càrrega. La CCS està relacionada amb la conformació i la massa molecular (M) dels ions en fase gas [123, 144]. Tot i que proporciona una excel·lent resolució i és la única de les tres modalitats que permet la mesura directa de la CCS, la DTIMS és la que presenta menor sensibilitat [138]. Aquest fet, es veu compensat, en part, per la utilització d'interfases de n-ESI, amb els avantatges que això representa [138].

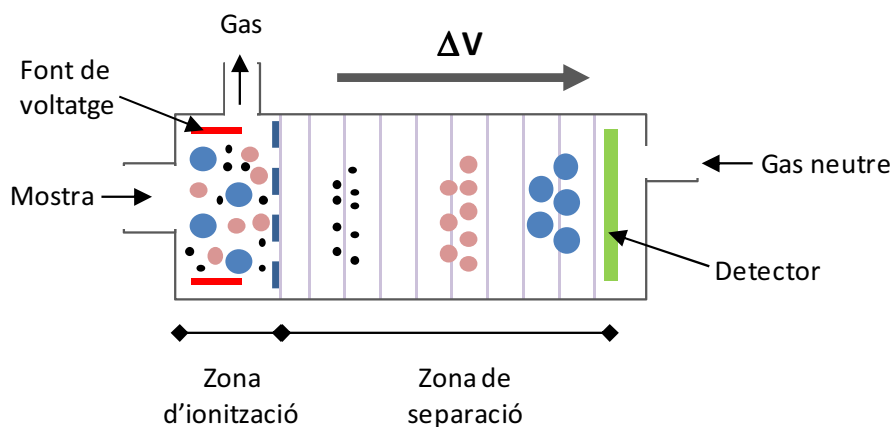


Figura 1.10. DTIMS.

1.6. BIOMOLÈCULES ESTUDIADES. MALALTIES RELACIONADES

1.6.1. Neuropèptids. Pèptids opiacis

Els neuropèptids tenen un paper fonamental en un gran nombre de processos fisiològics. Actuen com a hormones i neurotransmissors, regulant les transmissions de senyals al sistema nerviós central. Alguns d'ells estan implicats en la regulació d'emocions i d'altres, com els pèptids opiacis, estan involucrats principalment en la percepció del dolor [147-148].

Els pèptids opiacis deuen el seu nom a que actuen produint efectes similars als analgèsics derivats de l'opi, com la morfina. Les seves propietats terapèutiques són apreciades a la indústria farmacèutica perquè no provoquen efectes secundaris com l'addicció [147]. A més a més, el seu estudi és de gran rellevància en recerca biomèdica com a biomarcadors. Alguns autors han relacionat els pèptids opiacis

La Cu₂Zn₂-SOD-1 es troba majoritàriament en els eritròcits [156] però també se'n troba en fluids biològics extracel·lulars com el plasma, la limfa i el fluid sinovial [157]. Existeixen altres tipus de SOD com la Mn-SOD que es troba principalment als mitocondris [21, 157] i la Fe-SOD que s'ha aïllat en bacteris i que no s'ha trobat en cap teixit animal [157].

La SOD-1 humana té un gran interès mèdic ja que es troba relacionada amb l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) [45]. L'ALS, és la malaltia neurodegenerativa més greu que afecta a les motoneurons humanes. La seva causa encara és desconeguda i provoca una paràlisi muscular progressiva de pronòstic mortal [158]. Les motoneurons són un tipus de cèl·lules que es troben situades al cervell i a la medul·la espinal i que tenen la funció de produir els estímuls que provoquen les contraccions dels músculs de l'organisme. El nom de la malaltia, descrita per primera vegada en 1869 pel metge francès Jean Marie Charcot (1825-1893), especifica les seves característiques principals:

- Esclerosi lateral: pèrdua de fibres nervioses i esclerosi (del grec, σκλήρωσις, "enduriment" en la zona lateral de la medul·la espinal).
- Amiotròfica: atròfia muscular per la inactivitat muscular crònica.

En l'ALS les funcions cerebrals no relacionades amb l'activitat motora, com la sensibilitat, la funció sexual i la intel·ligència, es mantenen inalterades. Tampoc es veuen afectades les motoneurons que controlen els moviments oculars i els esfínters. Aquesta malaltia afecta especialment a persones amb edats entre 40 i 70 anys i és més freqüent entre els homes. Avui dia no existeix cap tractament que permeti la seva curació i és una malaltia altament incapacitant, però hi ha fàrmacs per a lluitar contra el conjunt de símptomes que l'acompanyen [158].

Existeixen dos tipus d'ALS: l'ALS esporàdica i l'ALS familiar (fALS), que és hereditària. Tots dos tipus es caracteritzen per l'aparició d'agregats fibril·lars intracel·lulars insolubles de SOD-1. En un 5-10% dels casos de fALS, l'agregació de la SOD-1 podria explicar-se per les mutacions trobades a la cadena d'aminoàcids de la SOD-1 [21, 48, 153]. A la resta de casos la causa no és tan clara. Alguns autors postulen que l'agregació podria iniciar-se amb la dissociació de la forma dimèrica nativa [45, 76-77]. Altres autors creuen que l'alteració de les PTMs podria tenir els mateixos efectes que les mutacions [77]. Per verificar ambdues hipòtesis és de gran importància

desenvolupar metodologies analítiques amb tècniques que permetin conservar l'estructura nativa de la SOD-1 i caracteritzar en detall les seves PTMs.

1.6.3. Prió cel·lular (PrP^C). Encefalopatia espongiforme transmissible (TSE)

Prió (PrP) és un terme encunyat en 1982 per Stanley B. Prusiner que es deriva de les paraules “*protein*” i “*infection*” [102, 159]. Les TSEs són un conjunt de malalties neurodegeneratives infeccioses de certs mamífers on l'agent responsable de la transmissió és el prió patològic (PrP^{Sc}) [80]. Afecten al sistema nerviós central i els símptomes que s'observen són deguts a l'acumulació d'agregats amiloides de PrP^{Sc} a les cèl·lules neuronals, el que origina la mort cel·lular. L'anàlisi microscòpic del teixit afectat revela lesions com vacuoles que donen al teixit nerviós un aspecte d'esponja [44, 80, 160]. L'acrònim “Sc” prové del terme anglès “*Scrapie*” que deriva d'un dels símptomes de la TSE de les ovelles, la tendència dels animals infectats a rascar-se compulsivament. A la taula 1.3 és resumeixen les TSEs més importants juntament amb l'espècie animal que les pateix.

Tot i que en general, el període d'incubació de les TSEs és llarg, una vegada es declara, la malaltia progressa ràpidament fins la mort de l'individu afectat. En humans, la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJ), ho fa en forma de demència. La CJ es pot classificar en funció de la seva aparició en: esporàdica (es desconeixen les causes de la seva aparició), familiar (hi ha factors d'herència genètica) i iatrogènica (deguda al contacte amb teixits infectats).

TSE	Hoste	Acrònim en anglès
Scrapie	Ovelles i rosegadors	Sc
Encefalopatia espongiforme bovina	Bovins	BSE
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob	Humans	CJ
Malaltia de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Humans	GSS
Insomni fatal familiar	Humans	FFI
Kuru*	Humans	

Taula 1.3. TSEs més importants [44, 81, 102, 160-161]. *El Kuru es va eradicar completament al prohibir-se les pràctiques de canibalisme a Papúa Nova Guinea.

El prió cel·lular (PrP^{C}) és una glicoproteïna de membrana que es troba a molts teixits, però la major concentració es troba al cervell [166]. Presenta diversos graus de glicosilació com es pot observar a l'electroferograma de la figura 1.12 i té activitat superòxid dismutasa mitjançant el cicle d'oxidació reducció del Cu^{2+} [167].

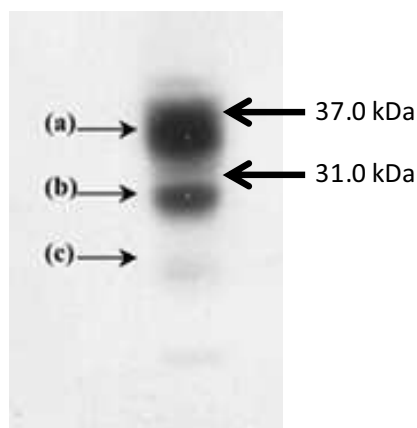
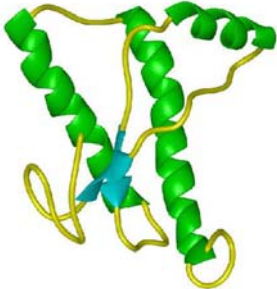
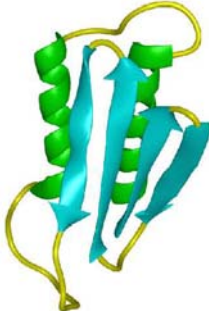


Figura 1.12. Anàlisi per WB d'un patró de PrP^{C} .
a) di-glicosilat, b) mono-glicosilat; c) no glicosilat [81].

S'han postulat diverses hipòtesis per a explicar l'aparició de la CJ, com la mutació del gen del PrP^{C} o la conversió espontània del PrP^{C} en PrP^{Sc} . Com es pot observar a la taula 1.4 les seves conformacions són totalment diferents, la qual cosa explicaria la formació dels agregats amiloides característics. Les diferències estructurals no afecten a la seqüència d'aminoàcids [81-82, 162] però no està gaire clar el paper que juguen les PTMs, especialment la glicosilació. La modificació estructural ve acompanyada d'alteracions molt importants en les seves propietats (veure taula 1.4), que han estat àmpliament utilitzades per a la detecció de PrP^{Sc} i la diagnòsi de TSEs [81, 162]. En canvi, l'extracció i purificació del PrP^{C} , donada la seva resistència limitada a les proteases, és molt complicada i el rendiment de tot el procés és relativament baix. Per aquest motiu s'han realitzat molts estudis estructurals a partir de PrP^{Sc} i de prió recombinant (rPrP), que manté el pont de disulfur però que no conté la resta de PTMs [82], ni presenta activitat superòxid dismutasa [161]. La confirmació d'un diagnòstic de TSE es realitza mitjançant assajos immunohistològics, per WB i per ELISA [162] un cop ha mort o s'ha sacrificat l'individu malalt, en laboratoris de seguretat biològica 2 o 3, en funció de la font consultada [168-170]. Per aquesta raó és de gran importància el desenvolupament de metodologies analítiques que permetin la detecció i la caracterització acurada del PrP^{Sc} i el PrP^{C} *in vivo* i durant els estadis inicials de la malaltia.

PrP ^C	PrP ^{Sc}
Soluble en detergents no iònics	Insoluble en detergents no iònics
Sensible a les proteases	Resistent a les proteases
Alt contingut en hèlix α	Alt contingut en làmines β
S'uneix al coure en condicions fisiològiques	No s'uneix al coure en condicions fisiològiques
Alt grau de glicosilació	Baix grau de glicosilació
No s'acumula	S'acumula
	

Taula 1.4. Principals diferències entre el PrP^C i el PrP^{Sc} humà [44, 81-82, 90, 167, 171].

Una de les possibles vies de transmissió de la TSE en humans, que ja s'ha mencionat anteriorment, és el consum de carn contaminada amb PrP^{Sc} provinent d'una vaca afectada de BSE (“vaca boja”) [44]. D'aquesta mateixa manera és com es creu que PrP^{Sc} provinent d'anyells o ovelles amb “*Scrapie*” va arribar a les vaques, després d'alimentar-les amb pinsos preparats a partir de materials procedents d'aquests animals. Després de la mort de diverses persones pel consum de carn contaminada, les autoritats van haver de prendre mesures, entre d'altres, prohibir aquesta pràctica habitual de la indústria dels pinsos. Alguns mitjans de comunicació fins i tot la van qualificar d'epidèmia. Avui dia, les mesures de prevenció i el ressò mediàtic del “mal de les vaques boges” encara és present. Això és degut, en part, a que tot i els esforços realitzats, les TSE encara no tenen tractament i el seu pronòstic tant en animals com a humans continua essent mortal.

CAPÍTOL 2. EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ DE PrP^C

L'establiment de noves metodologies per a la caracterització del PrP^C mitjançant tècniques de separació d'alta resolució acoblades a la MS pot ser d'utilitat per aprofundir en els mecanismes de conversió del PrP^C a PrP^{Sc}. No obstant això, aquests estudis requereixen l'ús de patrons que sovint, com en aquest cas, no es troben disponibles comercialment i s'han de purificar a partir dels materials adients.

La purificació de PrP^C a partir de cervell boví és un procés complicat degut, especialment, a la seva resistència limitada a la proteòlisi. Això provoca que no es trobi disponible comercialment i que molta informació sobre la seva estructura s'hagi obtingut a partir de l'estudi del rPrP i el PrP^{Sc}, que es poden obtenir més fàcilment i en més quantitat, principalment en el cas del rPrP. Per relacionar tots tres s'han utilitzat tradicionalment diferents models informàtics i representacions tridimensionals, dicromisme circular, ressonància magnètica nuclear i WB.

La tecnologia de DNA recombinant permet obtenir quantitats relativament elevades de rPrP, però un dels seus grans inconvenients és que la seva funcionalitat es pot veure afectada perquè no presenta les PTMs característiques del PrP^C. Pel que fa a l'obtenció del PrP^{Sc}, els mètodes d'extracció i purificació descrits a la bibliografia són força uniformes i es basen fonamentalment en la seva resistència parcial a la proteasa K i la seva baixa solubilitat en dissolvents no iònics. Pel contrari, no hi ha propietats tan específiques que permetin aïllar i purificar el PrP^C i cada autor suggereix el seu procediment, amb l'únic punt en comú, de no fer servir proteases en cap cas.

En aquest treball, s'ha desenvolupat una nova metodologia d'extracció i purificació de PrP^C a partir de cervell boví utilitzant centrifugació diferencial, SEC, diafiltració i Cu²⁺-IMAC. L'optimització de les diferents etapes s'ha avaluat emprant WB per a la separació i detecció del PrP^C.

El treball realitzat ha conduït a la següent publicació:

- Evaluation of non-immunoaffinity methods for isolation of cellular prion protein from bovine brain. **Borges-Alvarez. M., Márquez M., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** Anal Bioanal Chem. (2012) enviat per a la seva publicació.

Article 2.1.

Evaluation of non-immunoaffinity methods for isolation of cellular prion protein from bovine brain

M. Borges-Alvarez^a, F. Benavente^{a*}, M. Márquez^b, J. Barbosa^a, V. Sanz-Nebot^a

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^bAnimal Tissue Bank of Catalunya, Department of Animal Medicine and Surgery, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

*Corresponding author: fbenavente@ub.edu, +34-934039123, Fax +34-934021233

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are progressive neurodegenerative diseases that affect the central nervous system of many animals, including humans. Research suggests that TSEs are caused by conversion of the cellular prion protein (PrP^C), which is encoded in many tissues especially in brain, to the pathological form (PrP^{Sc}). This conversion affects PrP^{Sc} structure conferring different biochemical properties such as the increased resistance to protease K that have been widely used for its purification. By contrast, PrP^C is less resistant and its isolation is a challenging purpose. Here, we propose a purification strategy to efficiently recover PrP^C from healthy bovine brain using conventional, non-immunoaffinity methods. The applicability of extraction using detergents, size exclusion chromatography, diafiltration with molecular weight cut-off filters and immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using western blot (WB) analysis to detect the presence of PrP^C is discussed in detail.

KEYWORDS: Cellular prion protein, SEC, IMAC, purification, Western Blot.

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) belong to a group of progressive neurodegenerative diseases that affect the central nervous system in animals and humans, such as scrapie in sheep and goat, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle, chronic wasting disease in deer and elk or Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) and fatal familial insomnia (FFI) in humans [1]. The causative agent of TSEs is believed to be linked to the presence of a host encoded prion protein PrP [2]. TSEs are manifested as sporadic, infectious or genetic disorders that are characterized by accumulation of the abnormal scrapie isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^C), which is mostly expressed in the brain [1]. The critical event in TSE pathogenesis has been proposed to be the conformational transition from the native PrP^C to the disease-related PrP^{Sc} [2]. This post-translational conversion involves non-covalent modifications, leading to aggregation of PrP^{Sc} into scrapie associated fibrils, which form the typical proteinaceous plaques. The appearance of these plaques and the spongiform modifications of the grey matter are the main histopathological features of TSEs [3]. PrP^C contains two N-linked glycosylation sites and is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane protein with a higher content of α -helices than β -sheets in the secondary structure [2, 4-14]. In contrast with PrP^C, PrP^{Sc} isoform is partially protease K resistant, it is insoluble in non-ionic detergents and it does not bind to copper [9]. These specific biochemical properties have been widely used for differentiation between PrP^{Sc} and PrP^C, facilitating purification and detection of PrP^{Sc} as well as diagnosis of TSEs [5]. In contrast, isolation of native PrP^C from brain tissue is more challenging and many authors have preferred to use recombinant prion proteins (rPrP) expressed in *Escherichia coli* as standard, because it is easier to obtain and purify with

large recoveries [2, 6-7, 10, 15-17]. However, rPrP is unlikely to be truly representative of PrP^C, because the recombinant protein expressed in *E. Coli* lack of the post-translational modifications of the native mammalian protein [2, 7, 10-11]. Therefore, developing efficient methods for large scale purification of PrP^C in its natively folded form with all its post-translational modifications is critical to obtain standards for elucidation of the mechanisms of conformational transition to PrP^{Sc}.

In general, methods for isolation of PrP^C from brain include a first step of preparation of brain homogenates and subcellular fractionation by differential centrifugation to obtain the membrane fraction. Then PrP^C is separated from the membrane with the use of detergents or a specific lipase called phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC). Soluble fractions containing PrP^C are pooled and purified by immunoprecipitation [18], diafiltration using molecular weight cut-off filters [7] or chromatographic techniques, such as cationic exchange chromatography [2, 12, 19], immobilized Cu²⁺ or Co²⁺ affinity chromatography (Cu²⁺ or Co²⁺-IMAC) [2-3, 7, 12, 20], immunoaffinity chromatography (IAC) [19], lectin affinity chromatography [21] or size exclusion chromatography (SEC) [20, 22]. Here, we describe a procedure that does not include immunoaffinity-based steps, which are the gold standard proposed by others due to the excellent selectivity [23, 24]. However, immunoprecipitation and IAC are difficult to scale-up due to the elevated costs, poor recoveries and limited stability of anti-PrP^C sorbents [12]. In our method, PrP^C extracted from the membrane fraction obtained by centrifugal filtration of the brain homogenates, was purified using SEC followed by

diafiltration and Cu²⁺-IMAC and using western blot (WB) analysis for PrP^C detection.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemicals used in the preparation of buffers and solutions were of analytical reagent grade. Acetone, methanol, ethanol, hydrochloric acid (25%), trifluoroacetic acid (TFA), ammonia (25%) and copper (II) sulfate pentahydrate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA) and imidazole were purchased at Fluka (Madrid, Spain). Potassium chloride, sodium chloride, ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A), DL-dithiothreitol (for electrophoresis), bovine serum albumin (BSA), albumin from chicken egg white (ALB), superoxide dismutase 1 (SOD-1) from bovine erythrocytes, sodium bicarbonate, sucrose, Tween 20 and N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate were supplied by Sigma (Madrid, Spain). Tris(hydroxymethyl)aminomethane and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt were purchased at J. T. Baker (Deventer, The Netherlands) and Panreac (Barcelona, Spain), respectively. Aprotinin from bovine lung, leupeptin hemisulfate and pepstatin A were supplied by Calbiochem (Darmstadt, Germany). Water with a conductivity value lower than 0.05 µS/cm was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

Protein standard solutions and samples

0.5 mg·mL⁻¹ individual solutions and a mixture of BSA, ALB, CA and RNase A were prepared in one of the mobile phases (MP) tested in SEC (10 mM Tris and 0.15 M KCl, pH 7.5, SEC mobile phase 2, SEC MP-2). A 1 mg·mL⁻¹ solution of commercial SOD-1, which is a homodimer formed by two identical monomers which coordinates one Cu²⁺ and Zn²⁺ per unit (Cu₂Zn₂-dimer SOD-1) [25], was demetalated to obtain Apo-SOD-1 by acidification with TFA and diafiltration following a procedure described elsewhere [26]. The final Apo-SOD-1 solution of approximately 1 mg·mL⁻¹ was prepared in SEC MP-2 and was used as a standard for Cu²⁺-IMAC.

The brain of a healthy 4-years-old Pyrenean Brown female cow tested negative for BSE was provided by the Animal Tissue Bank of Catalunya (BTAC) of the Autonomous University of Barcelona (Bellaterra, Spain). It was cut into slices and stored at -80°C until its use.

Extraction

PrP^C was extracted from the membrane fraction combining and adapting different parts of several methods described in the literature [2-3, 7, 12, 19-20, 22, 27-28].

To hinder denaturation and inactivation processes, all steps were performed at 4 °C. After thawing, approximately 40 g of midbrain was homogenized with a Polytron PT-10-35 (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) for three periods of five seconds separated by a 10s break in an erlenmeyer containing

200 mL of ice-cold homogenation buffer (10 mM Tris, 100 mM KCl, 320 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol, 1 mM NaHCO₃, 5 µg·mL⁻¹ leupeptin and 10 µg·mL⁻¹ aprotinin, pH 7.5). To collect the membrane fraction, the homogenates were centrifuged at 5500 rpm during 10 min at 4°C (Centrifuge TM Avanti TM J-25, Beckman Coulter. Rotor: JA 25.5). The pellet was removed and saved, and the resulting supernatant was centrifuged at 10000 rpm during 10 min. The new pellet was collected and mixed with the previous one. Both pellets were solubilised in 60 mL of incubation solution (1 % (w/v) N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (zwittergent 3-12), 5 µg·mL⁻¹ leupeptin, 10 µg·mL⁻¹ aprotinin and 1 µg·mL⁻¹ pepstatin) using mechanic agitation during 90 min. Then, 90 mL of dilution buffer (10 mM Tris, 100 mM KCl, 5 µg·mL⁻¹ leupeptin, 10 µg·mL⁻¹ aprotinin and 1 µg·mL⁻¹ pepstatin, pH 7.5) were added to make a final concentration of 0.4 % (w/v) of N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate. The suspension was stirred overnight and later centrifuged at 30000 rpm for 3 h at 4°C (Ultracentrifuge TM L-90K, Beckman Coulter. Rotor: 35). The final supernatant was separated and subsequently filtered through 0.45 and 0.22 µm nylon filters (MSI).

Purification

Size Exclusion Chromatography (SEC)

Before SEC, the filtered extract was concentrated 5 times using Amicon Ultra-10 centrifugal devices (Molecular weight cut-off, MWCO, 10000 Da) (Millipore, Beverly, MA, USA) at 4100 rpm in a Rotanta 460 centrifuge at 4°C (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany).

SEC was performed with a HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using a HP 1100 series liquid chromatograph with a diode array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Instrument control, data acquisition and data processing were performed using the Chemstation LC3D software (Agilent Technologies). With the pressure of this semi-preparative column as a limiting factor, the flow rate was set up to the highest possible (1.5 mL·min⁻¹) to achieve a reasonable separation time (90 min/run). The column was first equilibrated with one column volume of 10 mM Tris and 0.015 M KCl, pH 7.5 (SEC mobile phase 1, SEC MP-1) and then with four column volumes of 10 mM Tris, 0.15 M KCl, pH 7.5 (SEC MP-2). Absorbance was monitored at 220 nm. A calibration curve was constructed by injecting 1 mL of the mixture of protein standards, after identification using individual solutions. The concentrated extract was fractionated injecting volumes of 1 mL and using an LKB Bromma 2212 Helirac fraction collector (LKB, Bromma, Sweden) to collect fractions at 7 min. intervals after 2 min. of the injection. Fractions potentially containing PrP^C were merged and concentrated 15 times using Amicon Ultra-10 or -50 centrifugal devices (MWCO 10000 or 50000 Da, respectively) (Millipore) as indicated at the beginning of this subsection.

Diafiltration using MWCO filters

A single step of diafiltration using different MWCO filters was tested as an alternative to purification with SEC. 15 mL of the filtered extract were centrifuged using Amicon Ultra-30, -50 or -100 centrifugal devices (MWCO 30000, 50000 and 100000 Da, respectively) (Millipore) until reducing the volume to 3 mL (4100 rpm, 4 °C, Rotanta 460 centrifuge).

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

IMAC was performed with a HiTrap IMAC HP (1 mL) and Hi Prep IMAC FF 16/10 (20 mL) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) columns using an HP 1100 series liquid chromatograph with a diode array detector (Agilent Technologies) measuring absorbance at 220 nm. Instrument control, data acquisition and data processing were performed using the Chemstation LC3D software (Agilent Technologies). Separation and fraction collection were optimized using a standard solution of Apo-SOD-1. Commercial SOD-1 was demetallated in order to ensure retention in Cu²⁺-IMAC columns.

HiTrap IMAC HP (1 mL)

All the experiments were performed at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The column was loaded with 5 mL of copper solution (0.1 M CuSO₄), washed with 5 mL of binding buffer (20 mM Tris, 0.5 M KCl and 1 mM imidazole, pH 7.5), 5 mL of elution buffer (20 mM Tris, 0.5 M KCl and 0.5 M imidazole, pH 7.5) and again with 3 mL of binding buffer. Then the concentrated fractions from SEC or the single-step diafiltration process were applied on to the column. After washing with 7 mL of binding buffer, the bound proteins were eluted with 5 mL of elution buffer. The fraction containing PrP^C was collected using the fraction collector. Before a new injection, the column was equilibrated with 5 mL of binding buffer. After 5 runs (1 blank and 4 samples), copper was removed from the column using 15 mL of EDTA solution (0.5 M KCl and 50 mM EDTA) and equilibrated with 5 mL of binding buffer.

Hi Prep IMAC FF 16/10 (20 mL)

Unless otherwise indicated, the flow rate was set up at 2 mL·min⁻¹. The column was loaded with 20 mL of copper solution, washed with 40 mL of binding buffer, 20 mL of elution buffer at 4 mL·min⁻¹ and equilibrated with 20 mL of binding buffer. Then the concentrated fractions from SEC or the single-step diafiltration process were applied on to the column. After washing with 40 mL of binding buffer, the bound proteins were eluted with 20 mL of elution buffer at 4 mL·min⁻¹. The fraction containing PrP^C was collected using the fraction collector. Before a new injection, the column was equilibrated with 20 mL of binding buffer. After 5 runs (1 blank and 4 samples), copper was removed from the column using 25 mL of EDTA solution and equilibrated with 20 mL of binding buffer.

The fraction containing PrP^C, with both columns, was concentrated until 200 µL using Amicon Ultra-10 centrifugal devices (MWCO 10000 Da) (4100 rpm, 4 °C, Rotanta 460 centrifuge).

Western Blot (WB)

SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out at 200 V during 45 min. PrP^C positive control of Prionics (Schieren, Switzerland), digested and non-digested PrP^{Sc} control and molecular mass standards (Kaleidoscope, Bio-Rad) were included in the gel. 10 µL of each sample were loaded into the wells. After running, prior to protein transfer, PVDF membranes Immobilon-P (Millipore, Molsheim, France) were pre-treated with methanol (some seconds) and equilibrated with transfer buffer (25 µM Tris, 192 µM glycine, containing 10 % methanol (v/v)) for 15 minutes at room temperature. Protein transfer was done at 90 V for 90 min. with continuous cooling at 4 °C. After protein transfer, the PVDF membranes were blocked with PVDF blocking buffer diluted 5 times (Prionics) for 30 min. with agitation at room temperature. Then, membranes were incubated with a 1:5000 dilution of 6H4 antibody (Prionics) with agitation overnight at 4 °C. After incubation, membranes were washed 4 times for 5 min. with TBST (Tris-Buffered Saline and Tween 20) (25 µM Tris, 2.6 µM KCl and 137 µM NaCl, pH 7.4 with 0.05 % (v/v) Tween-20) and then incubated with a 1:5000 dilution of the secondary antibody (Prionics) with agitation for 1 h at room temperature. Then, membranes were washed as before. After washing, membranes were incubated with a 1:10 dilution of the luminescence buffer (Prionics) and dried. Diluted CDP-Star (Disodium 2-chloro-5-(4-methoxy)spiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5-chlorotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan]-4-yl]-1-phenyl phosphate) was added (Applied Biosystems, Carlsbad, California) to the membranes and maintained for 5 min. in the dark without agitation. Finally, chemiluminescence was directly measured up to 40 min.

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

The methodology described in this paper can be divided in two parts. The first part consists in the extraction of bovine PrP^C and the second one is related to purification.

Extraction

Bovine PrP^C was extracted from the brain of a healthy cow combining and adapting different parts of several methods described in the literature [2-3, 7, 12, 19-20, 22, 27-28]. After homogenization of the brain sample, the fraction containing the PrP^C, which is anchored to the cellular membranes, was separated by differential centrifugation [2, 4-14]. After discarding the supernatant, the PrP^C was released from the membranes by using an appropriate non-ionic or zwitterionic detergent [7, 20, 29]. Detergent election (e.g. octyl glucoside, triton X-100 or zwittergent 3-12) depends on its denaturing properties, the kind of the samples and the ease of elimination [29-31]. We chose zwittergent 3-12 because it was the optimal in terms of cost and effectiveness. Once the PrP^C was released from the

membranes, the debris were separated and discarded by ultracentrifugation. It is worth mentioning that in all the stages of the extraction process a mixture of protease inhibitors was added and temperature was maintained at 4 °C in order to prevent PrP^C degradation [2-3, 19, 27]. We did not use sucrose as stabilizer, as some authors also recommend during incubation to release PrP^C from the membranes [32-33], because the final extracts were too dense to be easily filtered.

Purification SEC

We decided to apply SEC as the first purification step so as to increase later the effectiveness of IMAC due to the elimination of a large quantity of proteins that could hinder the interaction of PrP^C with the immobilized copper by unspecific interactions. In order to reduce sample volume to a certain extent before SEC, avoiding an extremely long and tedious purification process, we concentrated the filtered extract using 10000 Da MWCO centrifugal devices. The effectiveness of filtration was confirmed checking by WB analysis that PrP^C was detected in the concentrated solution but not in the filtrates. Figure 1 shows the WB analysis of the molecular weight markers (lane 5), a positive control of prionics (rPrP, lane 4), a concentrated extract using 10 kDa MWCO centrifugal devices (lane 3), a proteinase K digested homogenate of bovine brain infected with (BSE) (PrP^{Sc}, lane 2) and a filtrate of the extract using the centrifugal filters (lane 1). The primary antibody recognized all the PrP forms. Thus, rPrP (lane 4) appeared as a single band around 23 kDa because lacks of the post-translational modifications observed in PrP^{Sc} (lane 2) that showed a wider band distribution due to the different glycoforms.

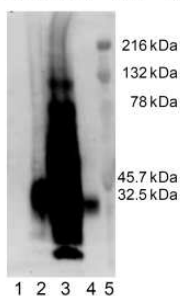


Figure 1. WB analysis of a standard mixture of MW markers (lane 5), a positive control of prionics (rPrP, lane 4), a concentrated extract using 10 kDa MWCO centrifugal devices (lane 3), a proteinase K digested homogenate of bovine brain infected with (BSE) (PrP^{Sc}, lane 2) and a filtrate of the extract using the centrifugal filters (lane 1).

However, the large exposure time applied to detect, if present, the low concentration of PrP^C expected in the filtrates made hardly possible to detect the glycoform patterns of PrP^{Sc} described in other works [3-4, 14, 34]. In a similar way, the analysis of the concentrated extract that was supposed to contain PrP^C also generated an intense band that covered a wide molecular weight range (lane 3), probably because of the high concentration of PrP^C. Lane 1 clearly shows that PrP^C was not detected on the filtrate confirming that those devices were useful for preconcentration of PrP^C.

Figure 2 shows the SEC chromatograms obtained under optimal conditions for the mixture of protein standards used for calibration (a.i) and the extract before (b) and after preconcentration (c.i) using 10000 Da MWCO filters. Four protein standards with MW that covered most of the dynamic range of the

SEC column (3000–70000 Da) and the expected MW of bovine PrP^C isoforms (~37-35 KDa, ~32-28 Kda and ~27-25 kDa for di-, mono- and un-glycosylated forms [14, 35]) were chosen for calibration and confirmation of excellent method reproducibility, namely BSA (66000 Da), ALB (44300 Da), CA (29000 Da) and RNase A (13700 Da). As can be observed from the chromatogram of the standard mixture (Figure 2-a.i) and the calibration curve (Figure 2-a.ii), all of them, as well as several impurities, eluted between 30 and 60 min. ordered by decreasing MW. However, they were not baseline resolved due to the limited separation efficiency achievable with a low-pressure semipreparative column. With regard to the chromatograms of the extracts (Figure 2-b and 2-c.i), the detected components were eluting between 25 and 60 min. suggesting that there were components of MW higher than 66000 Da (MW of BSA), which would not be retained in the column. The larger components were especially abundant in the preconcentrated extract (Figure 2-c.i), probably due to the increased formation of molecular oligomers in the concentrated solution. However preconcentration was necessary in order to purify the total amount of raw extract in a reasonable time. In the chromatogram of Figure 2-c.i we have indicated the fractions that were collected after SEC and analyzed by WB (labeled from H to L). In accordance to the MW of the different isoforms indicated above, PrP^C was supposed to elute after 40 min. in fraction K and L that corresponded to smaller components than ALB (44300 Da). However, instead of eluting in these fractions, it was detected in fractions I and J (Figure 2-c.ii), which corresponded to components with MW higher than 44300 Da (ALB). This fact agreed with oligomerization of PrP^C, as suggested before, a process that could be promoted by the presence of a great amount of proteins and other components in the extracts before and after preconcentration.

Diafiltration using MWCO filters

The potential presence of PrP^C oligomers in the raw extracts, mostly with MW over 70000 Da that was the upper limit of the SEC column dynamic range, led us to explore as an alternative the suitability of single-step purification by diafiltration using 30, 50 or 100 kDa MWCO filters. In order to separate the fractions of proteins with MW comprised between 100 and 30 or 50 and 30 kDa, we passed the extract first through the filter of higher MWCO (100 or 50 kDa) and the filtrate was subsequently filtered with the other one (30 kDa MWCO). Although we were supposed to detect by WB analysis the PrP^C after the whole process with 100-30 kDa or 50-30 kDa filters, in the retentates from the last filtration with 30 kDa MWCO filters, concentration was extremely low in both cases. Detection was only possible after a 60-fold preconcentration and a long exposure time of WB membranes. This fact, together with detection of a high amount of PrP^C in the retentates from the first filtration with 100 or 50 kDa MWCO filters, confirmed that PrP^C was mostly present as oligomers of MW higher than 100 kDa. Therefore, diafiltration using 100 kDa MWCO filters was the best alternative to SEC in terms of time, solvent or reagent consumption, simplicity and ease of handling.

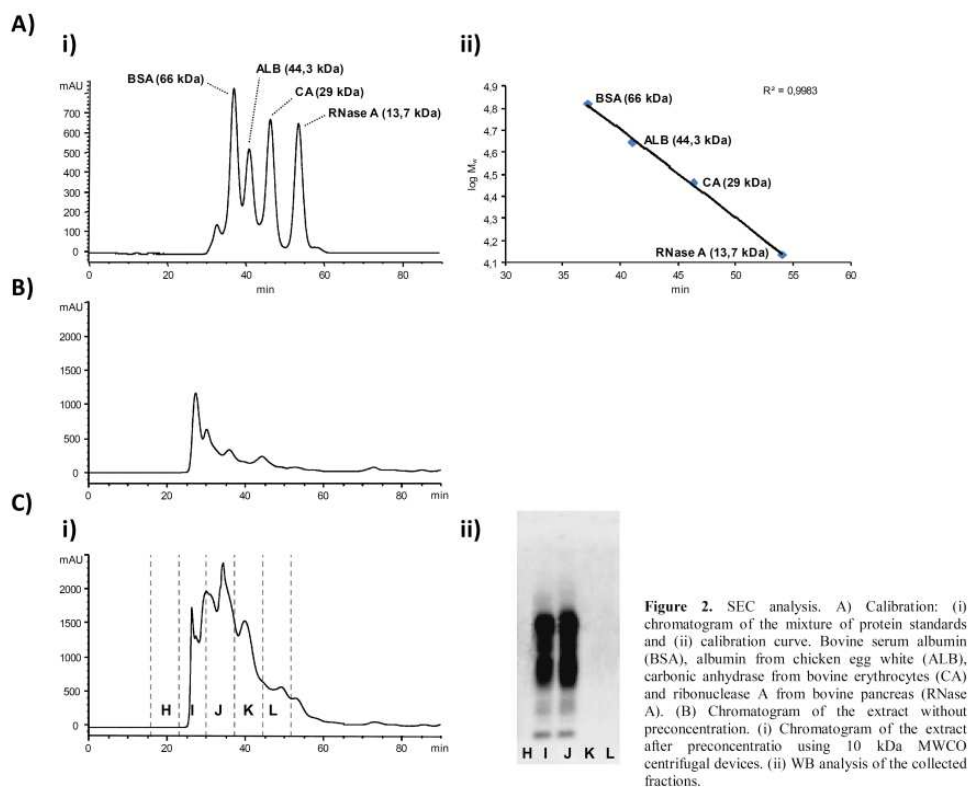


Figure 2. SEC analysis. A) Calibration: (i) chromatogram of the mixture of protein standards and (ii) calibration curve. Bovine serum albumin (BSA), albumin from chicken egg white (ALB), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA) and ribonuclease A from bovine pancreas (RNase A). (B) Chromatogram of the extract without preconcentration. (i) Chromatogram of the extract after preconcentration using 10 kDa MWCO centrifugal devices. (ii) WB analysis of the collected fractions.

IMAC

IMAC can be operated with different metallic ions such as Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} [2-3, 12, 36]. Metal election depends on the type of the application as well as the target protein. PrP^C binds Cu^{2+} under physiological conditions through the PHGGGWGQ peptide octarepeats contained in the 60-91 residues region [8, 13, 37-40]. PrP^C can bind other metals although the affinity to Cu^{2+} is the highest one [37], hence Cu^{2+} -IMAC has been extensively preferred for purification [2, 3, 7, 12, 20]. In general, Cu^{2+} -IMAC is applied after some preliminary steps of fractionation, such as those presented in this paper (SEC or diafiltration), because a higher separation selectivity and reproducibility is expected.

Figure 3.i shows the chromatogram corresponding to a SEC extract concentrated with 10 kDa MWCO filter and a blank acquired in the same conditions using 1 mL IMAC columns. As it can be observed, at the beginning of the chromatogram (fraction I1-1) were detected non-retained components of the extract that were eliminated during the loading or washing steps. Retained proteins, which were supposed to have affinity to Cu^{2+} , were eluted at around 20 min. as an intense sharp peak in the front of the large wide band due to the increase of imidazole concentration (fraction I1-3). As can be observed in Figure 3.ii, WB analysis of the different fractions revealed that concentration of PrP^C was extremely high in fraction I1-1 and extremely low in fraction I1-3. This

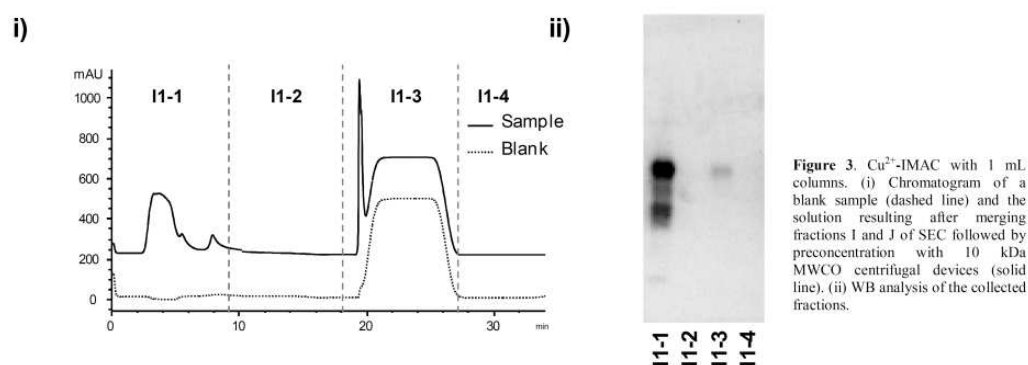


Figure 3. Cu^{2+} -IMAC with 1 mL columns. (i) Chromatogram of a blank sample (dashed line) and the solution resulting after merging fractions I and J of SEC followed by preconcentration with 10 kDa MWCO centrifugal devices (solid line). (ii) WB analysis of the collected fractions.

suggested that most of the PrP^C was not retained, probably because of the limited loading capacity of the 1 mL IMAC columns, which would be rapidly overloaded with the extract. Furthermore, we could not discard that other proteins from the complex concentrated extract could interfere in PrP^C retention. These were the reasons why we decided to evaluate larger IMAC columns (20 mL). In order to take into account our previous observations with SEC and diafiltration, we compared results for an extract purified by SEC followed by diafiltration (100 kDa MWCO) and those obtained for another subjected only to diafiltration (100 kDa MWCO).

Figure 4-a shows the IMAC chromatogram (i) and the WB analysis (ii) corresponding to purification of the SEC fractions I and J (Figure 2-c) merged and concentrated by diafiltration. In accordance to the WB, the electropherogram (Figure 4-a.i) showed that PrP^C was predominantly detected in fractions I20-7 and to a less extent in I20-8, which corresponded to elution. Therefore, PrP^C was efficiently recovered and separated from the rest of proteins, which were eliminated during the loading and washing steps as can be observed in the first part of the chromatogram. However, loading capacity of 20 mL IMAC columns was not enough to recover the PrP^C from the extracts when they were subjected only to diafiltration. Figure 4-b shows the IMAC chromatogram (i) and the WB analysis (ii) corresponding to purification of the retentates obtained after a single-step diafiltration.

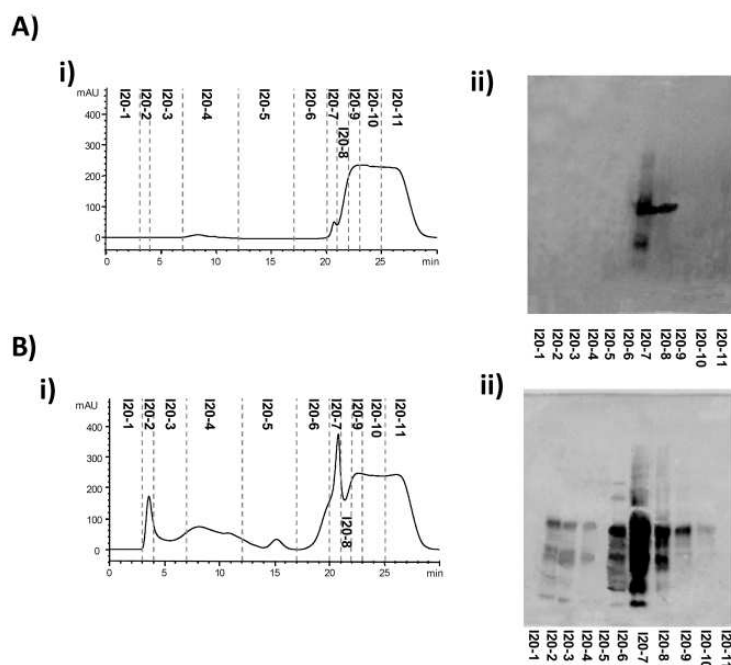


Figure 4. Cu²⁺-IMAC with 20 mL columns. (A) (i) Chromatogram of the solution resulting after merging fractions I and J of SEC followed by preconcentration with 10 kDa MWCO centrifugal devices and (ii) WB analysis of the collected fractions. (B) (i) Chromatogram of the retentate obtained after a single step preconcentration with 100 kDa MWCO centrifugal devices and (ii) WB analysis of the collected fractions.

As can be observed, now the peak corresponding to PrP^C was more intense in I20-7 fraction (around six times), but PrP^C was also significantly detected immediately before and after, in fractions I20-6 and I20-8 (lanes I20-6 and I20-8). This elution pattern could be due to column overloading. Another fact pointing to column overloading with PrP^C and other sample components was the presence of intense chromatographic peaks in fractions I20-2, I20-3, I20-

4 and I20-5 and detection of small amounts of PrP^C by WB in fractions I20-2, I20-3 and I20-4 (lanes B I20-2, I20-3 and I20-4, respectively). Extraction efficiency could be improved to achieve higher recoveries applying diluted diafiltration retentates in the IMAC columns, but at the cost of increasing the whole time for purification. In contrast, SEC purification followed by diafiltration was a longer procedure that results in dilution. I and J fractions could be further concentrated by diafiltration to avoid excessive time, reagent and solvent consumption. Using the single-step diafiltration procedure before IMAC and taking into account that the detection limit of WB is in general around 0.1 ng · μL⁻¹ of protein [41], we estimated that 0.26 μg of PrP^C could be purified from 40 g of brain tissue. This recovery is similar to the values reported with other methods that are longer, more complex or require immunoaffinity-based purification steps [2,7,12].

CONCLUSION

We have developed an efficient extraction and purification procedure of PrP^C from healthy bovine brain using conventional, non-immunoaffinity methods and western blot (WB) analysis to detect the presence of PrP^C. Once obtained the PrP^C extracts, diafiltration with 100 kDa MWCO centrifugal devices followed by semipreparative Cu²⁺-IMAC was the fastest procedure to purify PrP^C with the largest recoveries. The use of SEC, before diafiltration and

Cu²⁺-IMAC was time consuming and unnecessarily extended the purification procedure. As PrP^C tended to form oligomers with MW higher than 100 kDa, which was much over the upper limit of the SEC column dynamic range, it was more useful to use a single-step diafiltration with 100 kDa MWCO membranes. In order to achieve the best recoveries Cu²⁺-IMAC it is important to arrive to a compromise between the whole purification time and protein

concentration in the loaded samples to avoid column overloading. The procedure described in this paper could be scale-up at a reasonable cost.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU). M. Borges-Alvarez acknowledges the Spanish Ministry of Education and Science for a FPU (Formación del Profesorado Universitario) fellowship. The authors thank the Solution Equilibria and Chemometrics group from the University of Barcelona for allowing use of the. Rotanta 460 centrifuge (Hettich Zentrifugen). The authors also acknowledges to Dr. V. Casadó for his unvaluable support in the development of the extraction procedure.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Prusiner S. B. *Science*, 1997, **278**, 245-251.
- [2] Hornemann S., Schorn C., Wüthrich K., *EMBO Rep.*, 2004, **5**, 1159-1164.
- [3] Müller H., Strom A., Hunsmann G., Stuke A. W. *Biochem. J.*, 2005, **388**, 371-378.
- [4] Somerville R. A. *J. Gen. Virol.*, 1999, **80**, 1865-1872.
- [5] MacGregor I. *Transfus. Med.*, 2001, **11**, 3-14.
- [6] Tsirolunikov K., Rezaei H., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Grosclaude J., Haertlé T. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006, **1764**, 1218-1226.
- [7] Jones M., Head M. W., Connolly J. G., Farquhar C. F., Hornsey V. S., Pepper D. S., MacGregor I. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **335**, 48-56.
- [8] Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Dunham C. M., Lario P., Avdievich N. I., Antholine W. E., Olmstead M. M., Vrieling A., Gerfen G. J., Peisach J., Scott W. G., Millhauser G. L. *Biochemistry*, 2002, **41**, 3991-4001.
- [9] Prusiner S. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 13363-13383.
- [10] Meyer R. K., Lustig A., Oesch B., Fatzer R., Zurbriggen A., Vandevelde M. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 38081-38087.
- [11] Jones S., Batchelor M., Bhelt D., Clarke A. R., Collinge J., Jackson G.S. *Biochem. J.*, 2005, **392**, 309-312.
- [12] Pan K. M., Stahl N., Prusiner S. B. *Protein Sci.*, 1992, **1**, 1343-1352.
- [13] Kramer M. L., Kratzin H. D., Schmidt B., Römer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S., Kretzschmar H. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 16711-16719.
- [14] Peralta O. A., Eyestone W. H., *Prion*, 2009, **3**, 161-170.
- [15] Wang C., Geng X., Wang D., Tian B. *J. Chromatogr. B*, 2004, **806**, 185-190.
- [16] Yin S. M., Zheng Y., Tien P. *Protein Expr. Purif.*, 2003 **32**, 104-109.
- [17] Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Legname G., Prusiner S. B., Antholine W. E. Gerfen G. J., Peisach J., Millhauser G. L. *Biochemistry*, 2003, **42**, 6794-6803.
- [18] Biasini E., Medrano A. Z., Thellung S., Chiesa R., Harris D. A. *J. Neurochem.*, 2008, **104**, 1293-1308.
- [19] Orem N. R., Geoghegan J. C., Deleault N. R., Kacsak R., Supattapone S. *J. Neurochem.*, 2006, **96**, 1409-1415.
- [20] Pergami P., Jaffe H., Safar J. *Anal. Biochem.*, 1996, **236**, 63-73.
- [21] Wei X., Herbst A., Ma D., Aiken J., Li L. *J. Proteome Res.*, 2011, **10**, 2687-2702.
- [22] Pergami P., Bramanti E., Ascoli G. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, **264**, 972-978.
- [23] Sakudo A., Lee D. C., Li S., Nakamura T., Matsumoto Y., Saeki K., Itohara S., Ikuta K., Onodera T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **328**, 14-19.
- [24] Biasini E., Seegulam M. E., Patti B. N., Solforosi L., Medrano A. Z., Christensen H. M., Senatore A., Chiesa R., Williamson R. A., Harris D. A. *J. Neurochem.*, 2008, **105**, 2190-2204.
- [25] Yamazaki Y., Takao T. *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 8246-8252.
- [26] Borges-Alvarez M., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 1411-1418.
- [27] Kushnrirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D. *Methods*, 2006, **39**, 50-55.
- [28] Barnard G., Helmick B., Madden S., Gilbourne C., Patel R. *Luminescence*, 2000, **15**, 357-362.
- [29] Hjelmeland L. M., Chrambach A. *Methods Enzymol*, 1984, **104**, 305-318.
- [30] McCaslin D. R. *Encycl. Biol. Chem.*, 2004, **1**, 577-581.
- [31] Le Maire M., Champeil P., Moller J. V. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 2000, **1508**, 86-111.
- [32] Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T. W., Carpenter J. F. *Pharm. Res.*, 2003, **20**, 1325-1336.
- [33] Chang L. L., Shepherd D., Sun J., Ouellette D., Grant K. L., Tang X. C., Pikal M. J. *J Pharm Sci.*, 2005, **94**, 1427-1444.
- [34] Yokoyama T., Mohri S. *Curr. Med. Chem.*, 2008, **15**, 912-916.
- [35] Legleiter L. R., Ahola J. K., Engle T. E., Spears J. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **352**, 884-888.
- [36] Vançan S., Miranda E. A., Bueno S. M. A. *Process Biochem.*, 2002, **37**, 573-579.
- [37] Walter E. D., Stevens D. J., Visconte M. P., Millhauser G. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15440-15441.
- [38] Brown D. R., Qin K., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P. E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., Kretzschmar H. *Nature*, 1997, **390**, 684-687.
- [39] Whittal R. M., Ball H. L., Cohen F. E., Burlingame A. L., Prusiner S. B., Baldwin M. A. *Protein Sci.*, 2000, **9**, 332-343.
- [40] Morante S., González-Iglesias R., Potrich C., Meneghini C., Meyer-Klaucke W., Menestrina G., Gasset M. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 11753-11759.
- [41] Wenz B., Oesch B., Horst M. *Biomaterials.*, 2001, **22**, 1599-1606.

CAPÍTOL 3. ANÀLISI DE SOD-1 PER MALDI-TOF-MS, CE-UV I CE-IT-MS

La SOD-1 és un metal·loenzim homodimèric amb Cu i Zn que com el PrP^C, es relaciona amb una malaltia neurodegenerativa caracteritzada per la formació d'agregats proteics, l'ALS, presenta afinitat pel Cu i una activitat enzimàtica del mateix tipus.

En aquest treball s'ha posat a punt una metodologia analítica per a la separació i caracterització de SOD-1, emprant MALDI-TOF-MS, CE-UV i CE-IT-MS. S'ha utilitzat SOD-1 bovina que, a diferència de la SOD-1 humana o el PrP^C boví, es troba disponible comercialment. Aquestes metodologies, constitueixen el punt de partida per abordar posteriorment l'anàlisi de la SOD-1 en mostres de sang humana. Com veurem en el pròxim capítol d'aquesta tesi, a diferència del PrP^C boví, la SOD-1 humana es pot obtenir de manera relativament senzilla i en quantitats elevades purificant-la adequadament a partir dels eritròcits de la sang.

A la bibliografia existeixen diversos mètodes d'anàlisi de SOD-1, però gairebé tots detecten només el monòmer desmetal·lat, ja que utilitzen unes condicions que provoquen la pèrdua del metall i la destrucció de l'estructura homodimèrica. Un dels grans objectius d'aquesta tesi ha estat l'establiment de metodologies analítiques que permetessin preservar l'estructura nativa d'aquest biomarcador proteic, tant des del punt de vista de les PTMs com des del punt de vista de l'estructura dimèrica. En aquest sentit, com ja s'ha apuntat a la introducció, alguns autors han relacionat la monomerització i les PTMs de la SOD-1 humana amb els processos d'oligomerització que precedeixen a la formació dels agregats característics de certes malalties neurodegeneratives.

El treball realitzat ha conduït a la següent publicació:

- Capillary electrophoresis/mass spectrometry for the separation and characterization of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase. **Borges-Alvarez M., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.**, Rapid Commun Mass Spectrom., 24 (2010) 1411-1418.

Article 3.1.

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010; **24**: 1411–1418

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/rcm.4530



Capillary electrophoresis/mass spectrometry for the separation and characterization of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase

Marta Borges-Alvarez, Fernando Benavente, José Barbosa and Victoria Sanz-Nebot*

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

Received 21 October 2009; Revised 22 February 2010; Accepted 1 March 2010

The native form of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD-1) is a homodimer that coordinates one Cu^{2+} and one Zn^{2+} per monomer. Cu^{2+} and Zn^{2+} ions play crucial roles in enzyme activity and structural stability, respectively. In addition, dimer formation is essential for SOD-1 functionality, and in humans several SOD-1 mutant isoforms have been associated with certain types of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a progressive neurodegenerative disorder. In this paper we used capillary electrophoresis and mass spectrometry to study the different structures of bovine SOD-1. The metal ions of the native enzyme (Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1) were released in acidic medium in order to obtain apo-SOD-1, which is a monomer. Both substances were analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and capillary electrophoresis with ultraviolet and electrospray ionization mass spectrometry detection (CE/UV and CE/ESI-MS, respectively). With MALDI-TOF-MS, using matrices of sinapinic acid (SA) or 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) with or without trifluoroacetic acid (TFA), similar mass spectra were obtained for the metalated and non-metalated samples. In both cases, an average molecular mass corresponding to the apo-monomer SOD-1 was calculated. This finding indicated that the metals were released from the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 during sample preparation or ionization. For CE/UV and CE/ESI-MS, two background electrolytes (BGEs) potentially compatible with ESI-MS detection were used, namely 1 M of acetic acid (pH 2.3) and 10 mM of ammonium acetate (pH 7.3). Using a sheath liquid of 2-propanol/water (60:40 v/v), with or without 0.1% v/v of formic acid, CE/ESI-MS sensitivity was enhanced when the acidic BGE and the acidic sheath liquid were used. However, the electrophoretic profiles and the mass spectra obtained suggested that the metals of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 were released, which generated the apo-monomer during the electrophoretic separation. The neutral BGE provided enhanced conditions for the detection of the native enzyme. The differences between the mass spectra obtained for the Cu_2Zn_2 -dimer and the apo-monomer forms were significant and the presence of formic acid in the sheath liquid affected only sensitivity. Our results highlight the importance of selecting appropriate non-denaturing separation and detection conditions to obtain reliable structural information about non-covalent protein complexes by CE/ESI-MS. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD-1) catalyzes the conversion of superoxide anion to produce oxygen and hydrogen peroxide, thereby protecting cells from oxidative stress.^{1,2} The native enzyme is a homodimer that coordinates one copper and one zinc ion per monomer (Cu_2Zn_2 -dimer), while glycation *in vivo* is negligible.^{3–5} Cu^{2+} and Zn^{2+} ions play crucial roles in enzyme activity and structural stability, respectively. In addition, dimer formation is essential for SOD-1 function. Comparison of the structural features of various species shows that this enzyme has been highly conserved during evolution, which may explain both its high stability and catalytic efficiency.⁴

*Correspondence to: V. Sanz-Nebot, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: vsanz@ub.edu

The polymorphism associated with amino acid changes in SOD-1, resulting from gain-of-function mutations, is related to familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS) and sporadic ALS.^{5,11,12} These progressive neurodegenerative disorders, which affect motor neurons, may be caused by aggregation of the enzyme, which could be triggered by misfolding, monomerization or oligomerization of the SOD-1 mutant isoforms.^{8–12}

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS) have been used in clinical diagnosis for the detection and identification of protein isoforms and abnormally increased modified proteins, such as hemoglobin, transthyretin, SOD-1 or transferrin.^{5,10–15} Under certain conditions (low pH,

Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

1412 M. Borges-Alvarez *et al.*

oxidation, treatment with chelating or chaotropic agents, . . .), the metal ions of SOD-1 are released in part or totally from the amino acidic structure, thereby leading to the metal-deficient dimer forms, the apo-dimer forms or the completely dissociated apo-monomer forms of the enzyme.^{6–12} In general, the experiments were performed under such denaturing conditions because the main interest was to obtain average molecular mass values to differentiate between the isoforms detected. Sato *et al.* reported a simple method based on immunoprecipitation followed by reversed-phase LC/ESI-MS to detect several SOD-1 isoforms in human erythrocytes.^{5,11,12} Reduction of the protein disulfide bonds with dithiothreitol was required before separating SOD-1 from the antibody using a linear gradient with hydro-organic mobile phases containing a high content of acetonitrile (>28% v/v) and acetic acid (2% v/v).^{5,11,12} Under these experimental conditions, the native enzyme dissociated into monomers; however, the mass spectra of these forms allowed the differentiation of SOD-1 mutant isoforms from patients with fALS. Similarly, but to a lesser extent, capillary electrophoresis (CE) has been used in the clinical diagnosis of protein-related disorders. However, CE is the technique of choice for the separation and characterization of protein glycoforms.^{16–19} The separation and characterization of alpha-1-acid glycoprotein, fetuin and erythropoietin have recently been described using background electrolytes of 1M of acetic acid in water or in methanol/water (20:80 v/v).^{18,19} In general, for optimum detection sensitivity by CE/ESI-MS using sheath-flow interfaces in the positive ion mode, acidic BGEs and sheath liquids are preferred.^{16–19} However, these conditions may disrupt protein conformation or the weak forces holding non-covalent complexes, oligomers or aggregates together.^{20–23} A number of techniques have been used to monitor these protein states (e.g. ESI-MS, size-exclusion chromatography (SEC) and CE/UV^{20–27}). CE/UV under non-denaturing conditions is considered a good analytical alternative because it minimizes the disruption of non-covalent association.^{22–24} However, little attention has been paid to the application of CE/ESI-MS under non-denaturing conditions to study misfolding, non-covalent complexation, oligomerization and aggregation of intact proteins in their native states in solution.^{25–27}

Here we evaluated MALDI-TOF-MS, CE/UV and CE/ESI-MS for the separation and characterization of bovine SOD-1. Special attention is given to the use of non-denaturing conditions in CE/ESI-MS for the detection of the native form of the enzyme.

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

All chemicals used in the preparation of buffers and solutions were of analytical reagent grade. Acetonitrile (MeCN), acetone, formic acid (FA), acetic acid (HAc) (glacial), trifluoroacetic acid (TFA), hydrochloric acid (25%) (HCl), sodium hydroxide (NaOH), potassium chloride (KCl), ammonia (25%) (NH₃), ethanol (EtOH) and 2-propanol (iPrOH) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). 3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapic

or sinapinic acid, SA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) and ammonium acetate (NH₄Ac) were purchased from Fluka (Madrid, Spain). Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] was purchased from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). SOD-1 from bovine erythrocytes was supplied by Fluka (Madrid, Spain). Bovine serum albumin (BSA, 99%) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Water with a conductivity value lower than 0.05 μS/cm was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

Protein solutions

The average molecular mass of commercial SOD-1 from bovine erythrocytes (Cu₂Zn₂-dimer SOD-1, M = 31432.5 Da) was calculated as [apo-SOD-1 (M = 15591.3 Da, taking into account the amino acid sequence and an acetyl group^{3,7}) + 2Zn²⁺ + 2Cu²⁺ – 8H⁺] where masses of Cu²⁺, Zn²⁺ and H⁺ were 63.5, 65.4 and 1 Da, respectively.⁷ Cu²⁺ and Zn²⁺ were removed by acidification with TFA and diafiltration. A volume of 500 μL of a 2000 mg·L⁻¹ solution of Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 was acidified with TFA (final concentration was 0.1% v/v). The acidic samples were desalted using Microcon YM-10 centrifugal devices (MWCO 10000 Da) (Millipore, Beverly, MA, USA).⁶ The filter membrane was initially washed with 500 μL of Milli-Q water for 10 min at 12000 rpm. Then 500 μL of the acidified sample were centrifuged for 10 min under the same force. The residue was washed four times, for 10 min in the same way, with 500 μL of Milli-Q water and the filtrates were discarded. The residue was recovered from the sample reservoir by centrifugation upside down into a new vial (2 min at 1000 rpm). Finally, sufficient Milli-Q water was added to adjust the apo-SOD-1 concentration to 2000 mg·L⁻¹. The solution of the native enzyme Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 was obtained by diafiltrating a 2000 mg·L⁻¹ solution of the commercial sample using the same procedure but without the addition of TFA. Both SOD-1 samples were analyzed by Cu²⁺-immobilized metal affinity chromatography (Cu²⁺-IMAC), MALDI-TOF-MS, CE/UV and CE/ESI-MS. A 1000 mg·L⁻¹ BSA solution was prepared for MALDI-TOF-MS calibration.

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

IMAC was performed with a 1 mL HiTrap HP cartridge (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using a HP 1100 series liquid chromatograph with a diode-array detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).²⁸ Instrument control, data acquisition and data processing were performed using the Chemstation LC3D software (Agilent Technologies).

All the experiments were performed at a flow rate of 1 mL·min⁻¹, unless otherwise indicated. As the stationary phase of the cartridge was supplied without bound metal ions, it was necessary to load it first. The cartridge was first washed with 10 mL of water to remove the storage buffer (EtOH/water, 20:80 v/v), then with 5 mL of binding buffer (20 mM Tris, 0.5 M KCl, 1 mM imidazole, pH 7.5) followed by 5 mL of a Cu²⁺ solution (0.1 M CuSO₄). The cartridge was then ready for sample injection after a rinse with 5 mL of binding buffer to remove excess Cu²⁺. A blank injecting

RCM

500 μL of binding buffer was necessary before sample analysis.

Volumes of 500 μL of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 or apo-SOD-1 samples were injected onto the cartridge and the UV signal was acquired at 280 nm. Non-retained compounds were washed for 14 min with binding buffer at a flow rate of $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The flow rate of the binding buffer was changed to $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ in 2 min. The proteins retained were eluted from the cartridge with 5 mL of elution buffer (20 mM Tris, 0.5 M KCl, 0.5 M imidazole, pH 7.5). Finally, the cartridge was re-equilibrated with 10 mL of binding buffer. The cartridge was regenerated after five uses by rinsing with 10 mL of EDTA solution (0.5 M KCl, 50 mM EDTA) to strip the Cu^{2+} ions. At this point, the column was prepared to be loaded with Cu^{2+} or to be washed with 5 mL of water and 5 mL of storage buffer. As expected, only apo-SOD-1 samples were retained and eluted as a sharp peak because the native enzyme was already fully metalated.

pH measurements were performed throughout the experiments with a model 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA).

MALDI-TOF-MS

The MALDI-TOF mass spectra were obtained using a Voyager-RP-DE system (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a nitrogen laser (337 nm). Laser energies were slightly higher than the threshold values (60% and 75% of the maximum were selected for SA and DHB experiments, respectively). The acceleration voltage was set at 25 kV. The voltage on the first grid was 90% of the total acceleration voltage, and the delay time between ion production and extraction was 300 ns. The guide wire voltage was set at 0.1%. Spectra were externally calibrated using the singly and doubly charged ions from BSA. The spectra shown were acquired using the linear positive mode and represent summation of 100 consecutive laser shots.²⁹

SA matrix was prepared daily at $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in MeCN/ H_2O (50:50 v/v) with or without the addition of 0.1% v/v of TFA. DHB matrix was prepared like the SA matrix but the organic solvent used in this case was ethanol. We also prepared a $27\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MALDI matrix solution of SA in acetone/water (99:1 v/v) when the fast evaporation method was to be used as crystallization procedure (see below).

The sample-matrix solutions were prepared by mixing 1 μL of protein sample solution and 1 μL of the $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ matrix solution. Each mixture was vortexed and centrifuged in order to obtain homogeneous samples, which improved the reproducibility of the results. All the crystallization procedures were performed in a thermostatted room at 20°C . The sample-matrix crystals were obtained by the dried-droplet method for DHB or the fast evaporation method for SA. In the former, the sample-matrix solution (1 μL) was deposited onto the stainless steel MALDI target plate and allowed to evaporate to dryness in air. In the latter, 1 μL of the $27\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SA matrix solution was first deposited onto the target plate and allowed to evaporate to dryness in air. Then, 1 μL of sample-matrix solution was deposited over this first layer and air-dried again. Data calibration and data

Characterization of bovine SOD-1 by CE/MS 1413

processing were performed using Data Explorer software (Perseptive Biosystems).

CE/UV

CE/UV experiments were performed in an HP^{3D}CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) with a diode-array detector. A $50\text{ cm}\times 50\text{ }\mu\text{m}$ i.d. fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) was inserted into a CE/UV capillary cartridge and thermostatted to 25°C .

All capillary rinses were performed at 930 mbar. A new capillary was set every time the BGE was changed. New capillaries were activated by flushing for 10 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 10 min with water and 5 min with the BGE. Finally, a 15 kV voltage was applied for 5 min. The capillary was rinsed for 1 min with 1 M NaOH, 1 min with water and finally 1 min with BGE between runs. Samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s (approx. 15 nL using the Hagen–Poiseuille equation³⁰) and separation was conducted under normal polarity, applying a voltage of 15 kV (current intensity (I) was lower than 10 μA in both cases). The UV window was placed at 41.5 cm from the inlet of the capillary and detection was made at 200 nm. The BGEs 10 mM Tris (pH 7.3, adjusted with HCl), 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3) were evaluated for CE/UV analysis. They were passed through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nylon filter (MSI). The capillary was stored overnight filled with working buffer electrolyte. Instrument control, data acquisition and data processing were performed using the Chemstation HP^{3D}CE software (Agilent Technologies).

Effective electrophoretic mobility (m_e) values were calculated as the difference between their apparent mobility (m_{app}) and the mobility of the EOF (m_{EOF}) given by the negative dip observed when the water contained in the sample reached the detector:³⁰

$$m_e = m_{\text{app}} - m_{\text{EOF}} = L_C L_D / V(1/t_{\text{app}} - 1/t_{\text{EOF}})$$

where L_D is the distance from the injection point to the detector, L_C is the capillary length, and t_{app} and t_{EOF} are the migration times of the glycoform and the EOF, respectively. Mobility is expressed in Tiselius units: 1 TU corresponds to $10^{-9}\text{ m}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$.

CE/ESI-MS

All CE/ESI-MS experiments were performed in a HP^{3D}CE system (Agilent technologies) coupled to a MSD ion trap (IT) mass spectrometer with a G1603A sheath-flow CE/ESI-MS interface (Agilent Technologies).³¹ A $50\text{ cm}\times 50\text{ }\mu\text{m}$ i.d. fused-silica capillary (Polymicro Technologies) was inserted into CE/MS capillary cartridge and thermostatted to 25°C .

All capillary rinses were performed at 930 mbar. A new capillary was set every time the BGE was changed. BGEs 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3) were evaluated for CE/ESI-MS analysis. They were passed through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nylon filter (MSI) before use. New capillaries were flushed for 20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 15 min with water and 10 min with BGE. The system was finally equilibrated by applying the separation voltage for 15 min. Between workdays, the capillary was

1414 M. Borges-Alvarez *et al.*

conditioned by rinsing with aqueous 0.1 NaOH (5 min), water (10 min) and BGE (5 min). Both activation and conditioning procedures were performed off-line in order to prevent NaOH from entering the MS system. Samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s and separation voltage was 15 kV (normal polarity) (I was lower than $10 \mu\text{A}$ in both cases). Between runs the capillary was rinsed for 2 min with 1 M HAC, 1 min with water and 1 min with BGE. The capillary was stored overnight filled with working BGE and for longer periods of time it was rinsed with water for 10 min and dried with air for 5 min to prevent salt crystallization.

The sheath liquid solutions consisted of iPrOH/water (60:40 v/v) with or without 0.5% v/v of FA. The solutions were degassed by sonication (10 min) before being delivered by a 100 Series infusion pump (KD Scientific, Holliston, MA) at a flow rate of $0.2 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. The parameters of the mass spectrometer were fine-tuned in a previous study using transferrin.³¹ All experiments were performed in positive mode. The ESI voltage and the end-plate offset were set at 4000 and -500 V , respectively. Voltages on capillary exit and skimmer were 260 and 30 V, respectively. Octopole voltages were set at 3 and 2.5 V and octopole radio frequency at 225 Vpp. Lens voltages were -2.8 and -80 V and the trap drive value 95 (arbitrary units). Nebulizer gas (N_2) pressure was 7 psi, drying gas (N_2) flow rate $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ and drying

temperature 300°C . No effect was observed between the ESI voltage, the end plate offset and the drying gas temperature on artificial dimer dissociation. Instrument control, data acquisition and data processing were performed using the CE/MSD Trap Software (Agilent Technologies). ESI mass spectra were deconvoluted to obtain molecular mass values using MaxEnt1 (Micromass, Manchester, UK), which uses an algorithm based on the method of maximum entropy to find the simplest zero charge molecular mass spectrum that could account for the observed m/z data.³²

RESULTS AND DISCUSSION

MALDI-TOF-MS

In order to obtain complementary information, the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples were analyzed by MALDI-TOF-MS using different sample preparation procedures. The best results in terms of reproducibility and signal-to-noise (S/N) ratio were achieved using SA acidified with TFA and the fast evaporation method as sample-matrix crystallization procedure. The threshold laser intensity required for mass spectra generation with DHB was slightly higher than with SA, 75% vs. 60%, respectively. Figures 1(a) and 1(c) show the mass spectra of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples using SA. As can be observed, both mass spectra were similar and peaks corresponding to the singly

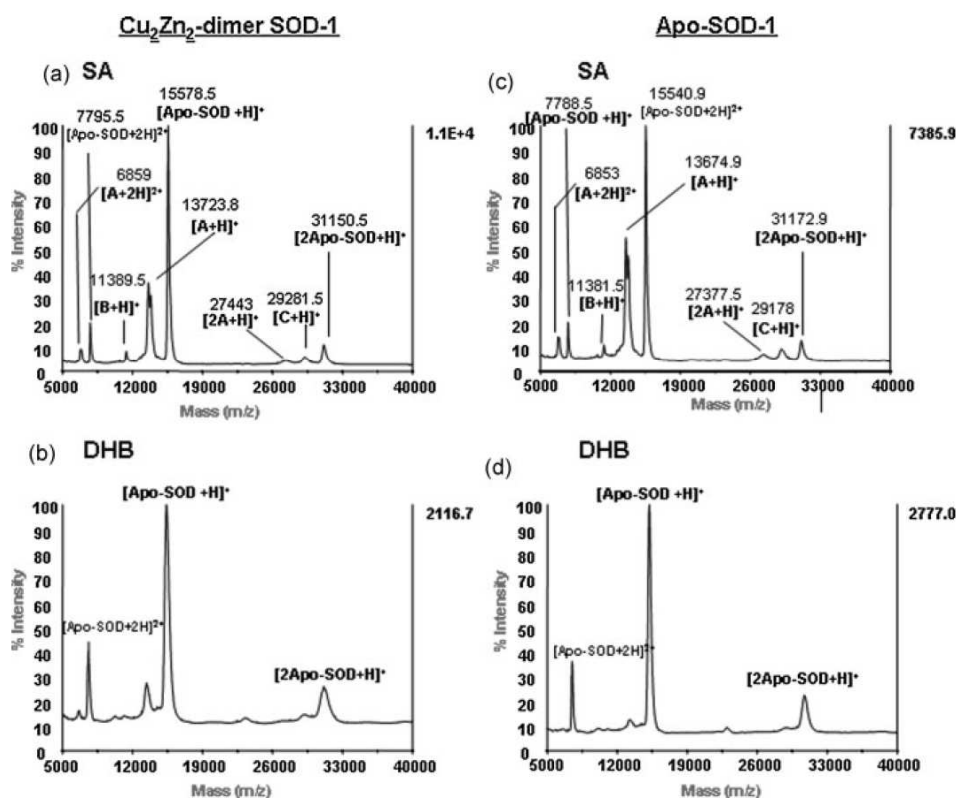


Figure 1. MALDI-TOF mass spectra of Cu_2Zn_2 -SOD-1 and apo-SOD-1 samples using SA and DHB matrices with TFA for sample preparation. The minor protein impurities are labeled as A, B and C.

RCM

and doubly charged molecular ions of the monomeric apo-SOD-1 were detected at m/z 15578/15541 and 7795/7788, respectively. Using these m/z values, the molecular masses calculated (i.e. 15583 and 15557 Da, respectively) were close to the theoretical value of the apo-SOD-1 (15591.3 Da), suggesting dimer dissociation in Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 samples. The singly charged molecular ions of the dimeric form of apo-SOD-1 (apo-dimer SOD-1) were also detected (m/z 31150 and 31173, respectively) in both mass spectra. These molecular mass values suggested the absence of metals because they were significantly different from the theoretical value of the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 (31432.5 Da). These apo-dimeric species were probably generated during desorption as we previously found with other proteins.^{17,29} In addition, several other minor peaks were detected, which may correspond to protein impurities such as fragments of SOD-1 and certain types of carbonic anhydrases (I, II or III).³ A similar conclusion was drawn from the mass spectra obtained with DHB acidified with TFA and the dried-droplet method as sample-matrix crystallization procedure (Figs. 1(b) and 1(d)). However, fewer impurities were detected because of the lower S/N ratios (compare, for example, the maximum intensities from the right y-axis of Figs. 1(a) and 1(b)). Finally, in order to eliminate the presence of TFA in the sample matrix was promoting metal depletion and dimer dissociation, the MALDI-TOF-MS samples were prepared using SA and DHB matrices without TFA. As expected, the S/N ratios were markedly low, but the singly and doubly charged molecular ions of apo-SOD-1 and the singly charged molecular ions of apo-dimer SOD-1 were still detected. The presence again of the apo-dimer SOD-1 suggested that acidification of the matrix solution with TFA was not the cause of metal release and dimer dissociation in Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 samples and reinforced the assumption of an artifact during desorption. In a previous study we demonstrated that the choice of the MALDI matrix, the sample-matrix preparation procedure and the laser intensity are crucial for the MALDI-TOF-MS analysis of molecules with labile functional groups, such as glycoproteins.²⁹ Here we confirm that even taking into account all these parameters, the MALDI-TOF-MS technique may not be suitable to obtain reliable molecular mass information of certain metalloproteins and protein-protein complexes.

CE/UV

The Cu_2Zn_2 -SOD-1 and apo-SOD-1 samples were analyzed by CE/UV. Three BGEs were examined: 1 M HAc (pH 2.3), 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3) and 10 mM Tris (pH 7.3, adjusted with HCl). The latter was used by Chiba *et al.* and Abe *et al.* to study the dissociation of the dimeric structure of the native enzyme by CE/UV in the presence or absence of metal chelates, ascorbic acid or hydrogen peroxide.^{33,34} In those studies, all the conclusions were based on the variations observed in the height of the electrophoretic peak assigned to the native enzyme. Furthermore, the experimental conditions were suitable for UV detection but not for on-line ESI-MS detection. In the present study, we evaluated 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3) for the analysis of SOD-1 samples by

Characterization of bovine SOD-1 by CE/MS 1415

CE/UV. Both BGEs had increased volatility, especially the former, which also provided an acidic pH value that proved to be optimum for detection sensitivity of proteins by CE/ESI-MS.^{18,19,31} However, the 10 mM NH_4Ac (pH 7.3) BGE was more suitable to obtain structural information under non-denaturing conditions, like the BGE of 10 mM Tris (pH 7.3). Figure 2 shows the UV electropherograms obtained for Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples in 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac (7.3). As observed, the separations using the 10 mM NH_4Ac (pH 7.3) were better than those obtained with 1 M HAc (pH 2.3) and similar to those obtained with 10 mM Tris (pH 7.3) (data not shown). Using 1 M HAc (pH 2.3), the apo-SOD-1 sample appeared as a single sharp peak (Fig. 2(b)) while the several components of the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 sample co-migrated in a broad peak (Fig. 2(a)). The BGE of 10 mM NH_4Ac (pH 7.3) allowed improved resolution and differentiation of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 forms (Figs. 2(c) and 2(d)). The tentative identification of the peaks in Figs. 2(c) and 2(d) was based on the peak intensities and the observed m_e values. At this pH value, in agreement with the isoelectric point reported for the native enzyme, i.e. $pI = 4.95$,³⁵ both SOD-1 forms carried an overall negative charge and may correspond to the most intense peaks after the neutral substances of the sample matrix, which migrated with the EOF as a peak with negative absorbance. Indeed, the electropherograms showed a group of three minor electrophoretic peaks, which may be due to the protein impurities previously detected by MALDI-TOF-MS. These minor components were labelled as I1, I2 and I3 from their m_e values in Figs. 2(c) and 2(d) (see the insets in Figs. 2(c) and 2(d)). The significant differences in m_e values of peaks assigned to Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 may be explained taking into account the charge-to-mass ratio values of both SOD-1 forms. Thus, apo-SOD-1 had half the molecular mass and half the ionizable groups of the native enzyme but no positively charged metal ions and was migrating last to the cathode. As both proteins were globally negatively charged, like the ionized silanol groups, adsorption on the capillary wall was minimized and repeatability was good, as observed from the low standard deviations of the m_e values (Figs. 2(c) and 2(d)).

CE/ESI-MS

To confirm the improved performance of 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3) for the analysis of the native enzyme, we evaluated 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac (pH 7.3) for the analysis of SOD-1 samples by CE/ESI-MS. An acidic solution of $i\text{PrOH}/\text{water}$ (60:40 v/v) with 0.5% v/v of FA was used for optimum detection sensitivity in positive ion mode. The parameters of the mass spectrometer were tuned using human transferrin, a high molecular weight glycoprotein with a low carbohydrate content (79561 Da (most abundant glycoform), 6% of glycosylation³¹) to ensure the best performance of the IT analyzer in the upper part of the scanned m/z range (1000–3000 m/z).³¹ Figure 3(a) (i) and 3(b) (i) show the base peak electropherograms (BPEs) obtained for Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples in 1 M HAc (pH 2.3). As can be observed, the electrophoretic profiles were similar to those obtained by CE/UV (Figs. 2(a) and 2(b)). The Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 sample appeared as a

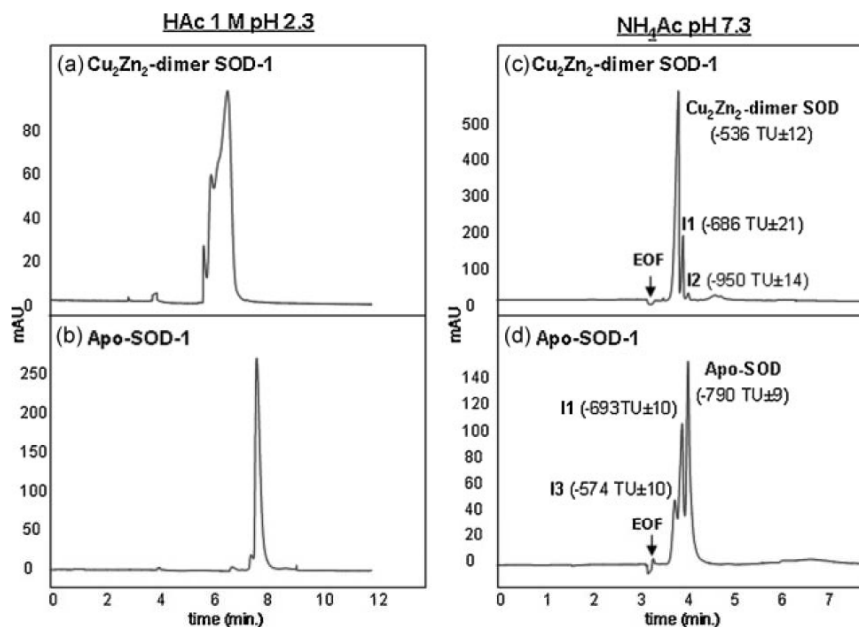


Figure 2. CE/UV electropherograms for Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples using a BGE of (a, b) 1 M HAc (pH 2.3) and (c, d) 10 mM NH_4Ac (pH 7.3, adjusted with NH_3). The effective electrophoretic mobility (m_e) values of the peaks, which appear as insets in the figure, are calculated as the mean of ten replicates (\pm standard deviation) (1 TU corresponds to $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

broad peak separated from another minor peak (Fig. 3(a) (i)) while the apo-SOD-1 sample appeared as a single sharp peak (Fig. 3(b) (i)). The m/z spectra of the detected peaks together with the molecular mass values obtained after deconvolution are shown in Figs. 3(a) (ii), 3(a) (iii) and 3(b) (ii). The minor peak detected in the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 sample (Fig. 3(a) (ii)) corresponded to the most abundant protein impurity detected previously by MALDI-TOF-MS ($M = 13870$ Da). Furthermore, the m/z spectra of the main peak of the same electropherogram (Fig. 3(a) (iii)) allowed the calculation of a molecular mass of 15601 Da, which was similar to that calculated for the apo-SOD-1 (i.e. 15602 Da, Fig. 3(b) (ii)). Both values were close to the theoretical molecular mass of the monomeric apo-SOD-1 (15591.3), thereby indicating that the native enzyme was denaturated when 1 M HAc (pH 2.3) was used for the electrophoretic separation. In contrast to the findings of other authors in chicken and human SOD-1, we did not detect isoforms of bovine SOD-1 with additional cysteine residues or forming adducts with glutathione.^{4,11,12} Figures 3(c) (i) and 3(d) (i) show the BPEs obtained for Cu_2Zn_2 -SOD-1 and apo-SOD-1 samples in 10 mM NH_4Ac (pH 7.3). Sensitivity and separation resolution allowed detection of only a single peak. The m/z spectra of the detected peaks together with the molecular mass values obtained after deconvolution are shown in Figs. 3(c) (ii) and 3(d) (ii). As can be observed, the appearance of both mass spectra was significantly different. The mass spectrum corresponding to the detected peak in the electropherogram of the Cu_2Zn_2 -SOD-1 sample (Fig. 3(c) (ii)) showed the ion

signals corresponding to the most abundant protein impurity detected previously by MALDI-TOF-MS ($M = 13869$ Da), together with a cluster of multiply charged ions due to the enzyme. A careful analysis of the cluster m/z values and their relative intensities indicated the presence of the Cu_2Zn -monomer SOD-1 and the Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1. The molecular mass calculated for the different enzyme forms from the mass spectra of Figs. 3(c) (ii) and 3(d) (ii) (15721, 31441 and 15600 Da, respectively) confirmed that Cu_2Zn -monomer SOD-1, Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and apo-SOD-1 were detected. In order to further confirm that the acidic sheath liquid did not contribute to enzyme denaturation, all the experiments were repeated using a sheath liquid of $i\text{PrOH}/\text{water}$ (60:40 v/v) without FA (data not shown). As expected, sensitivity decreased slightly but the mass spectra obtained using 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH_4Ac were similar to those obtained previously. This may suggest that the Cu_2Zn -monomer SOD-1 already existed in the original sample and was not an artifact of ionization. In our case, the acidity of the BGE was the main factor influencing protein denaturation in CE/ESI-MS using a sheath flow interface when the parameters of the mass spectrometer were finely tuned to prevent the disruption of such weak assemblies from solution into the gas phase of the mass spectrometer. However, other authors have demonstrated that under their measurement conditions in CIEF/ESI-MS the composition of the sheath liquid affects the dissociation of intact non-covalent protein complexes.^{25,26}

RCM

Characterization of bovine SOD-1 by CE/MS 1417

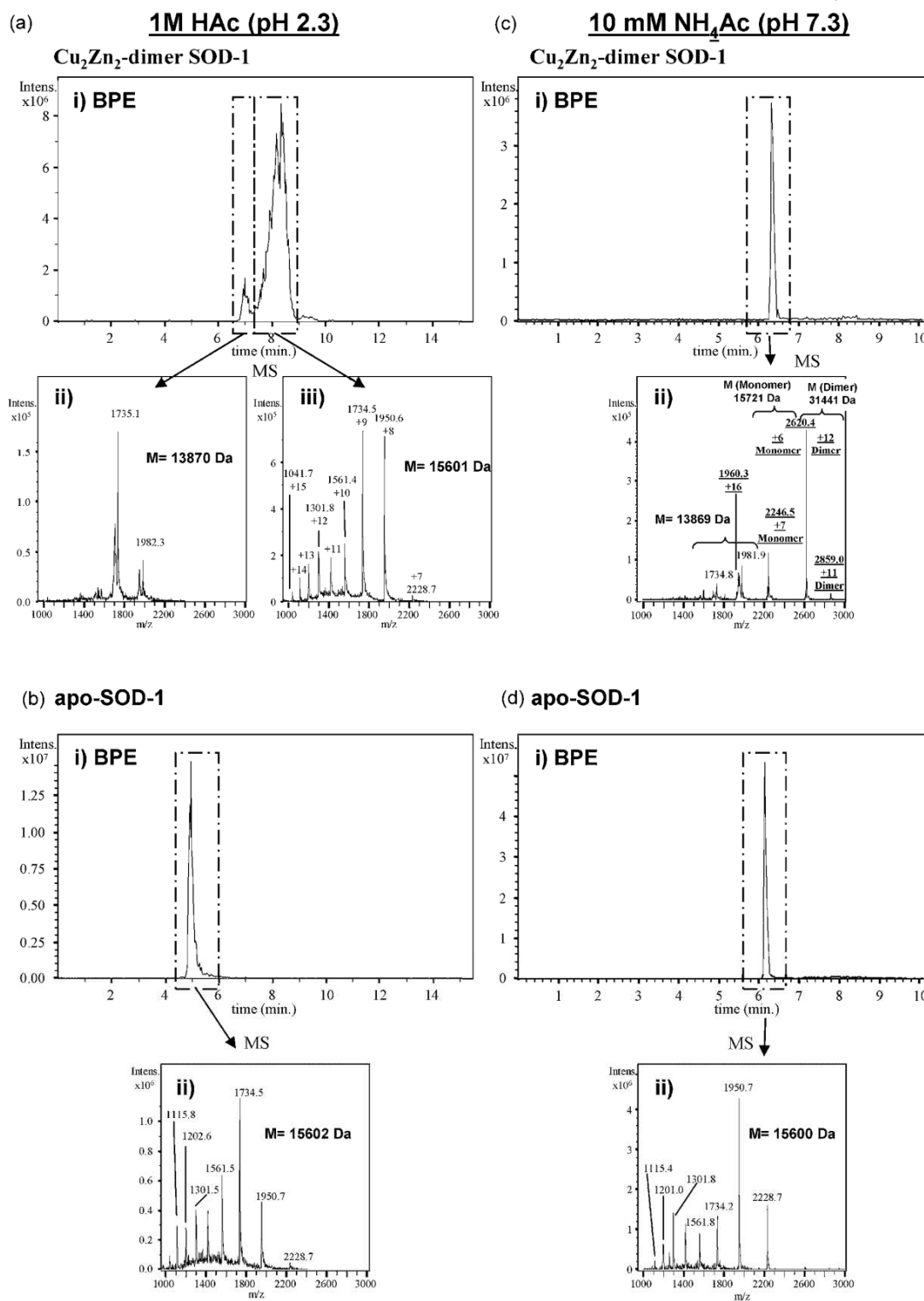


Figure 3. CE/ESI-MS BPEs for Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 and apo-SOD-1 samples using a BGE of (a, b) 1 M HAc (pH 2.3) and (c, d) 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, adjusted with NH₃). The molecular mass values obtained after deconvolution are shown in the insets of the mass spectra (i), (ii) and (iii).

1418 M. Borges-Alvarez *et al.*

CONCLUSIONS

We have demonstrated that MALDI-TOF-MS may not provide reliable molecular mass information of certain metalloproteins and protein-protein complexes in their native states, such as bovine SOD-1. In contrast, CE/UV using neutral BGEs with low ionic strength (i.e. 10 mM Tris or NH₄Ac (pH 7.3)) successfully differentiated between the dimeric fully metalated native form of the enzyme and the monomeric apo-form obtained after metal depletion. The 10 mM NH₄Ac (pH 7.3) BGE was also suitable for the detection of the native enzyme by CE/ESI-MS in positive ion mode using a sheath-liquid of iPrOH/water (60:40 v/v) with 0.5% v/v of FA. The pH of the BGE was the most determinant factor to prevent metal depletion and dissociation during the CE/ESI-MS experiments. The proposed non-denaturing CE/ESI-MS conditions may allow differentiation of fully metalated and non-reduced monomeric or dimeric human SOD-1 isoforms for diagnostic purposes using minute sample volumes as an alternative to the existing LC/ESI-MS method.^{5,11,12} Furthermore, CE/ESI-MS may be used to address the mechanism by which single amino acid changes in human SOD-1 leads to fALS or the relation with sporadic ALS. In a wider sense, it could be used to characterize the labile native forms of other metalloproteins or protein non-covalent complexes, especially multimeric proteins and protein-ligand complexes. We conclude that CE/ESI-MS under non-denaturing conditions may be a suitable technique to gain insight into the conformation, misfolding, oligomerization and aggregation of proteins in solution.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU). M. Borges-Alvarez acknowledges the Spanish Ministry of Education and Science for an FPU (Formación del Profesorado Universitario) fellowship.

REFERENCES

- Fridovich I. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 7761.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. *Crit. Rev. Biochem.* 1987; **22**: 111.
- Steinman HM, Naik VR, Abernethy JL, Hill RL. *J. Biol. Chem.* 1974; **249**: 7326.
- Schinina ME, Carlini P, Polticelli F, Zapaccosta F, Bossa F, Calabrese L. *Eur. J. Biochem.* 1996; **237**: 433.
- Saraswathi M, Nakanishi T, Shimizu A. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1426**: 483.
- Benavente F, Andón B, Giménez E, Barbosa J, Sanz-Nebot V. *Electrophoresis* 2008; **29**: 2790.
- Yanazaki Y, Takao T. *Anal. Chem.* 2008; **80**: 8246.
- Doucette PA, Whitson LJ, Cao X, Shirf V, Demeler B, Valentine JS, Hansen JC, Hart PJ. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 54558–54566.
- Rakhit R, Crow JP, Lepock JR, Kondejewski LH, Cashman NR, Chakrabartty A. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 15499.
- Banci L, Bertini I, Durazo A, Girotto S, Gralla EB, Martinelli M, Valentine JS, Vieru M, Whitelegge JP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; **104**: 11263.
- Nakanishi T, Kishikawa M, Miyazaki A, Shimizu A, Ogawa Y, Sakoda S, Ohi T, Shoji H. *J. Neurosci. Methods* 1998; **81**: 41.
- Sato T, Yamamoto Y, Nakanishi T, Fukada K, Sugai F, Zhou Z, Okuno T, Nagano S, Hirata S, Shimizu A, Sakoda S. *J. Neurol. Sci.* 2004; **218**: 79.
- Shimizu A, Nakanishi T, Kishikawa M, Miyazaki A. *J. Chromatogr. B* 2002; **776**: 15.
- Shimizu A, Nakanishi T, Miyazaki A. *Mass Spectrom. Rev.* 2006; **25**: 686.
- Sanz-Nebot V, González P, Toro I, Ribes A, Barbosa J. *J. Chromatogr. B* 2003; **798**: 1.
- Sanz-Nebot V, Balaguer E, Benavente F, Neussus C, Barbosa J. *Electrophoresis* 2007; **28**: 1949.
- Sanz-Nebot V, Benavente F, Vallverdu A, Guzmán NA, Barbosa J. *Anal. Chem.* 2003; **75**: 5220.
- Balaguer E, Demelbauer U, Sanz-Nebot V, Barbosa J, Neussus C. *Electrophoresis* 2006; **27**: 2638.
- Haselberg R, de Jong GJ, Somsen GW. *J. Chromatogr. A* 2007; **1159**: 81.
- Loo JA. *Mass Spectrom. Rev.* 1997; **16**: 1.
- Smith RD. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000; **200**: 509.
- Clodfelter DK, Nussbaum MA, Reilly J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999; **19**: 763.
- Righetti PG, Verzola B. *Electrophoresis* 2001; **22**: 2359.
- Gudiksen KL, Urbach AR, Gitlin I, Yang J, Vazquez JA, Costello CE, Whitesides GM. *Anal. Chem.* 2004; **76**: 7151.
- Jensen PK, Harrata AK, Lee CS. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 2044.
- Martinovic S, Berger SJ, Pasa-Tolic L, Smith RD. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 5356.
- Heegard NHH, Rovatti L, Nissen MH, Hamdan M. *J. Chromatogr. A* 2003; **1004**: 51.
- Paunovic I, Schulin R, Nowack B. *J. Chromatogr. A* 2005; **1100**: 176.
- Gimenez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; **21**: 2555.
- Heiger G. *High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction*. Agilent Technologies: Waldbronn, 2000.
- Gimenez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. *Electrophoresis* 2008; **29**: 2161.
- Benavente F, Andón B, Gimenez E, Olivieri AC, Barbosa J, Sanz-Nebot V. *Electrophoresis* 2008; **29**: 4355.
- Chiba Y, Sutoh Y, Nishida Y. *Z. Naturforsch.* 2006; **61c**: 273.
- Abe K, Nishida Y. *Z. Naturforsch.* 2008; **63c**: 151.
- Bannister J, Bannister W, Wood E. *Eur. J. Biochem.* 1971; **18**: 178–1186.

CAPÍTOL 4. ANÀLISI DE NEUROPEPTIDS I SOD-1 PER CE-TOF-MS

L'ús dels espectròmetres de masses amb analitzadors de trampa d'ions en CE-IT-MS ha demostrat ser una eina molt útil per a la caracterització de pèptids i proteïnes, a partir dels seus pesos moleculars o els seus espectres MS/MS característics. Els nous analitzadors de temps de vol amb acceleració ortogonal (oa-TOF) encara ofereixen millors prestacions perquè proporcionen mesures d'alta resolució i massa exacta a gran velocitat, i intervals dinàmics i d'escombratge amplis. Això permet la separació i caracterització acurada de tot tipus de substàncies amb un ampli ventall de masses moleculars i concentracions mitjançant CE-TOF-MS.

A l'actualitat no existeixen unes indicacions clares que posin de manifest els paràmetres que més influeixen en els resultats de l'anàlisi per CE-TOF-MS. Amb la finalitat de millorar aquesta situació, en els treballs que es presenten a continuació s'ha desenvolupat metodologia analítica per a la separació i caracterització de neuropèptids i SOD-1 amb CE-TOF-MS. Fent èmfasi en la influència dels paràmetres instrumentals del sistema en la resposta analítica, l'anàlisi de neuropèptids de baix pes molecular fonamenta les bases per emprendre posteriorment l'anàlisi de la SOD-1, que presenta un pes molecular molt més elevat i una estabilitat limitada, com ja s'ha apuntat al capítol anterior. En aquest últim cas, a més a més d'utilitzar patrons de SOD-1 bovina, es va posar a punt un tractament de mostra per analitzar la SOD-1 humana en mostres de sang.

Aquests estudis han donat lloc a les següents publicacions:

- Assessment of capillary electrophoresis TOF MS for a confident identification of peptides. **Borges-Alvarez M, Benavente F, Giménez E, Barbosa J, Sanz-Nebot V.** J Sep Sci. 33 (2010) 2489-2498.
- Separation and characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) from human erythrocytes by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. **Borges-Alvarez M, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V.** Electrophoresis. 33 (2012) 2561-2569.

Article 4.1.

J. Sep. Sci. 2010, 33, 2489–2498

2489

Marta Borges-Alvarez
Fernando Benavente
Estela Giménez
José Barbosa
Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical
 Chemistry, University of
 Barcelona, Barcelona, Spain

Received May 20, 2010
 Revised June 6, 2010
 Accepted June 7, 2010

Research Article

Assessment of capillary electrophoresis TOF MS for a confident identification of peptides

CE on-line coupled to orthogonal accelerated TOF-MS (CE-*oa*-TOF-MS) is an emerging technique offering efficient charge-to-mass-based separations, as well as accurate and high-resolution mass measurements. Here, we investigated the main factors influencing the analysis of low molecular mass peptides using a sheath-flow electrospray ionization interface and several neuropeptides as model compounds. Moderate fragmentor voltage values of the *oa*-TOF-MS were crucial to maximize the production of molecular ions for optimum sensitivity precluding molecular fragmentation. However, the major fragments provided specific information that may result valuable for confirmatory purposes. Advantages and disadvantages of adding internal mass references to the sheath liquid for continuous mass-to-charge recalibration during the electrophoretic separations were discussed with regard to mass accuracy and sensitivity. Furthermore, several instrumental modes related to mass resolution were also examined. Finally, the method was validated for quantitative analysis of the studied neuropeptides in terms of repeatability, linearity and LODs. The results obtained using CE-*oa*-TOF-MS were compared with those obtained using CE coupled to other mass spectrometers. In addition to the simplicity and reliability on the identification, CE-*oa*-TOF-MS allowed improved repeatability and an around 10-fold improvement in sensitivity with respect to conventional reflectron TOF and ion trap mass analyzers.

Keywords: Calibration / Exact mass / Fragmentation / Resolution / Sensitivity
 DOI 10.1002/jssc.201000361

1 Introduction

Today, CE-ESI-MS (CE-ESI-MS or CE-MS) is a well-established technique capable of high-efficient separation and molecular mass measurement of a diverse range of chemical compounds, specially polar and charged compounds [1–11]. There is a growing interest in the analysis of biomolecules (e.g. proteins, peptides, amino acids, oligonucleotides) with emphasis in proteomics or metabolomics research for biomarker discovery, natural compounds (e.g. phenolic compounds, alkaloids or biogenic amines) and applications in the toxicological, environmental, food or pharmaceutical fields [1–11]. A number of

reviews have covered the application of CE-MS over the last years using almost all mass analyzers [1–8], such as a recent paper focused on TOF analyzers [7]. Modern orthogonal-acceleration reflectron TOF (*oa*-TOF) mass spectrometers are regarded as an excellent alternative for CE-MS because of providing high-resolution and mass accuracy at a reasonable cost, as well as reduced bench space, user-friendly operation, high acquisition rates and potentially unlimited mass acquisition ranges in a single run [7, 12–14]. Only Fourier transform ion cyclotron resonance, orbitrap and magnetic sector instruments provide better resolution and have the potential to give better mass accuracy, but without the complete set of desirable characteristics [12–14]. In addition, hybrid *oa*-TOF instruments (e.g. quadrupole-*oa*-TOF, Q-*oa*-TOF) allow MS/MS experiments for a deeper characterization through analyte fragmentation [7]. However, it is typically accepted that *oa*-TOF-based mass spectrometers do not meet the requirements of a triple quadrupole in multiple-reaction monitoring mode for sensitive quantitative analysis of target compounds [14, 15].

Many desirable characteristics of *oa*-TOF-MS analyzers explain the increasing number of CE-*oa*-TOF-MS publications over the last years [1–8]. However, it is difficult to decipher from the available applications the main specific factors influencing the performance of CE-*oa*-TOF-MS in terms of sensitivity, selectivity, accuracy and resolution of the measurements. Very little work has been carried out on

Correspondence: Dr. Fernando Benavente, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain
E-mail: fbenavente@ub.edu
Fax: +34-934021233

Abbreviations: **Ala-Met**, [Ala]-Met-enkephalin; **BGE**, background electrolyte; **Des-Tyr**, des-Tyr-Leu-enkephalin; **EIE**, extracted ion electropherogram; **Endo**, endomorphin 1; **FWHM**, full-width half-height maximum; **iPro**, isopropanol; **IT**, ion trap; **Met**, Met-enkephalin; **oa-TOF-MS**, orthogonal accelerated time-of-flight mass spectrometry; **Y**, tyrosine; **G**, glycine; **P**, phenylalanine; **M**, methionine; **A**, alanine; **L**, leucine; **Pro**, proline; **W**, tryptophan; **R**, arginine

this subject and following the extensive use, it is clear that there is a need to investigate those factors in order to provide a clear guidance on separation and mass measurements using CE-oe-TOF-MS [12, 16–21]. The reliability of the results is the first step before making use of the high amount of information that can be gathered from, for example, the separation of protein glycoforms [22] or the screening procedures based on identification of the chemical formula and comparison of isotope patterns using molecular mass reference databases [23–28].

In this paper, we investigated the main factors influencing the CE-oe-TOF-MS analysis of low molecular mass peptides, using several neuropeptides as model compounds, which are the largest family of neurotransmitters and neuromodulators in the central nervous system [29]. Calibration, fragmentation, different instrumental modes and validation for quantitative analysis were carefully examined for a sensitive determination and a confident identification of the separated neuropeptides.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals used in the preparation of buffers and solutions were of analytical reagent grade. Formic acid, acetic acid (glacial), ammonium hydroxide (25%) (NH₄OH), and 2-propanol (iPro), were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Water with a conductivity value lower than 0.05 µS/cm was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

The neuropeptides studied were: Methionine enkephalin (Met), [Ala]-methionine enkephalin ([Ala]-Met), methionine enkephalinamide (Met-NH₂), des-Tyr-leucine enkephalin (Des-Tyr), endomorphin 1 (Endo) and dynorphin A (1–7). All were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except dynorphin A (1–7) that was supplied by Bachem (Bubendorf, Switzerland) and Des-Tyr by Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). They were stored in a freezer when not in use. Sequences and theoretical monoisotopic relative molecular mass (*M_r*) values are shown in Table 1.

ESI Low Concentration (ESI-L) tuning mix for tuning and calibration of the oe-TOF mass spectrometer and the reference compound solutions for internal mass recalibration (*i.e.* 5 mM

of purine, C₅H₄N₄, in 90:10 v/v acetonitrile/water and 2.5 mM HP-0921, hexakis(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine a proprietary polyfluorinated compound, C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄, in acetonitrile) were supplied by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

2.2 Sample solutions, background electrolyte and sheath liquid

A stock solution containing 100 µg/mL of each neuropeptide was prepared in water. Solutions used in determination of LODs were prepared by successively diluting the stock solution in water.

The composition of the background electrolyte (BGE) and the sheath liquid solution for CE-MS were optimized in a previous work [30, 31]. The BGE contained 50 mM acetic acid–50 mM formic acid, adjusted to pH 3.5 with NH₄OH. The sheath liquid solution was a hydroorganic mixture of 60:40 v/v iPro/water containing 0.05% v/v of formic acid. When internal mass recalibration was used, the concentration of purine and HP-0921 in the sheath liquid solution was selected by monitoring the intensity of the signal of their single charged molecular ions (*i.e.* 121.0509 and 922.0098 *m/z*, respectively). The manufacturer recommended intensity values comprised between 1000 and 75000 counts for optimum reference mass correction. However, the suggested concentrations needed some adjustment to avoid signal intensities above the upper limit under the optimum CE-MS conditions. Therefore, in our case, the sheath liquid containing the reference compounds was prepared diluting 1.5 µL of purine and 1.2 µL of HP-0921 solutions to 100 mL with the sheath liquid.

The samples and the BGE were filtered through a 45-µm nylon filter (MSI). The BGE and the sheath liquids were degassed by sonication (10 min) before use.

2.3 Instrumentation

All CE-oe-TOF-MS experiments were performed in an HP^{3D}CE system (Agilent Technologies) coupled to a 6220 oe-ToF LC/MS mass spectrometer (Agilent technologies) with a dual-nebulizer ESI source. The orthogonal nebulizer was a G1603A sheath-flow interface for CE-MS (Agilent

Table 1. Sequence, theoretical monoisotopic relative molecular mass (*M_r*) and *m/z* values of the detected ions of the studied peptides

Abbreviation	Peptide	Molecular formula	Sequence	Theoretical		
				<i>M_r</i>	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	[M+2H] ²⁺ (<i>m/z</i>)
Met	Met-enkephalin	C ₂₇ H ₃₅ N ₅ O ₇ S	YGGFM	573.2257	574.2330	
Ala-Met	[Ala]-Met-enkephalin	C ₂₈ H ₃₇ N ₅ O ₇ S	YAGFM	587.2414	588.2486	
Met-NH ₂	Met-enkephalinamide	C ₂₇ H ₃₆ N ₆ O ₆ S	YGGFM-NH ₂	572.2417	573.2490	
Des-Tyr	des-Tyr-Leu-enkephalin	C ₁₉ H ₂₈ N ₄ O ₅	GGFL	392.2060	393.2132	
Endo	Endomorphin 1	C ₃₄ H ₃₈ N ₆ O ₅	YPWF-NH ₂	610.2904	611.2976	
Dyn	Dynorphin A (1-7)	C ₄₀ H ₆₁ N ₁₃ O ₉	YGGFLRR	867.4715	868.4788	434.7430

Technologies). The other one, which is in general used to introduce the internal reference mass standard solution in LC-MS experiments, was disabled to avoid interferences with the CE-MS experiments [12, 20]. The sheath liquid was delivered at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump. CE control and separation data acquisition (e.g. voltage, temperature and current) were performed using ChemStation software (Revision B.04.01, Agilent Technologies) that was running in combination with the MassHunter workstation software (Version B.02.00, Agilent Technologies) for control, data acquisition and analysis of the oa-TOF mass spectrometer. Theoretical molecular mass calculations of parent ions and fragments were performed using mmass software that was freely available on-line [32].

The CE separation was performed in a 57 cm \times 75 μm id fused-silica capillary (Polymicro Technologies Phoenix, AZ, USA) at 25°C fitted in a CE-MS cartridge cassette (Agilent Technologies). All capillary rinses were performed at 930 mbar. New capillaries were flushed for 20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 15 min with water and 10 min with BGE. The system was finally equilibrated by applying the separation voltage for 15 min. Between workdays, the capillary was conditioned by rinsing with aqueous 0.1 NaOH (5 min), water (10 min) and BGE (5 min). Both activation and conditioning procedures were performed off-line in order to avoid the unnecessary entrance of NaOH into the mass spectrometer. Samples were hydrodynamically injected at 33.5 mbar for 3 s without turning off the nebulizing gas and separation voltage was 16 kV (normal polarity, anode in the inlet). Between runs the capillary was rinsed 3 min with BGE. At the end of the working day, the capillary was stored dry after being rinsed for 10 min with water and for 5 min with air to avoid salt crystallization.

Unless otherwise indicated, the oa-TOF mass spectrometer was operated under optimum conditions in positive mode using the following parameters: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 200°C, drying gas flow rate 4 L/min, nebulizer gas 7 psig, fragmentor voltage 215 V, skimmer voltage 60 V, OCT 1 RF Vpp voltage 300 V. Data were collected in profile (continuum) at 1 spectrum/s (approx. 10 000 transients/spectrum) between m/z 100 and 1250 working in the extended dynamic range (2 GHz) mode with the mass range set to standard (3200 m/z). The reference mass correction was enabled for the experiments with internal mass recalibration.

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA).

2.4 Procedures

2.4.1 Tune and calibration of the oa-TOF mass spectrometer

Every day, prior to any analysis, a standard tune of the oa-TOF parameters and a mass-axis calibration were carried

out. The typical LC-MS nebulizer was fitted in the orthogonal position of the dual-nebulizer ESI source. Only this nebulizer was necessary to infuse the ESI-L tuning mix under the conditions recommended by the manufacturer [33]. The other one was disabled as in CE-MS experiments. During a standard tune the instrument automatically adjusted the main parameters influencing the sensitivity, peak shape and the actual TOFs of the ions with known masses contained in the ESI-L tuning mix. The standard tune was carried out in positive polarity, the instrument resolution mode was set to extended dynamic range (2 GHz) and the mass range was set to standard (3200 m/z). After finishing the standard tune, we calibrated the mass-axis to ensure accurate mass assignments. For mass calibration, it was important to set the instrument resolution mode and mass range required later for the analysis.

2.4.2 CE-oa-TOF-MS of neuropeptides

Using the CE-oa-TOF-MS setup, the parameters of the oa-TOF-MS were specifically tuned for the ions of the compounds of interest. A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mixture of the studied neuropeptides was delivered through the CE separation capillary at 50 mbar and the oa-TOF parameters were monitored to get the maximum signal intensity for the ions of the neuropeptides. The oa-TOF-MS parameter values obtained in this way are reported above in Section 2.3 and were later confirmed running different CE-oa-TOF-MS separations and monitoring their extracted ion electropherograms (EIEs). The m/z values of the molecular ions which are considered to obtain the EIE for each neuropeptide are shown in Table 1. In CE-oa-TOF-MS, the parameters related to ESI were optimized first. The nebulizer pressure was set at 7 psig because the CE run times were shortened, resolution was good and the height (or S/N ratios) of the peptide peaks in the EIEs was almost the same as that of the other values tested (3 and 5 psig). The height of the peaks in the EIEs was very similar for the different drying gas temperatures studied (200, 250, 300 and 350°C) although their shape was better at 200°C. In the case of the drying gas flow rate, the highest peaks were obtained by using a 4 L/min flow rate, instead of 6 L/min. Regarding the oa-TOF-MS parameters, the best responses when varying the capillary voltage values between 3000 and 5000 V were obtained at 4000 V. The fragmentor voltage was of special interest and the results obtained at 225, 275, 325, 375, 425 V will be discussed later in detail. Several skimmer voltage values (from 40 to 80 V) and OCT 1 RF Vpp voltage values (from 150 to 300 V) voltages were also studied. Both parameters do not have a significant effect on the signal intensity of the neuropeptide ions and 60 and 300 V were selected, respectively, because of the improved peak shape in the EIEs.

The sheath liquids with and without the reference compounds were used to test the influence of the reference compounds involved in internal mass recalibration on

repeatability and accuracy of the experimental M_r values, as well as repeatability of peak area, linearity and LODs. All quality parameters were calculated from data obtained by measuring the peak area, the S/N ratio values or the M_r from the EIE of each peptide. Repeatability studies ($n = 10$ or 12 runs/day) were performed with a mixture of the studied neuropeptides at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both parameters were calculated as a percentage of the RSD (%RSD) of peak area or experimental M_r . Mass accuracy was expressed in ppm as an average of the ratio between the difference of the experimental and the theoretical M_r and the theoretical M_r [12, 13]. The LOD for each neuropeptide was obtained analyzing low-concentration samples. Samples were successively diluted and analyzed until no peptides were detected. In each case, the lowest concentration giving a signal significantly different from the baseline was considered as the LOD (S/N ratio was always higher than 3). The linearity range was determined by injecting the samples at concentrations of 0.1–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Finally, different instrumental modes related to mass resolution and dynamic range were examined, namely “high resolution” (4 GHz) and “extended dynamic range” (2 GHz). The mass ranges were set to low (1700 m/z) and standard (3200 m/z) in both cases. Prior to any change in the instrumental mode, the oa-TOF parameters were tuned as indicated in Section 2.4.1. Then, the mass-axis was calibrated to ensure accurate mass assignments in the new instrumental mode. In all cases, the CE-oa-TOF-MS experiments were performed using a sheath liquid with the reference compounds for internal mass recalibration. Resolution was discussed on the basis of the width at half-height (full-width half-height maximum (FWHM)) for a given ion [12, 13].

3 Results and discussion

In a previous investigation, we developed and validated a CE-MS methodology for the analysis of neuropeptides using a conventional reflectron TOF and an ion trap (IT) mass spectrometer [30, 31]. In this study, we evaluated this methodology with an oa-TOF mass spectrometer. The use of CE-oa-TOF-MS is becoming popular as an alternative to CE-MS using conventional mass analyzers. However, it is difficult to find in the literature clear descriptions about the essential specific factors involved in the performance of CE-oa-TOF-MS [12, 16–21]. After tuning and calibrating the oa-TOF-MS with the (ESI-L) tuning mix and the neuropeptide mixture as described in the experimental section, we concluded that the fragmentor voltage value was the operational parameter of the oa-TOF showing the greatest influence on the intensity of the molecular ions of the neuropeptides. Figure 1 shows the sum of the EIE for a mixture containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each neuropeptide using different fragmentor voltage values. In all cases, four peaks were obtained because Endo and Met-NH₂ comigrated and Met and Ala-Met could not be fully resolved. As expected,

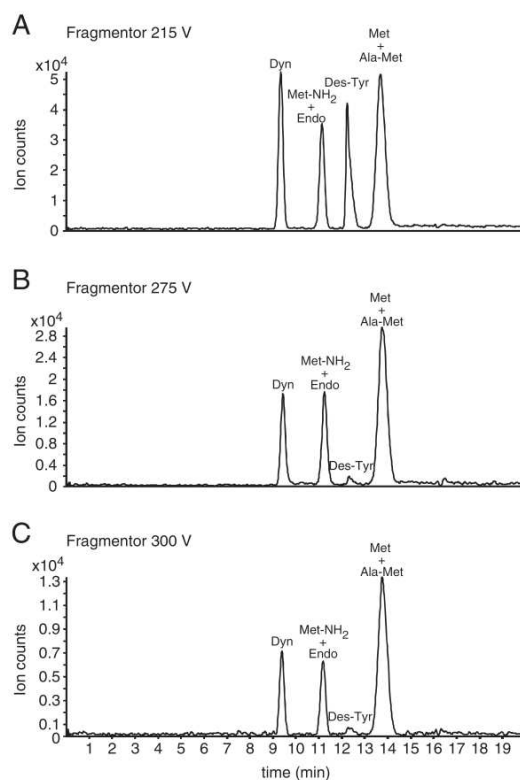


Figure 1. Sum of EIE for the studied peptides. Extracted ions are indicated in Table 1. Fragmentor voltage values of the oa-TOF mass spectrometer are: (A) 215 V, (B) 275 V and (C) 300 V.

separations and migration times were similar to those previously obtained by CE-MS with conventional reflectron TOF and IT analyzers [30, 31]. The maximum peak heights were shown in all cases at a fragmentor voltage value of 215 V (Fig. 1A). In general, peak heights were around twice higher at 215 V (Fig. 1A) than at 275 V (Fig. 1B), except for Des-Tyr that was more than 10 times higher at 215 V. A similar trend can be observed from comparison of the electropherograms at 275 V (Fig. 1B) and 300 V (Fig. 1C). The lowest peak heights were obtained at a fragmentor voltage value of 300 V especially for Des-Tyr. This generalized decrease in peak height of the molecular ions with an increase in the fragmentor voltage values was directly related to in-source collision-induced dissociation (*i.e.* fragmentation) of the neuropeptides, as previously observed with other molecules, such as pesticides and antibiotics [23, 27, 34]. Figure 2 shows the mass spectra of Met and Des-Tyr at different fragmentor voltage values. At 215 V, the fragmentation of Met was negligible (Fig. 2A). The single charged molecular ion was the most important signal of the mass spectrum together with the corresponding adducts with Na⁺ and K⁺. A large number of product ions of Met were obtained when the fragmentor voltage value was

increased up to 275 V (Fig. 2C), but the intensity of the single charged molecular ion remained higher than those of the product ions. At 300 V (Fig. 2D), the intensity of the peaks of some product ions of Met rose until being similar to that of the single charged molecular ion. A similar behavior was observed for the rest of peptides excepting Des-Tyr (Fig. 2B, D and F). The single charged molecular ion of this neuropeptide was more labile than the others. As can be observed in Figure 2B fragmentation already began at 215 V. At 275 V, the precursor ion was almost completely fragmented to mostly obtain the i3 fragment (Fig. 2D). In contrast, the adducts of Des-Tyr with Na^+ and K^+ seemed to be less prone to fragmentation because their ion signals decreased to a lesser extent. At 300 V (Fig. 2F) the Des-Tyr i3

fragment was the predominant ion of the product ion mass spectrum. In-source collision-induced dissociation of the substances of interest could be a disadvantage when the aim is to obtain optimum sensitivity by detecting single or multiple charged molecular ions but could be a useful tool for confirming the identity of the different compounds [12, 23, 27, 34]. In addition, we recommend using several fragmentor voltage values for accurate mass screening of unknowns in complex mixtures in order to avoid identity misinterpretations. Using accurate M , the characteristic isotope pattern and, in some cases, product ion mass spectra, the identity of the separated low molecular mass compounds may be confirmed almost unequivocally [12, 14, 15, 21, 23–28].

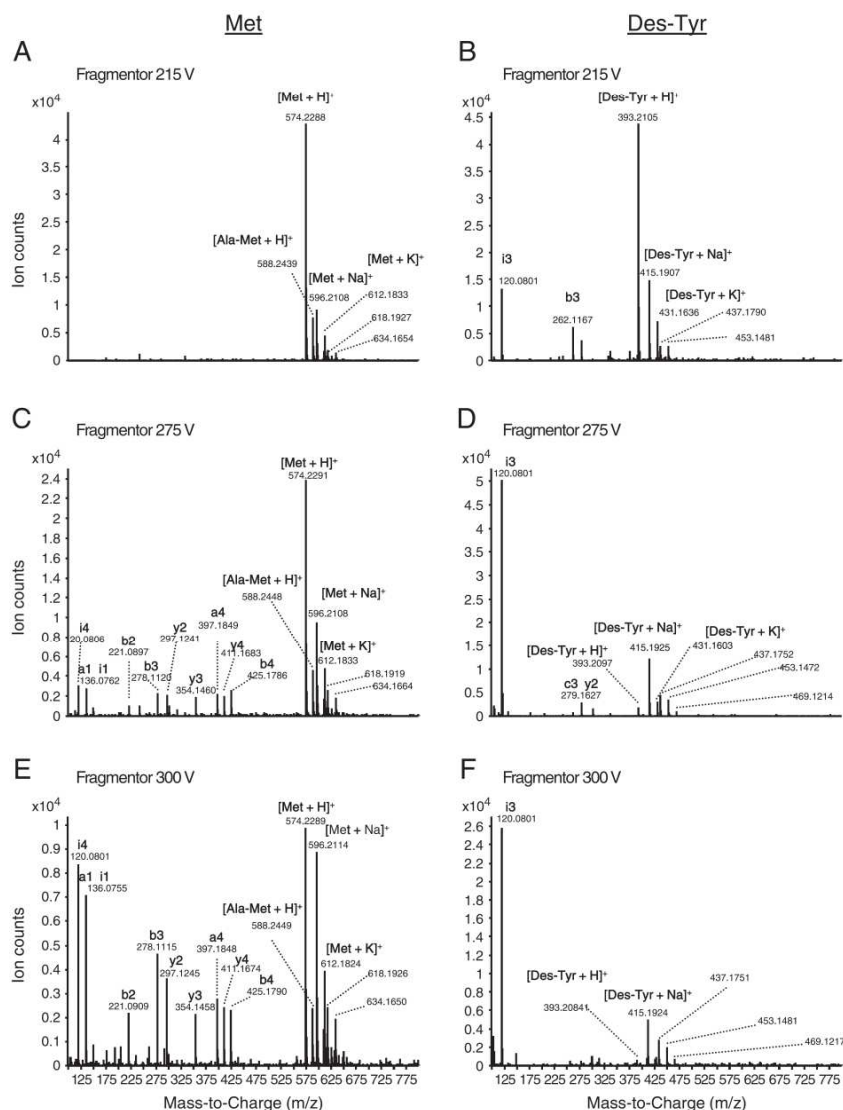


Figure 2. Mass spectra of Met and Des-Tyr using different fragmentor voltage values of the oa-TOF mass spectrometer: (A, B) 215 V, (C, D) 275 V and (E, F) 300 V. The most important fragments are appointed.

In oa-TOF-MS, a continuous internal mass recalibration during data acquisition is recommended to ensure the reliability of the mass measurements [12, 18–21]. In LC-oa-TOF-MS, it is common to use a dual-nebulizer ESI source [12, 18–21]. The main nebulizer is used to spray the solvent coming from the LC column, whereas simultaneously from the auxiliary one it is sprayed a hydroorganic solution containing at an appropriate concentration two reference compounds with known molecular masses (*i.e.* lock masses) covering the acquired m/z range. The selection of appropriate reference compounds is a challenging task with important implications not only in mass accuracy, but also in sensitivity. Therefore, the reference compounds have to be stable and readily ionizable in the experimental ESI conditions without causing ion suppression or excessive background signal. We used in CE-oa-TOF-MS the two compounds recommended by the instrument manufacturer for the analysis of low molecular mass compounds (*i.e.* purine and HP-0921, with nominal m/z values of 121 and 922, respectively [33]), because both bracketed the m/z values of the molecular ions of the studied neuropeptides. The preliminary experiments with the dual-nebulizer ESI source were not satisfactory, because the nebulization of the auxiliary nebulizer interfered with the CE-MS analysis. We explored several alternatives. First, we discarded to add the reference compounds to the BGE to avoid undesired effects on separation. Later, we evaluated the use of some of the ions that were commonly found in the background mass spectra [35]. However, in addition to the lower intensity of the background ions in the upper m/z range, it was only easy to unambiguously identify some of the compounds in the 100–400 m/z range. Finally, we decided to investigate the addition of purine and HP-0921 to the sheath liquid.

As the sheath liquid with the reference compounds was mixed with the BGE coming from the separation capillary immediately before nebulization, no influence was observed on separations. The concentration of the reference compounds in the sheath liquid was optimized in order to

avoid excessive background noise while maintaining an appropriate intensity for their single charged molecular ions. In general, we observed that the higher the concentration of reference compound ions, the worse the S/N ratio for the peaks of neuropeptides. In addition, other authors have described a negative effect on mass accuracy if the compounds used as references are measured at high concentration [12, 33]. Table 2 shows repeatability of peak area, calibration data, LODs, experimental M_r , repeatability and accuracy of experimental M_r in CE-oa-TOF-MS using sheath liquids with and without reference compounds under optimum conditions. The RSD values (%RSD) for repeatability of peak areas ranged between 2.3 and 16.9% without reference and 3.4 and 11.4% with reference. Both results were similar between them and slightly better than the repeatability values previously obtained with conventional reflectron TOF and IT analyzers [30, 31]. Signal versus concentration was linear in both cases in three orders of magnitude, between 0.1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ (r^2 0.99), but r^2 values were slightly better with reference compounds, probably because of the higher accuracy in EIE generation. The observed linear range was slightly wider than those obtained with conventional reflectron TOF (3–70 $\mu\text{g/mL}$) and IT (2.5–50 $\mu\text{g/mL}$) analyzers [30, 31]. With regard to LODs, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ of each neuropeptide was detected in all cases and the S/N ratios calculated with and without references were not significantly different. These LODs represent around a 10-fold improvement with respect to the values previously obtained with conventional reflectron TOF or IT analyzers [30, 31]. The main drawback of using purine and HP-0921 as reference compounds in the sheath liquid was that the intensity of the single charged molecular ion of HP-0921 (922.0098 m/z) decreased with time, until being almost undetectable after 12 h of unstopped operation. The problem was solved preparing again fresh sheath liquid solution with both reference compounds, indicating that HP-0921 degraded with time due to the composition of the sheath liquid. At this point, it could be worth mentioning

Table 2. Repeatability of peak area, calibration data, LODs, experimental M_r , repeatability and accuracy of experimental M_r in CE-oa-TOF-MS. Mass spectra were acquired at 2 GHz in extended dynamic range (until 3200 m/z). The concentration of the peptides was 1 $\mu\text{g/mL}$ unless otherwise is indicated.

Peptide	Without reference					With reference				
	Peak area (% RSD) ($n = 12$)	R^2 (0.1–10 $\mu\text{g/mL}$)	M_r ($n = 12$)			Peak area (% RSD) ($n = 10$)	R^2 (0.1–10 $\mu\text{g/mL}$)	M_r ($n = 10$)		
			Average value	% RSD	Average error (ppm)			Average value	% RSD	Average error (ppm)
Met	5.20	0.986	573.2326	0.126	12.0	3.55	0.993	573.2288	7.98×10^{-5}	5.34
Ala-Met	3.24	0.987	587.2484	0.098	11.8	3.42	0.993	587.2444	7.40×10^{-5}	5.19
Met-NH ₂	3.06	0.988	572.2486	0.132	12.0	4.62	0.994	572.2448	5.60×10^{-5}	5.36
Des-Tyr	2.92	0.988	392.2108	0.228	12.2	3.88	0.995	392.2106	9.93×10^{-5}	11.7
Endo	2.28	0.987	610.2974	0.091	11.5	4.42	0.992	611.2999	6.33×10^{-5}	3.70
Dyn	16.9	0.982	867.4820	0.096	12.1	11.4	0.992	867.4806	1.19×10^{-4}	10.4
LODs were 0.1 $\mu\text{g/mL}$ for all the studied peptides					LODs were 0.1 $\mu\text{g/mL}$ for all the studied peptides					

other strategies for continuous recalibration such as the use of some of the ions that are commonly found in the background mass spectra or the selection of other compounds as references [12, 35]. Other authors have preferred post-run calibration, using as lock masses the sodium formate adduct ions that are detected at the beginning of the electropherograms after washing the capillary with sodium hydroxide or switching the sheath-liquid to an appropriate solution. Adding specific lock mass internal standards to the samples or using some specific sample matrix compounds has also been described [12, 18, 19]. In all these cases, post-run calibration is not a real-time calibration because the reference compounds are not continuously analyzed. This could be detrimental if there are small changes in the instrument behaviour or temperature changes within the runs. A varying temperature will cause an external calibration to drift due to the expansion and contraction of the flight tube over time producing poor mass accuracy [12, 18, 19].

As can be observed in Table 2, recalibrating the mass-axis was necessary to obtain the best performance in terms of repeatability and accuracy of mass measurements. The benefit of using internal mass recalibration was clearly revealed even with a short series of 10 analysis and average mass errors and %RSD with the sheath liquid with reference compounds were significantly better (between approx. 5.2 and 11.7 ppm and 5.6×10^{-5} and 1.2×10^{-4} %RSD, respectively). The differences in mass accuracy for the different peptides could be due to changes on the stability and intensity of the analyte signal, which may influence peak shape and the ability to obtain the true values of the monoisotopic ion peaks from the mass spectra. These accuracy values from 5 to 10 ppm agree with those

previously reported in the literature with similar mass spectrometers and were markedly better to those that can be achieved with conventional reflectron TOF or IT mass analyzers [30–31]. To further explore the factors potentially influencing compound identification, the “high resolution” (4 GHz) and “extended dynamic range” (2 GHz) instrumental modes were examined in the low (1700 m/z) and standard (3200 m/z) mass ranges. As can be observed in Table 3, no influence was observed in terms of repeatability and accuracy of M_r measurements. However, the instrumental mode was clearly affecting resolution as can be observed from comparison of the FWHM for the ion peaks of Figure 3 that shows the mass spectra of Des-Tyr and Endo. The narrower the peak width was obtained, the higher the resolving power of the mass spectrometer. At 4 GHz (Fig. 3A until 3D) the FWHMs were twice as much to the values obtained at 2 GHz (Figs. 3E until 3H) whatever the mass range considered (1700 or 3200 m/z). Thus, for example, in the Endo mass spectra obtained at 4 GHz (in Fig. 3B and D) the increase in resolving power allowed separation of Endo molecular ions from some minor ions from the background (*i.e.* peaks at around 611.2 and 611.3 m/z values) which were not fully resolved at 2 GHz (Fig. 3F and H). In addition, the increase in resolution did not produce a variation in sensitivity. At the “high resolution” (4 GHz) mode, the analog-to-digital converter detector of the mass spectrometer acquired data at 4 GHz, while special processing was performed in real-time on the peak ions detected, weighting the apex data of the peaks much more heavily than the shoulders [33]. This led to narrower peaks in the mass spectra without affecting S/N ratios. However, at the “extended dynamic range” (2 GHz) mode, the acquisition rate was also 4 GHz but in a dual channel

Table 3. Experimental M_r , repeatability and accuracy using different modes in CE-oa-TOF-MS. The concentration of the peptides was 1 $\mu\text{g/mL}$.

Peptide	3200 m/z ($n = 3$)			1700 m/z ($n = 3$)		
	M_r			M_r		
	Average value	RSD (%)	Average error (ppm)	Average value	RSD (%)	Average error (ppm)
<i>4 GHz, High resolution</i>						
Met	573.2302	9.61×10^{-5}	7.73	573.2290	1.09×10^{-4}	5.76
Ala-Met	587.2454	4.28×10^{-5}	6.79	587.2439	1.12×10^{-4}	4.29
Met-NH ₂	572.2448	1.89×10^{-5}	5.45	572.2436	6.14×10^{-5}	3.24
Des-Tyr	392.2104	7.36×10^{-5}	11.2	392.2086	5.31×10^{-5}	7.28
Endo	610.2934	7.74×10^{-5}	4.89	610.2926	4.73×10^{-5}	3.58
Dyn	867.4789	1.14×10^{-5}	8.52	867.4767	2.66×10^{-5}	5.98
<i>2 GHz, Extended dynamic range</i>						
Met	573.2285	9.06×10^{-5}	4.88	573.2290	2.66×10^{-5}	5.82
Ala-Met	587.2439	7.80×10^{-5}	4.29	587.2444	2.95×10^{-5}	5.14
Met-NH ₂	572.2447	5.24×10^{-5}	5.28	572.2450	5.04×10^{-5}	5.74
Des-Tyr	392.2099	9.19×10^{-5}	9.99	392.2103	9.65×10^{-5}	10.9
Endo	610.2925	4.92×10^{-5}	3.47	610.2926	5.91×10^{-5}	3.64
Dyn	867.4790	1.28×10^{-5}	8.67	867.4810	2.30×10^{-5}	11.0

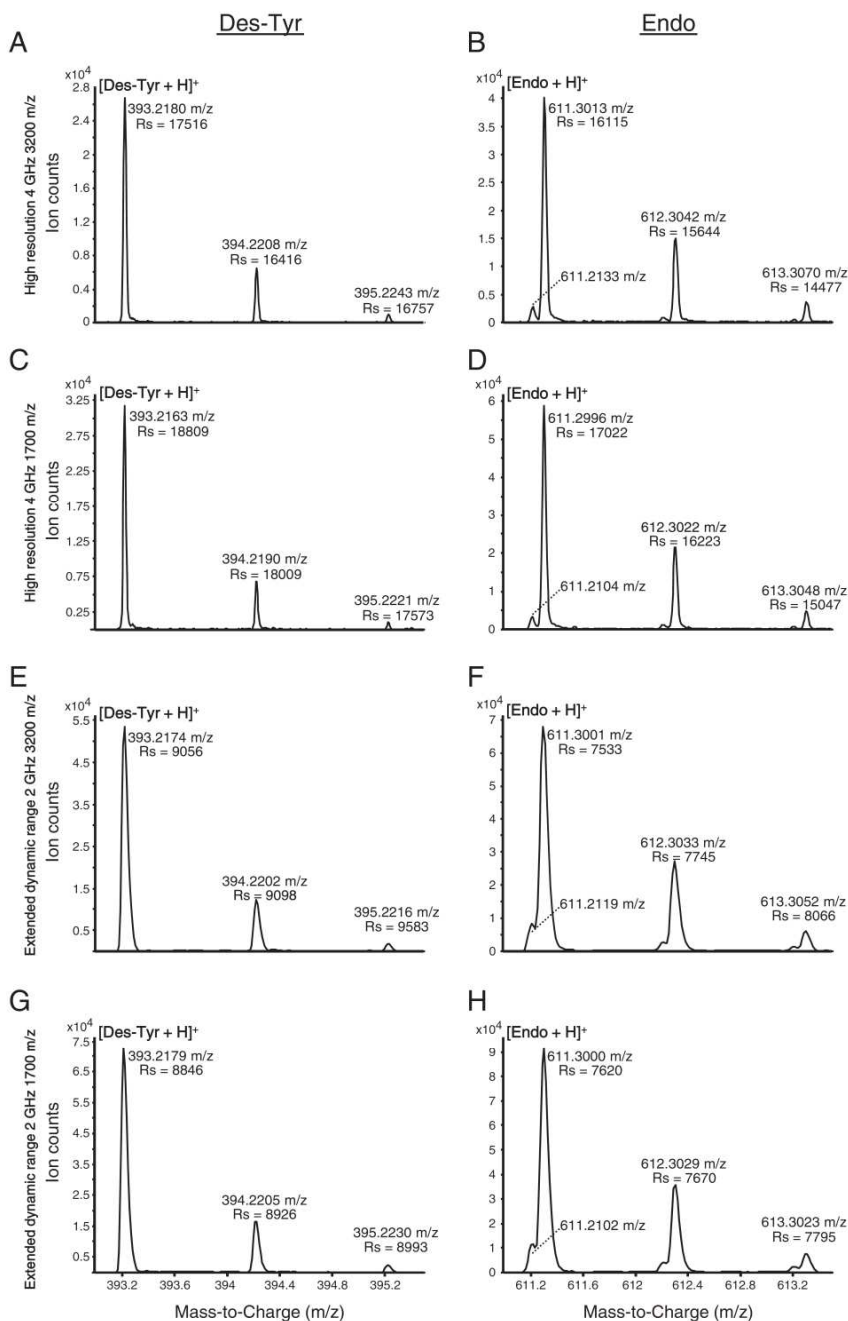


Figure 3. Mass spectra in the *m/z* range of the single charged molecular ion of Des-Tyr (A, C, E and G) and Endo (B, D, F and H) using different modes for the oa-ToF mass spectrometer: A, B) "high resolution" (4 GHz), mass range 3200 *m/z*, (C, D) "high resolution" (4 GHz), mass range 1700 *m/z*, (E, F) "extended dynamic range" (2 GHz), mass range 3200 *m/z* and (G, H) "extended dynamic range" (2 GHz), mass range 1700 *m/z*.

mode. One channel was recorded at a high detector gain whereas the other channel operated at a low detector gain. Then the two channels were stitched together to produce a scan with a sampling rate of 2 GHz, which

resulted in a greatly increased dynamic range. A wide dynamic range may be necessary for the analysis in a single run of unknown samples that vary widely in analyte concentration.

4 Concluding remarks

We have clearly described the main parameters influencing sensitivity and reliability of the molecular mass measurements in CE-*oa*-TOF-MS of a series of low molecular mass neuropeptides. Tuning of the *oa*-TOF parameters and external mass-axis calibration is mandatory before beginning the experiments. Then, the fragmentor voltage value can be adjusted in order to maximize the production of the analyte molecular ions for optimum sensitivity. Higher fragmentor voltage values allow obtaining product ion mass spectra that, when the variety of fragment ions is not limited, can be useful to confirm the identity of the separated compounds. The addition of internal mass references to the sheath liquid for continuous mass-axis recalibration during the electrophoretic separations results in the best performance in terms of repeatability and accuracy of mass measurements, with values around 5–10 ppm and 10^{-4} %RSD, respectively. The presence of the reference compounds (purine and HP-0921) at the proposed concentrations does not affect the electrophoretic separations, peak area repeatability and sensitivity. On the contrary, it promotes a slight positive effect on linearity (R^2 values). An inconvenience of following this strategy for internal mass-axis recalibration is degradation with time of HP-0921 due to the sheath liquid composition. Hence, the sheath liquid solution used for continuous mass-axis recalibration needs to be refreshed after 12 h of preparation. Real-time mass-axis recalibration is necessary to obtain the best performance of the *oa*-TOF-MS ensuring the accuracy of the mass measurements. In terms of mass resolution, the “high resolution” (4 GHz) mode allows enhanced resolution without a decrease in sensitivity. The “extended dynamic range” (2 GHz) mode is advisable for improved performance with samples that vary widely in analyte concentrations when resolution is not a limiting factor. In general, the results obtained for the analysis of neuropeptides by CE-*oa*-TOF-MS are markedly better than those obtained using conventional reflectron TOF or IT analyzers. Especially remarkable are the improvements in sensitivity, linear range, repeatability, mass accuracy and resolution. Thus, despite not having the sensitivity or the quantitative capabilities of triple quadrupole mass spectrometers working in multiple-reaction monitoring mode for targeted analytes, the possibility of performing MS^n experiments of hybrid TOF mass analyzers (e.g. Q-TOF) or the accuracy and resolving power of magnetic sector or Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR-MS) mass spectrometers, the features of an *oa*-TOF may be good enough for screening, elucidation of elemental composition and confirmation of low molecular mass compounds in complex mixtures with CE-MS at a reasonable price.

Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU). M. Borges-Alvarez acknowledges the Spanish Ministry of Education and

Science for an FPU (Formación del Profesorado Universitario) fellowship.

The authors have declared no conflict of interest

5 References

- [1] Gaspar, A., Englmann, M., Fekete, A., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., *Electrophoresis* 2008, **29**, 66–79.
- [2] Klampfl, C. W., *Electrophoresis* 2009, **30**, S83–S91.
- [3] Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, **29**, 2148–2160.
- [4] Fonslow, B. R., Yates III, J. R., *J. Sep. Sci.* 2009, **32**, 1175–1188.
- [5] Ahmed, F. E., *J. Chromatogr. B* 2009, **877**, 1963–1981.
- [6] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2009, **30**, 276–291.
- [7] Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *Electrophoresis* 2009, **30**, 1610–1623.
- [8] Stutz, H., *Electrophoresis* 2005, **26**, 1254–1290.
- [9] Scriba, G. K. E., Psurek, A., in: Schmitt-Kopplin P. (Ed.), *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, USA 2008, pp. 483–506.
- [10] Kasicka, V., *Electrophoresis* 2010, **31**, 122–146.
- [11] Unger, M., *Planta Med.* 2009, **75**, 735–745.
- [12] Web, K., Bristow, T., Sargent, M., Stein, B., *Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules, Best Practice Guide*, 1st Edn, LGC Limited, Teddington, UK 2004.
- [13] Balogh, M. P., *LC GC Europe* 2004, **17**, 152–159.
- [14] Pucci, V., Bonelli, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, **21**, 3051–3059.
- [15] Timischl, B., Dettmer, K., Kaspar, H., Thieme, M., Oefner, P. J., *Electrophoresis* 2008, **29**, 2203–2214.
- [16] Weaver, P. J., Lares, A. M. F., Wolff, J. C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, **21**, 2415–2421.
- [17] Lares, A. M. F., Wolff, J. C., Eckers, C., Borman, P. J., Chatfield, M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, **21**, 529–535.
- [18] Ishino, Y., Taniguchi, H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, **22**, 1335–1338.
- [19] Becker, C. H., Kumar, P., Jones, T., Lin, H., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 1702–1707.
- [20] Nepomuceno, A. I., Muddiman, D. C., Bergen III, H. R., Craighead, J. R., Burke, M. J., Caskey, P. E., Allan, J. A., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 3411–3418.
- [21] Nielen, M. W. F., Vissers, J. P. C., Fuchs, R. E. M., van Velde, J. W., Lommen, A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001, **15**, 1577–1585.
- [22] Balaguer, E., Demelbauer, U., Pelzing, M., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Neusüß, C., *Electrophoresis* 2006, **27**, 2638–2650.
- [23] Polettini, A., Gottardo, R., Pascali, J. P., Tagliaro, F., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 3050–3057.
- [24] Levandi, T., Leon, C., Kaljurand, M., Garcia-Cañas, V., Cifuentes, A., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 6329–6335.

2498 M. Borges-Alvarez et al.

J. Sep. Sci. 2010, 33, 2489–2498

- [25] Mayboroda, O. A., Neussus, C., Pelzing, M., Zurek, G., Derks, R., Meulenbelt, I., Kloppenburg, M., Slagboom, E. P., Deelder, A. M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1159, 149–153.
- [26] von zur Muhlen, C., Schiffer, E., Zuerbig, P., Kellmann, M., Brasse, M., Meert, N., Vanholder, R. C., Dominiczak, A. F., Chen, Y. C., Mischak, H., Bode, C., Peter, K., *J. Proteome Res.* 2009, 8, 335–345.
- [27] Ferrer, I., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R., *Anal. Chem.* 2005, 77, 2818–2825.
- [28] Picó, Y., Farré, M., Soler, C., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2007, 1176, 123–134.
- [29] Perry, M., Li, Q., Kennedy, R. T., *Anal. Chim. Acta* 2009, 653, 1–22.
- [30] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Hernández, E., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2006, 577, 68–76.
- [31] Hernández, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 3957–3965.
- [32] Strohal, M., Hassman, M., Kosata, B., Kodíček, M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, 905–908.
- [33] Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System, *Concepts Guide, The Big Picture*, 5th Edn, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA 2008.
- [34] Hermo, M. P., Barrón, D., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2008, 1201, 1–14.
- [35] Keller, B. O., Suib, J., Young, A. B., Whittall, R. M., *Anal. Chim. Acta* 2008, 27, 71–81.

Article 4.2.

Electrophoresis 2012, 33, 2561–2569

2561

Marta Borges-Alvarez
Fernando Benavente
José Barbosa
Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical
Chemistry, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Received December 7, 2011

Revised April 10, 2012

Accepted April 12, 2012

Research Article

Separation and characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) from human erythrocytes by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry

Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD-1) is a homodimeric metalloenzyme that has been related to ALS (amyotrophic lateral sclerosis). The majority of ALS cases are sporadic while approximately 10% are inherited (familial ALS, FALS). Mutations in the amino acid sequence of human SOD-1 cause only 25% of the FALS cases, while the explanation for the rest is not clear yet. In this way, several authors have suggested the importance of posttranslational modifications or dimer dissociation on formation of the characteristic fatal intraneuronal SOD-1 aggregates. In this paper, we used capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry with an accurate mass and high-resolution time-of-flight mass spectrometer (CE-TOF-MS) for separation and characterization of standard bovine SOD-1 and human SOD-1 purified from erythrocytes. Two background electrolytes (BGEs) were used for CE-TOF-MS experiments in positive ion mode. An acidic BGE allowed detection of apo-monomer SOD-1, because the metal ions were completely released during the electrophoretic separation. The better sensitivity at acidic pH was especially interesting to detect different isoforms of human SOD-1. In contrast, a neutral BGE provided enhanced conditions for detection of the fully metalated dimeric and monomeric enzyme, but selecting an appropriate fragmentor voltage value in the TOF analyzer was critical to obtain reliable quantitative information. Anyway, only the metalated forms involving the main isoform of human SOD-1 were detected due to the lower sensitivity. Hence, the combination of both methodologies resulted necessary to obtain detailed structural information from the enzyme.

Keywords:

Aggregation / ALS / Mass spectrometry / Metalloprotein

DOI 10.1002/elps.201100672

1 Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and its hereditary form, familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS), are fatal neurodegenerative diseases characterized by progressive motor neuron loss. The majority of ALS cases are sporadic while approximately 10% are inherited [1–7]. Only a subset of these FALS cases are caused by mutations in the amino acid se-

quence of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD-1), an ubiquitous enzyme involved in protecting cells from oxidative damage [1–10]. In addition to this differential fact, as in many neurodegenerative disorders, including Huntington's, Alzheimer's, Parkinson's, and Prion diseases, protein aggregates in motor neurons are a key pathological feature in all the ALS forms [4–7]. Understanding the aggregation of SOD-1 would have important implications on the development of novel therapeutics for ALS. In this sense, several authors have proposed the existence of a common aggregation pathway for FALS and sporadic ALS based on dissociation of SOD-1 to monomers [4–7]. In addition, the presence or abundance of certain posttranslational modifications in human SOD-1 might have similar effects to mutations in some of the FALS cases [3, 4].

The structure of SOD-1 is very similar in different species. The native enzyme is a homodimer of approximately 32 kDa that coordinates one Cu²⁺ and one Zn²⁺ per monomer (Cu₂Zn₂-dimer SOD-1). Dimer formation is

Correspondence: Dr. Victoria Sanz-Nebot, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

E-mail: vsanz@ub.edu

Fax: +34-934021233

Abbreviations: ALS, amyotrophic lateral sclerosis; BPE, base peak electropherogram; FALS, familial amyotrophic lateral sclerosis; HAc, acetic acid; SOD-1, Cu,Zn-superoxide dismutase

essential for SOD-1 function. While copper ion plays a crucial role in enzyme activity, zinc ion contributes to structural stability [11]. MALDI-TOF-MS, ESI-MS and especially LC-MS have been the techniques of choice for the analysis of SOD-1 due to the possibility of identifying different protein isoforms (i.e. acetylated, phosphorylated, or glutathionylated forms in human SOD-1) or mutations in the amino acid sequence [1–4, 11–14]. However, the required analytical conditions promoted the partial or total loss of the metal ions from the enzyme structure due to low pH, oxidation, treatment with chelating or chaotropic agents, etc., leading to the metal deficient forms, mostly the apo-monomer [1–4, 6, 7, 11–14]. Although this is not a limiting factor when the aim is to obtain a molecular mass to identify mutations of human SOD-1, which involve differences at the sequence level [1–4, 11–14]. CE-MS using ESI or MALDI interfaces is an excellent alternative to analyze proteins, when analyte adsorption to the inner surface of fused-silica capillaries is prevented [1–19]. We have recently proposed some methods for the analysis of bovine SOD-1 by CE-ESI MS with an ion-trap mass spectrometer (CE-IT-MS) [14]. One of the methods was using nondenaturing conditions for separation, detection, and identification of the dimeric fully metalated native form of the bovine enzyme or any monomeric, dimeric, apo-, or metalated intermediate form. In this work, we will apply these CE-MS methodologies for the analysis of standard bovine SOD-1 and SOD-1 purified from human erythrocytes using an accurate mass and high-resolution time-of-flight mass spectrometer (CE-TOF-MS) [19,20]. Our aim is to demonstrate, on one hand, that under acidic conditions CE-TOF-MS may be regarded as an excellent tool to map the posttranslational modifications of human SOD-1 and, on the other hand, that under nondenaturing conditions it may be useful to identify and quantify the native form of the enzyme and the potential intermediates that could be involved in triggering SOD-1 aggregation in ALS.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All chemicals used in the preparation of buffers, BGEs, and solutions were of analytical reagent grade. Formic acid (FA), acetic acid (HAc) (glacial), TFA, sodium hydroxide (pellets), ammonia (25%), ethanol, chloroform, acetone, potassium dihydrogen phosphate anhydrous (99.5%) (KH_2PO_4), potassium monohydrogen phosphate anhydrous (99.5%), orthophosphoric acid (85%), and 2-propanol (iPrOH) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride was provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). SOD-1 from bovine erythrocytes (>97%) and ammonium acetate (NH_4Ac) were supplied by Fluka (Madrid, Spain). Water with a conductivity value lower than $0.05 \mu\text{S}/\text{cm}$ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France). ESI low concentration (ESI-L) tuning mix for tuning and calibration of the TOF mass spectrometer was supplied by Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

2.2 Background electrolyte, sheath liquid, and standard bovine SOD-1 solutions

The compositions of the BGE and sheath liquid solution were optimized in a previous work for the analysis of bovine SOD-1 by CE-IT-MS [14]. The BGEs contained 1 M HAc (measured pH was 2.3) or 10 mM NH_4Ac (pH 7.3). In this last case, the quantity of NH_4Ac necessary to prepare 100 mL of a 10 mM solution was weighed and dissolved in 90 mL of water. Then, pH was adjusted to pH 7.3 with NH_3 before making up solution to the final 100 mL volume. Both BGEs were filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA) before use. The sheath liquid solution was a hydroorganic mixture of 60:40 v/v iPrOH/water containing 0.5 % v/v of FA. It was degassed by sonication (10 min) before use.

The commercial SOD-1 from bovine erythrocytes appeared to be by CE-IT-MS a mixture of the metalated dimeric and monomeric forms (Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and Cu_2Zn -monomer SOD-1) [14]. As an example, the average molecular mass of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 ($M = 31\,432.1 \text{ Da}$, Table 1) was calculated using mmass software (<http://www.mmass.org>, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, [21]) as apo-SOD-1 ($M = 15\,591.2 \text{ Da}$, Table 1, taking into account the amino acid sequence and an acetyl group) + $2 \text{ Zn}^{2+} + 2 \text{ Cu}^{2+} - 8 \text{ H}^+$ [11, 14, 21, 22]. The $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ solutions of apo-SOD-1 were obtained removing Cu^{2+} and Zn^{2+} by acidification with TFA and diafiltration using Microcon YM-10 centrifugal devices (MWCO 10 000 Da) (Millipore, Beverly, MA, USA) [14]. The solution of the commercial enzyme was obtained by diafiltrating a $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ solution of the commercial sample using the same procedure but without the addition of TFA. Both bovine SOD-1 samples were analyzed by CE-TOF-MS.

2.3 Instrumentation

All CE-TOF-MS experiments were performed in a $\text{HP}^{3\text{D}}$ CE system (Agilent Technologies) coupled to a 6220 oa-TOF LC/MS mass spectrometer (Agilent technologies) with a dual-nebulizer ESI source. The orthogonal nebulizer was a G1603A sheath-flow interface for CE-MS (Agilent Technologies) [23]. The sheath liquid was delivered at a flow rate of $3.3 \mu\text{L}/\text{min}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump (KD Scientific, Holliston, MA). CE control and separation data acquisition (e.g. voltage, temperature, and current) were performed using ChemStation software (Agilent Technologies) that was running in combination with the MassHunter workstation software (Agilent Technologies) for control, data acquisition, and analysis of the TOF mass spectrometer. m/z mass spectra were deconvoluted to obtain molecular mass values and abundances using an algorithm based on the method of maximum entropy to find the simplest zero charge mass spectra that could account for the observed m/z data.

The CE separation was performed in a $50 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ id fused-silica capillary (Polymicro Technologies Phoenix, AZ, USA) at 25°C fitted in a CE-MS cartridge cassette (Agilent

Table 1. Theoretical average molecular mass values of bovine and human SOD-1 isoforms detected by CE-TOF-MS.

	Bovine SOD-1			Human SOD-1					
	Apo	Metalated		Apo			Metalated		
PTM	1 acetyl	1 acetyl		1 acetyl	3 acetyl	1 acetyl + 1 phosphate	1 acetyl + 1 glutathione	1 acetyl	1 acetyl
Structure	a-Mo	Mo (Cu,Zn)	DI (Cu ₂ Zn ₂)	a-Mo	a-Mo	a-Mo	a-Mo	Mo (Cu,Zn)	DI (Cu ₂ Zn ₂)
M	15 591.2	15 716.1	31 432.1	15 844.6	15 928.5	15 942.4	16 149.7	15 969.5	31 939.1

The native forms of bovine and human SOD-1 enzymes have some differences in the amino acid sequence and posttranslational modifications [33, 34]. (PTM: posttranslational modification, M: molecular mass, a-Mo: apo-monomer, Mo: monomer, and DI: dimer).

Technologies). A new capillary was set every time the BGE pH was changed. Methods for storage, activation, conditioning between workdays, runs or after a change of BGE were as described in our previous work with CE-IT-MS [14]. Samples were injected at 50 mbar for 10 s without turning off the nebulizing gas and separation voltage was 15 kV (normal polarity) (current intensity was lower than 10 μ A in both cases). The working BGE was refreshed after every analysis to ensure optimum repeatability [14].

Unless otherwise indicated, the TOF mass spectrometer was operated under optimum conditions in positive mode using the following parameters: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 200°C or 300°C, for the acidic and the neutral BGEs, respectively, drying gas flow rate 4 L/min, nebulizer gas 7 psig, fragmentor voltage in the range between 250 and 325 V, skimmer voltage 80 V, OCT 1 RF Vpp voltage 300 V. Data were collected in profile (continuum) at 1 spectrum/s (approximately 10 000 transients/spectrum) between m/z 100 and 3200 working with the mass range set to standard (3200 m/z) in the extended dynamic range (2 GHz) and high resolution (4 GHz) modes. In both cases, the reference mass correction for internal mass recalibration was disabled for all the experiments, but a standard tune and external calibration was performed daily at the beginning of the day following the manufacturer instructions using the typical LC-MS sprayer and ESI-L tuning mix (Agilent Technologies) [23].

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA). Centrifugations were carried out in a Mikro 20 centrifuge with a 2073 rotor and in a cooled Rotanta 460 centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) for centrifugations at room temperature and at controlled temperature, respectively.

2.4 Procedures

2.4.1 Human SOD-1 purification

Fresh blood from a healthy donor (female, 25-years old) was obtained by venipuncture and was collected in 4 mL BD Vacutainer Plus Plastic K₂EDTA tubes (Franklin Lakes, NJ, USA) to prevent coagulation. Potassium phosphate buffer (PBS)

was prepared weighting enough KH₂PO₄ and K₂HPO₄ to prepare 500 mL of a 0.565 mM of KH₂PO₄ and 1.935 mM of K₂HPO₄ solution. Then, 490 mL of water were added and pH was adjusted to 7.4 with H₃PO₄ before making up to the final 500 mL volume.

Human SOD-1 was purified from blood combining and adapting different parts of several methods described in the literature [24–27]. Four milliliters of blood were processed at a time. The plasma was separated after centrifuging the blood at 3700 rpm for 10 min at 4°C. Erythrocytes were washed three times by centrifugation with 2 mL of cold 0.1 M NaCl at 4300 rpm for 5 min at 4°C. Then, they were lysed with 6 mL of cold water. Hemoglobin was removed using a treatment with EtOH and CHCl₃ [24–29]. The temperature was maintained at 0°C by means of an ice-water bath while 2.7 mL of cold EtOH were added to the lysate with adequate stirring. Then, 1.5 mL of cold CHCl₃ were added to the mixture, mixing for 30 min to render hemoglobin insoluble [24]. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The resulting clear supernatant (approximately 9 mL) was maintained overnight at 4°C in the refrigerator. Then, it was allowed to warm at room temperature and 2.9 g of solid K₂HPO₄ were added with vigorous stirring resulting in the separation of two liquid phases [24]. The organic upper phase containing SOD-1 was collected after centrifuging the mixture at 2100 rpm for 10 min at 25°C (approximately 4 mL). This solution was cooled at 4°C in the refrigerator and 3 mL of cold acetone were added to precipitate SOD-1 [24]. The mixture was incubated for 30 min at 4°C with occasional manual shaking. Then, the precipitate was separated by centrifugation at 4300 rpm for 10 min at 25°C. This precipitate was finally dissolved in 7 mL of PBS. The SOD-1 solution was desalted and pre-concentrated at room temperature using Amicon Ultra-10 centrifugal devices (MWCO 10 000 Da) (Millipore, Beverly, MA, USA) [14, 26]. The procedure was similar to the one previously described for commercial bovine SOD-1 using Microcon YM-10 centrifugal devices but without the addition of TFA [14]. It consisted of four consecutive washing steps with PBS (7 mL \times 1) and water (1 mL \times 3) at 4300 rpm and 4°C. The final volume was adjusted to around 250 μ L. The human SOD-1 concentrated solution was analyzed by CE-TOF-MS. In the case of neutral BGE, a further concentration was needed using Microcon YM-10 centrifugal devices and volume of the previous sample was reduced until 50 μ L. The average molecular mass values

of human SOD-1 forms were calculated as indicated above for bovine apo-SOD-1 (Table 1). Samples were stored at 4°C when not in use.

2.4.2 CE-TOF-MS of SOD proteins

Using the CE-TOF-MS setup, the parameters of the TOF mass spectrometer were specifically tuned for the ions of bovine Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 and apo-SOD-1. The 2 mg/mL solutions of each protein were delivered through the CE separation capillary at 50 mbar for infusion experiments and the mass spectrometer parameters were monitored to get the maximum signal intensity for the ions of both proteins. The parameter values obtained in this way are reported above in Section 2.3 and were later confirmed running different CE-TOF-MS separations. Under optimum conditions, base peak electropherograms (BPEs) were showing the best compromise in terms of CE run times, separation resolution, peak shape, and height (or S/N ratios). Mass accuracy was calculated in ppm as $|M_{\text{experimental}} - M_{\text{theoretical}}| / M_{\text{theoretical}} \times 10^6$ [20].

3 Results and discussion

3.1 CE-TOF-MS of bovine SOD-1

In a previous investigation, we developed CE-MS methodologies for the analysis of bovine SOD-1 using an IT mass spectrometer [14]. Now, these methods were evaluated with a TOF mass spectrometer. Although the use of CE-TOF-MS is becoming popular for the analysis of peptides and proteins [19, 20, 23], it is difficult to find in the literature clear descriptions about the essential specific factors involved in the performance of CE-TOF-MS, especially when complex proteins are involved [23].

The CE-TOF-MS experiments were run in positive ESI mode with 1 M HAc (pH 2.3) and 10 mM NH₄Ac (pH 7.3) BGEs [14]. Thus, while the acidic BGE has increased volatility and allowed only detection of bovine apo-SOD-1, the neutral BGE was more suitable to identify Cu,Zn-monomer and the Cu₂Zn₂-dimer SOD-1. One of the greatest properties of the TOF mass spectrometer apart from its high mass accuracy and resolution, is the ability to detect ions with m/z values up to higher m/z values than other analyzers [19, 20]. A wide m/z scanning range is useful when the cluster of multicharged ions of the studied protein is displaced to high m/z values, as expected for Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 using the neutral BGE. In our previous work, the IT analyzer was able to scan up to 3000 m/z allowing only detection of +12 (2620 m/z) and +11 (2858 m/z) ions of bovine Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 [14]. In our preliminary CE-TOF-MS experiments with commercial bovine SOD-1 and neutral BGE the scanning range was extended until 4500 m/z that required decreasing the mass spectra resolution to the minimum (minimum storage size [1 GHz]). Under these conditions, +12 (2620 m/z), +11 (2858 m/z), and +10 (3144

m/z) were the ions with the highest intensity of the bovine Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 cluster, while +9 (3494 m/z) and +8 (3930 m/z) ions were detected with extremely low intensity (lower than 1% of the intensity of +11 ion). As the main ions, +12, +11, and +10, could be detected scanning until 3200 m/z values at higher resolution (2 GHz or 4 GHz in extended dynamic range or high resolution modes, respectively), the rest of the experiments were performed using these high-resolution modes. The BPEs obtained by CE-TOF-MS for the different bovine SOD-1 samples using both BGEs were similar to those previously obtained by CE-IT-MS, with a single main peak corresponding to the protein (data not shown) [14].

Regarding other TOF mass spec parameters, the fragmentor voltage value was showing the greatest influence on SOD-1 m/z spectra [23]. Figure 1A–F shows the m/z spectra of the detected electrophoretic protein peaks at different fragmentor voltage values together with the molecular mass values obtained after deconvolution for bovine apo-SOD-1 and commercial bovine SOD-1 samples using the neutral BGE. As can be observed from Fig. 1A, C, and E the appearance of the apo-SOD-1 m/z spectra was similar but the intensity of the molecular ions was higher at the lowest fragmentor voltage value (275 V). This decrease in peak height of the ions when the fragmentor voltage value was increased could be directly related to in-source collision-induced dissociation (i.e. fragmentation) of the protein, as previously observed with other molecules, such as pesticides, antibiotics, and peptides [23, 30–32]. In all cases, the m/z spectra allowed the calculation of a molecular mass of around 15 591.7, very close to the theoretical molecular mass of the monomeric apo-SOD-1 (a-Mo), which bears an acetyl group (15 591.2, Table 1). The mass accuracy was excellent (around 30 ppm), 25-fold better than in our previous work with CE-IT-MS [14]. A careful analysis of the cluster of multiply charged ions obtained in the m/z spectra of commercial SOD-1 indicated the presence of Cu,Zn-monomer SOD-1 and Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 (Mo and DI, Fig. 1B, D, and F). Thus, as indicated in the different ion labels of Fig. 1B, D, and F, the ions with nominal m/z values 2620 and 3144 were the summed contribution of the Cu,Zn-monomer SOD-1 (Mo) and the Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 (DI), while the ions of 2246 and 2858 m/z were exclusively detected for the Cu,Zn-monomer SOD-1 and the Cu₂Zn₂-dimer SOD-1, respectively (+14 DI, was necessarily missing because +13 DI was not detected). The molecular mass values calculated were around the theoretical values expected for those metalated forms (31 432.1 Da and 15 716.1 Da, respectively, Table 1). The explanation of the influence of the fragmentor voltage value on the mass spectra is more complex now. As can be observed, when the fragmentor voltage value was changed from 275 up to 325 V (Fig. 1B, D, and F) the intensity of the ions with m/z 2620 and 3144 clearly increased while only the intensity of the ion with m/z 2858 decreased. That means that part of the Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 was converted to Cu,Zn-monomer SOD-1 due to in-source fragmentation.

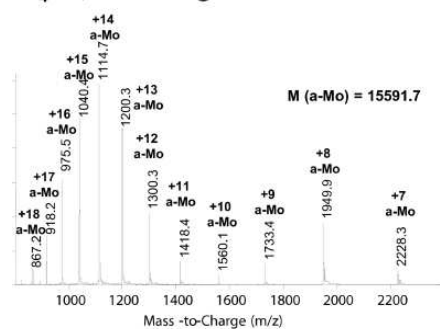
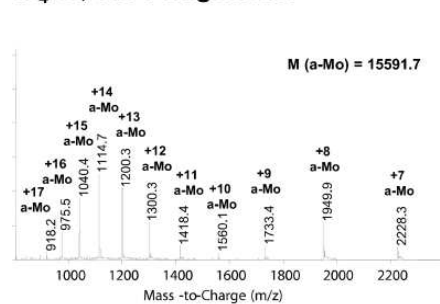
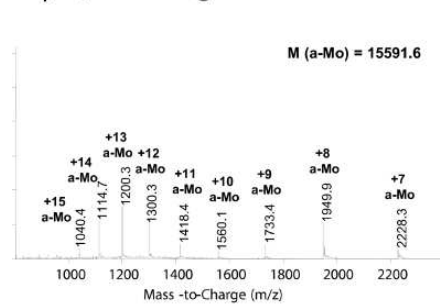
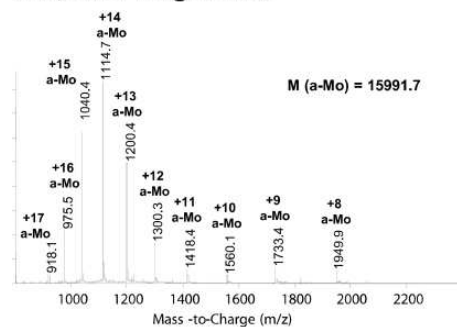
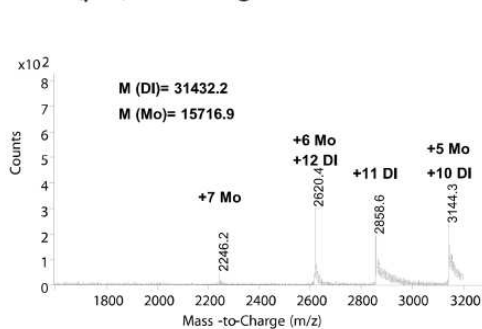
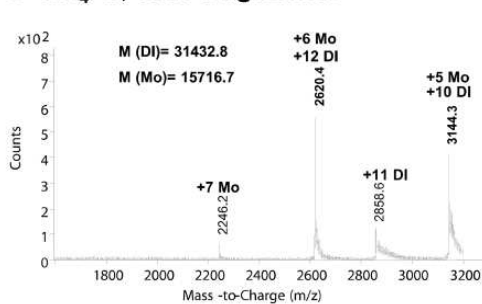
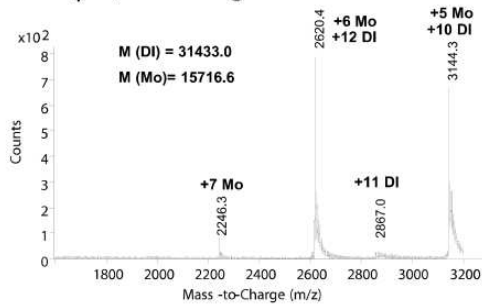
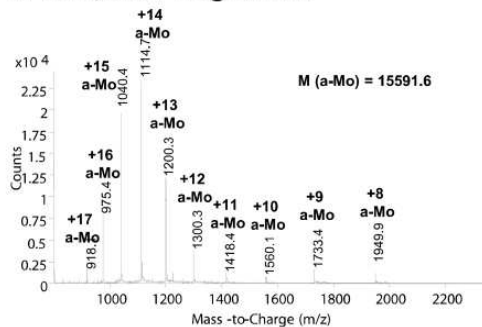
Apo-SOD-1**A** NH₄Ac, 275V fragmentor**B** NH₄Ac, 325V fragmentor**C** NH₄Ac, 375V fragmentor**G** HAC, 325V fragmentor**Commercial bovine SOD -1****B** NH₄Ac, 275V fragmentor**D** NH₄Ac, 325V fragmentor**F** NH₄Ac, 375V fragmentor**H** HAC, 325V fragmentor

Figure 1. Mass spectra of bovine apo-SOD-1 and commercial SOD-1 samples using a BGE of (A–F) 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, adjusted with and (G and H) 1 M HAC (pH 2.3) in CE-TOF-MS at different fragmentor voltage values. (a-Mo = apo-monomer, Mo = monomer and dimer).

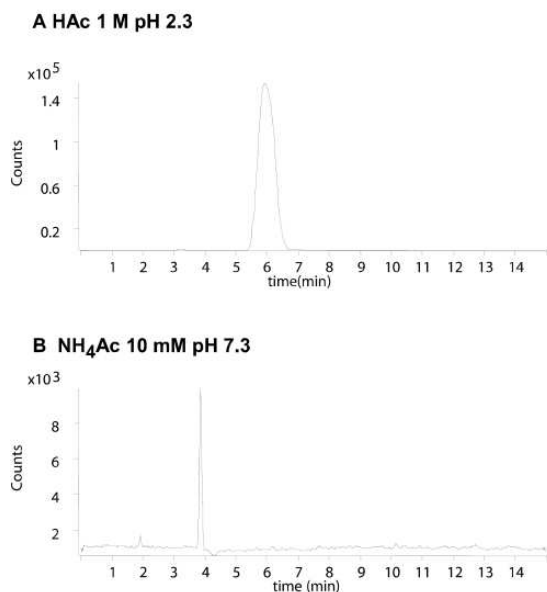


Figure 2. CE-TOF-MS BPEs (from 900 to 3200 m/z) for a human SOD-1 sample at 325 V of fragmentor voltage value using a BGE of (A) 1 M HAc (pH 2.3) and (B) 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, adjusted with NH₃).

With regard to the influence of the BGE on the detected bovine SOD-1 species, Fig. 1G and H show the m/z spectra together with the molecular mass values obtained by CE-TOF-MS with the acidic BGE for bovine apo-SOD-1 and commercial bovine SOD-1 samples, respectively. As expected, sensitivity was better than with the neutral BGE because of the lower pH and improved volatility of 1 M HAc. However, both m/z spectra allowed the calculation of a molecular mass that agrees with the theoretical molecular mass of the monomeric apo-SOD-1 (a-Mo) (15 591.2, Table 1), thereby indicating that the metals were released from the Cu₂Zn₂-dimer and Cu,Zn-monomer SOD-1 when the acidic BGE was used for the electrophoretic separation.

3.2 CE-TOF-MS of human SOD-1

The results for bovine SOD-1 were the starting point to analyze SOD-1 from human erythrocytes. Figure 2A and B shows the BPEs obtained with the acidic and neutral BGEs, respectively. The electrophoretic profiles were similar to those that were obtained for bovine SOD-1 by CE-TOF-MS or CE-IT-MS [14]. The electropherograms show a broad single peak in the acidic BGE (Fig. 2A) while in the neutral BGE the single peak was sharper (Fig. 2B). This focusing effect at neutral pH could be explained by a dynamic pH junction mechanism, as human SOD-1 sample was injected in water instead of the BGE. Repeatability was good at both pH values, because protein adsorption was prevented due to the appropriate balance between silanol and protein ionization

at both pH values (SOD-1 $pI \approx 5$) [14]. At neutral pH, analysis time was slightly lower because the higher cathodic EOF transported faster the anionic SOD-1 toward the detector. The m/z spectra of the detected peaks together with the deconvoluted zero charge spectra can be found in Fig. 3. According to the results for commercial bovine SOD-1, the m/z spectra for human SOD-1 were completely different for both BGEs (Fig. 3A and B). With the acidic BGE the metals were released from the native enzyme and the m/z spectrum corresponded to the different monomeric apo-SOD-1 isoforms (a-Mo, Fig. 3A). The excellent mass accuracy and resolution on the m/z spectrum of Fig. 3A allowed deconvolution of a zero-charge spectrum showing the peaks corresponding to different isoforms of the protein at 15 844.8, 15 928.8, 15 943.0, and 16 150.0 Da (Fig. 3A-i). The main isoform ($M_{exp} = 15 844.8$ Da) corresponded to the apo-monomer-SOD-1 sequence ($M = 15 804.6$ Da) [1–4] (Swiss-Prot Protein knowledgebase, 2011, <http://www.uniprot.org/uniprot/P00441>. The Association of Biomolecular Resource Facilities, 2011, <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>) with an acetylation (+42.0 Da) (Swiss-Prot Protein knowledgebase) and a disulfide bond (–2.0 Da) ($M = 15 844.6$, Table 1) (The Association of Biomolecular Resource Facilities). In the rest of cases, the main isoform was further modified with two extra acetyl groups ($M_{exp} = 15 928.8$ Da, +84.0 Da), an hydrated phosphate group ($M_{exp} = 15 943.0$ Da, +98.0 Da) and a glutathione group ($M_{exp} = 16 150.0$ Da, +305.0 Da) (Table 1). All these isoforms were previously described in the literature for human apo-monomer-SOD-1 using different analytical techniques [1–4, 12, 13] (Swiss-Prot Protein knowledgebase). With the neutral BGE we expected to detect the metalated forms of the human enzyme. The m/z spectrum corresponding to the detected peak in the electropherogram with NH₄Ac (pH 7.3) of Fig. 2B is shown in Fig. 3B. In addition to the cluster of multiply charged ions of the Cu,Zn-monomer SOD-1 (Mo) and Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 (DI), there was another at lower m/z values corresponding to a major protein impurity (labeled as UBI). This protein impurity, which comigrated with the metalated forms of the enzyme at neutral pH, was not detected with the acidic BGE. The deconvoluted zero-charge spectrum of Fig. 3B-i shows a main molecular mass of 8565.1 Da that could correspond to ubiquitin (UBI, $M_{theo} = 8564.7$ Da, without posttranslational modifications), a small protein of 76 amino acids present in almost all tissues of eukaryotic organisms, which is involved in protein degradation [33]. The minor peak of 8451.0 Da was in good agreement with a truncated ubiquitin that resulted after the cleavage of the C-terminus segment 75–76 (Gly-Gly) ($M_{theo} = 8450.6$ Da). The zero-charge spectra deconvoluted for Cu,Zn-monomer SOD-1 and Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 (Fig. 3B-ii and B-iii, respectively) show a molecular mass of 15 969.8 and 31 938.8 together with an adduct with sodium ions (+Na = 22.0 or +2Na = 44.0 Da, respectively). Both experimental molecular values are in good agreement with the fully metalated monomeric and dimeric forms of the human enzyme, acetylated, and with a disulfide bond ($M = 15 969.5$ Da and $M = 31 939.1$ Da, respectively, Table 1). No other isoforms were detected due to the lower

A HAc, 325V fragmentor

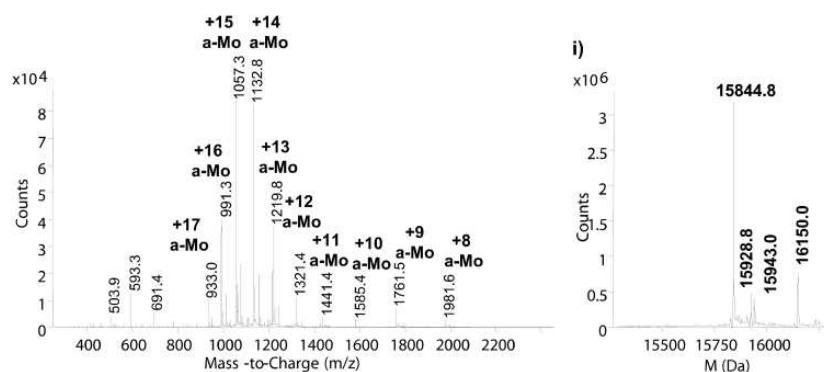
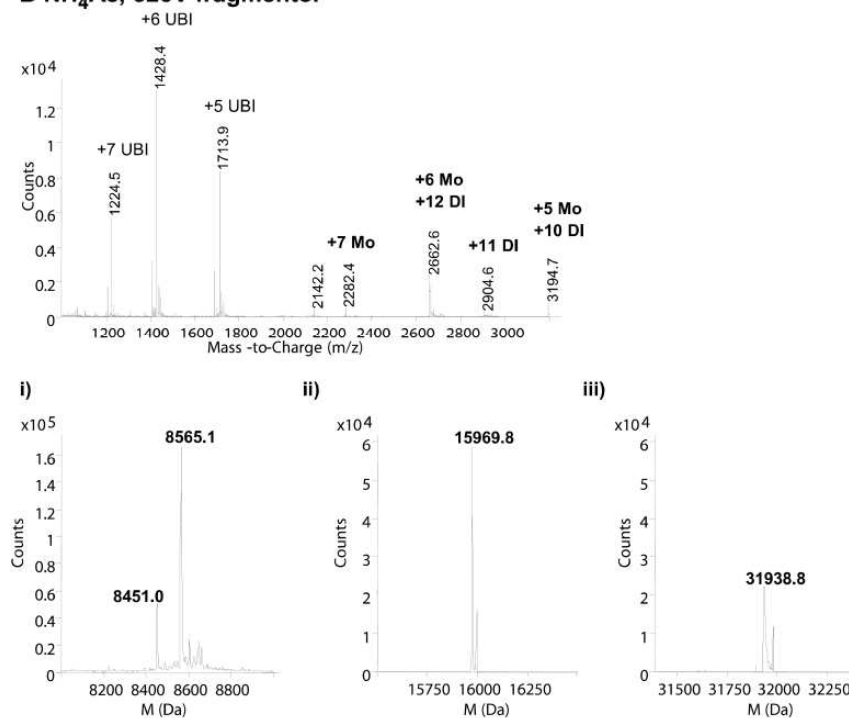
B NH₄Ac, 325V fragmentor

Figure 3. Mass spectra of human SOD-1 using a BGE of (A) 1 M HAc (pH 2.3) and (B) 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, adjusted with NH₃) in CE-TOF-MS at a fragmentor voltage value of 325 V. i, ii, and iii) deconvoluted mass spectra. (a-Mo = apo-monomer, Mo = monomer, and DI = dimer).

sensitivity at neutral pH, which also contributed to the generation of the sodiated protein ions. Results were similar with other samples from healthy blood donors (data not shown). With regard to the influence of the fragmentor voltage value on detection of the main monomeric or dimeric metalated isoforms of human SOD-1, Fig. 4A shows a bar graph with the ratio between the intensity of the ions with nominal m/z values 2282 and 2905 as a function of the fragmentor voltage value. This ratio was useful to evaluate the conversion of Cu₂Zn₂-dimer SOD-1 to Cu,Zn-monomer SOD-1 due to in-source fragmentation, because these ions were exclusive of the monomer (2282) and the dimer (2905) (see Fig. 3B). As

it can be seen, when fragmentor voltage value was changed from 250 to 375 V the proportion of the monomer relative to the dimer increased, suggesting in-source dissociation. Fragmentation was maximum at 375 V and did not further increase at 450 V. These results were in agreement with those obtained for bovine SOD-1. The mass spectra of human SOD-1 at different fragmentor voltage values (Fig. 4B, C, and D) gave a better overview of the effect on the overall m/z spectra, especially on the ions with nominal m/z values 2663 and 3195 that accounted for both, the monomer and the dimer. These results again support the idea that the fragmentor voltage value was a critical factor to take into account in order

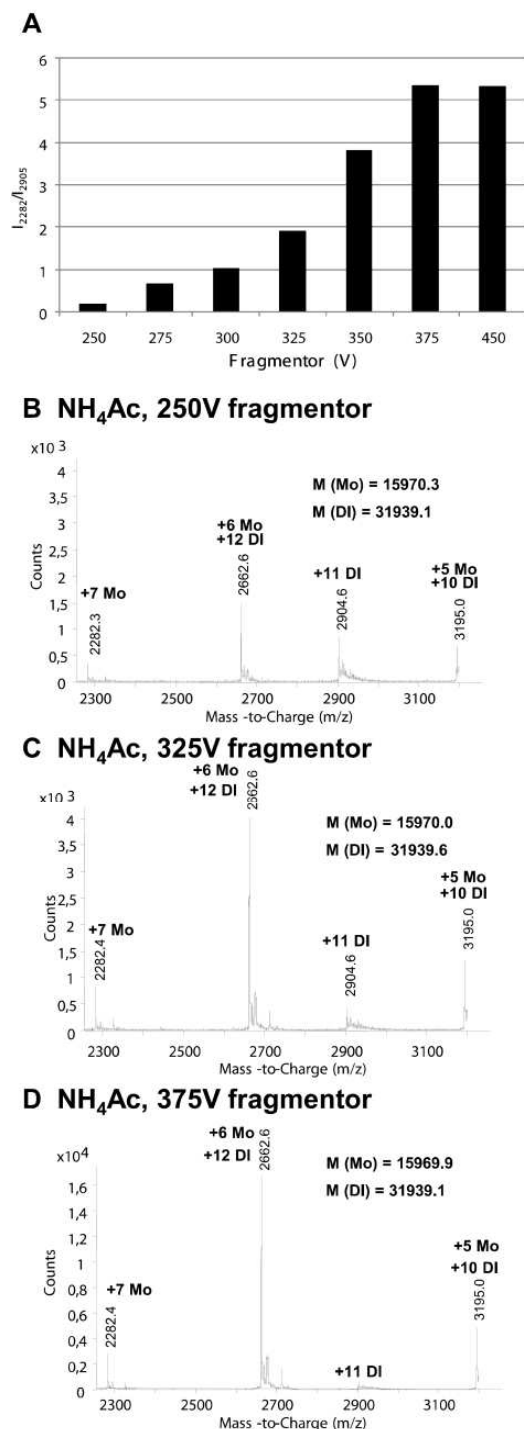


Figure 4. (A) Bar graph of the ratio between the intensity of the ions with nominal m/z values 2282 and 2905 of human SOD-1 at different fragmentor voltage values. (B) Mass spectra of human SOD-1 samples using a BGE of 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, adjusted with NH₃) at a fragmentor voltage value of 250 V (B), 325 V (C), and 375 V (D). (Mo = monomer and DI = dimer).

to obtain reliable quantitative information about both metalated forms of the enzyme. In general, it would be advisable to select the lowest fragmentor voltage value providing enough detection sensitivity, in this case 250 V.

4 Concluding remarks

We have confirmed that CE-TOF-MS is a better choice than CE-IT-MS for the analysis of bovine SOD-1 and human SOD-1, due to the wider scanning range and the improved mass accuracy and resolution of the TOF analyzer. The acidic BGE allowed detection of apo-monomer SOD-1, because the metal ions were completely released during the electrophoretic separation. Meanwhile, the neutral BGE made it possible to detect the fully metalated dimeric and monomeric enzymes. In this last case, selection of an appropriate fragmentor voltage value was of special interest to minimize in-source dimer dissociation, which would preclude reliable quantitative information about the abundance of the metalated forms. Both CE-TOF-MS methodologies provided complementary structural information. The better sensitivity with the acidic BGE led to detection of different isoforms of human SOD-1. In contrast, only the main isoform of the fully metalated dimeric and monomeric human enzyme was detected with the neutral BGE. The combination of both methodologies may be regarded as an excellent alternative tool to the existing analytical methods for SOD-1 based in ESI-MS and LC-MS. It has the potential to gain insight into the molecular mechanisms of aggregation underlying in ALS related to posttranslational modifications or monomerization.

Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU). M. Borges-Alvarez acknowledges the Spanish Ministry of Education and Science for a FPU (Formación del Profesorado Universitario) fellowship. We thank N. Martínez-Gijón for her helpful assistance in blood sample collection.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Nakanishi, T., Kishikawa, M., Miyazaki, A., Shimizu, A., Ogawa, Y., Sakoda, S., Ohi, T., Shoji, H. *J. Neurosci. Methods* 1998, **81**, 41–44.
- [2] Sato, T., Yamamoto, Y., Nakanishi, T., Fukada, K., Sugai, F., Zhou, Z., Okuno, T., Nagano, S., Hirata, S., Shimizu, A., Sakoda, S. *J. Neurol. Sci.* 2004, **218**, 79–83.
- [3] Saraswathi, M., Nakanishi, T., Shimizu, A., *Biochim. Biophys. Acta* 1999, **1426**, 483–490.
- [4] Wilcox, K. C., Zhou, L., Jordon, J. K., Huang, Y., Yui, Y., Redler, R. L., Chen, X., Caplow, M., Dokholyan, N. V., *J. Biol. Chem.* 2009, **284**, 13940–13947.
- [5] Doucette, P. A., Whitson, L. J., Cao, X., Shirf, V., Demeler, B., Valentine, J. S., Hansen, J. C., Hart, P. J., *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 54558–54566.

- [6] Rakhit, R., Crow, J.P., Lepock, J.R., Kondejewski, L. H., Cashman, N. R., Chakrabarty, A., *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 15499–15504.
- [7] Banci, L., Bertini, I., Durazo, A., Girotto, S., Gralla, E. B., Martinelli, M., Valentine, J. S., Vieru, M., Whitelegge, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, **104**, 11263–11267.
- [8] Jiang, W., Shen, T., Han, Y., Pan, Q., Liu, C., *J. Biol. Inorg. Chem.* 2006, **11**, 835–848.
- [9] Fridovich, I., *J. Biol. Chem.* 1989, **264**, 7761–7764.
- [10] Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G., *Crit. Rev. Biochem.* 1987, **22**, 111–180.
- [11] Yamazaki, Y., Takao, T., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 8246–8252.
- [12] Shimizu, A., Nakanishi, T., Kishikawa, M., Miyazaki, A., *J. Chromatogr. B* 2002, **776**, 15–30.
- [13] Shimizu, A., Nakanishi, T., Miyazaki, A., *Mass Spectrom. Rev.* 2006, **25**, 686–712.
- [14] Borges-Alvarez, M., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2010, **24**, 1411–1418.
- [15] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, **31**, 174–191.
- [16] Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2008, **29**, 2161–2170.
- [17] Huck, C., Bakry, R., Huber, L. A., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 2006, **27**, 2063–2074.
- [18] Bachmann, S., Vallant, R., Bakry, R., Huck, C. W., Corradini, D., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 2010, **31**, 618–629.
- [19] Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *Electrophoresis* 2009, **30**, 1610–1623.
- [20] Webb, K., Bristow, T., Sargent, M., Stein, B., *Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules, Best Practice Guide*, 1st edn, LGC Limited, Teddington, UK 2004.
- [21] Strohalm, M., Hassman, M., Kosata, B., Kodíček, M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, **22**, 905–908.
- [22] Steinman, H. M., Naik, V. R., Abernethy, J. L., Hill, R. L., *J. Biol. Chem.* 1974, **249**, 7326–7338.
- [23] Borges-Alvarez, M., Benavente, F., Giménez, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Sep. Sci.* 2010, **33**, 2489–2498.
- [24] Djalali, M., Abtahi, H., Sadeghi, M. R., Negahdar, M., Layegh, H., Farzami, B., Fatehi, F., *Iranian J. Publ. Health* 2005, **34**, 58–66.
- [25] Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y., *Clin. Chem.* 1988, **34**, 497–500.
- [26] Nuevo-Ordoñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., *Anal. Chem.* 2010, **82**, 2387–2394.
- [27] Bannister, J., Bannister, W., Wood, E., *Eur. J. Biochem.* 1971, **18**, 178–186.
- [28] Casado, A., De la Torre, R., López-Fernández, E., *Indian J. Med. Res.* 2007, **125**, 655–660.
- [29] Lan-Kai-Wei, *Free Rad. Res. Comms.* 1991, **12–13**, 759–760.
- [30] Poletini, A., Gottardo, R., Pascali, J. P., Tagliaro, F., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 3050–3057.
- [31] Ferrer, I., Thurman, E. M., Fernández-Alba, A. R., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 2818–2825.
- [32] Hermo, M. P., Barrón, D., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2008, **1201**, 1–14.
- [33] Stiuso, P., Libondi, T., Facchiano, A.M., Colicchio, P., Ferranti, P., Lilla, S., Colonna, G., *FEBS Lett.* 2002, **531**, 162–167.

CAPÍTOL 5. ANÀLISI DE SOD-1 PER n-ESI-IM-MS

Un dels inconvenients més grans de l'ESI-MS quan s'analitzen proteïnes oligomèriques com la SOD-1, és que no pot distingir entre ions de la mateixa m/z pertanyents al monòmer i al dímer. Això dificulta la interpretació de la informació obtinguda quan una proteïna existeix com a mescla de monòmers, dímers o d'altres oligòmers, perquè fins a cert punt els diferents espectres de masses es troben superposats. A més, la impossibilitat de separar les diferents formes de la proteïna abans de la detecció per MS suposa una dificultat afegida. En aquest sentit, la IM-MS és una tècnica que afegeix de forma efectiva una dimensió de separació addicional, ja que permet separar ions en fase gas en funció aproximadament de la seva relació mida-càrrega i posteriorment obtenir els seus espectres de masses. En l'actualitat, s'utilitzen interfases de tipus n-ESI que, entre d'altres avantatges, permeten analitzar volums molt petits de mostra en tampons aquosos neutres i preservar encara més l'estructura proteica. La n-ESI-IM-MS és una de les millors alternatives per avaluar tot tipus d'interaccions no covalents en complexos proteics o bé caracteritzar isòmers, confòrmers o oligòmers de diferents mides.

En aquest capítol s'han establert les condicions òptimes per a caracteritzar la SOD-1 bovina i humana mitjançant n-ESI-IM-MS. L'objectiu fonamental és obtenir informació rellevant sobre la presència de la forma monomèrica i dimèrica de la proteïna, per avaluar el potencial d'aquesta tècnica en l'estudi de malalties neurodegeneratives caracteritzades per la formació d'agregats proteics, com l'ALS.

El treball realitzat ha conduït a la següent publicació:

- Characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) by electrospray ionization-ion mobility mass spectrometry. **Borges-Alvarez M., Benavente F., Vilaseca M. Barbosa J., Sanz-Nebot V.** J Mass Spectrom. (2012) Acceptat.

Article 5.1.

Characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) by electrospray ionization-ion mobility mass spectrometry

M. Borges-Alvarez^a, F. Benavente^{a*}, M. Vilaseca^b, J. Barbosa^a, V. Sanz-Nebot^a

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

^bInstitute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain.

*Corresponding author: fbenavente@ub.edu, (+34) 934 039 123, Fax (+34) 934 021 233.

In this paper, we report nano-electrospray ionization-ion mobility mass spectrometry (nano-ESI-IM-MS) characterization of bovine superoxide dismutase (SOD-1) and human SOD-1 purified from erythrocytes. SOD-1 aggregates are characteristic of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative disease in humans that could be triggered by dissociation of the native dimeric enzyme (Cu₂Zn₂-dimer SOD-1). In contrast to ESI-MS, nano-ESI-IM-MS allowed an extra dimension for ion separation, yielding three-way mass spectra (drift time, mass-to-charge ratio, and intensity). Drift time provided valuable structural information related to ion size, which proved useful to differentiate between the dimeric and monomeric forms of SOD-1 under non denaturing conditions. In order to obtain detailed structural information, including the most relevant post-translational modifications (PTMs), we evaluated several parameters of the IM method, such as sample composition (10 mM ammonium acetate, pH 7) and activation voltages (trap collision energy and cone voltage). Neutral pH and a careful selection of the most appropriate activation voltages were necessary to minimize dimer dissociation, although human enzyme resulted less prone to dissociation. Under optimum conditions, a comparison between monomer-to-dimer abundance ratios of two small sets of blood samples from healthy control and ALS patients demonstrated the presence of a higher relative abundance of Cu,Zn-monomer SOD-1 in patient samples.

KEYWORDS: ALS; dimer; ion mobility; mass spectrometry; neurodegeneration; protein-protein.

Several serious neurodegenerative disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS), prion disease, Huntington's disease, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, are characterized by the aggregation of a specific protein [1-6]. In prion disease, the dimerization of cellular prion protein (PrP^C) has been reported to trigger aggregation [5]. Other authors have proposed that aggregation is generally induced by PrP^C misfolding [6]. Similarly, ALS involves a monomeric misfolded intermediate of superoxide dismutase 1 (SOD-1) [4]. Therefore, elucidation of the mechanisms behind protein folding, oligomerization and aggregation is crucial to further our understanding of these neurodegenerative diseases [6]. Several techniques have been used for this purpose, including circular dichroism (CD), electrophoresis, liquid chromatography, differential scanning calorimetry (DSC), ultracentrifugation, nuclear magnetic resonance (NMR), and mass spectrometry (MS) [1-5, 7-12]. Given its capacity to preserve non-covalent interactions of protein-ligand complexes in the gas phase under certain conditions, electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) has been widely used to study protein interactions and stoichiometry in protein complexes [13-14]. However, this technique has the drawback that it is unable to distinguish between ions with identical mass-to-charge (m/z) ratios, thus hindering the interpretation of mass spectra from mixtures of monomers, dimers or other oligomers that are usually highly overlapped [15-17]. Ion mobility (IM) spectrometry is a technique that separates gaseous ions in function of their size and charge [7, 14-15, 18-

20]. Specifically, IM spectrometry measures the time (drift time) taken for an ion to cross a region containing a background inert gas (usually N₂ and He) at a controlled pressure under the influence of a weak electric field. Drift time depends on ion-gas collisions; hence ions are separated on the basis of their ion-neutral collision cross-section (Ω), which is related to the overall shape and topology of the ion. Small ions cross first as a result of their smaller Ω . Moreover, the higher the charge of the ion, the greater the strength of the separation field, and therefore the more quickly the ion will cross the chamber. Consequently, ion mobility is often described as being proportional to collision cross-section-to-charge ratio (Ω/z) [7, 14-15, 18-20]. Electrospray ionization-ion mobility mass spectrometry (ESI-IM-MS) has been used to study small molecules, individual proteins, and intact protein complexes [7, 13-15, 18-22]. Protein complexes can be maintained intact in the gas-phase, under the reduced pressure conditions of the mass spectrometer. Furthermore, some proteins may maintain their native-like conformations [14]; however, others may adopt conformations far-removed from their native state in solution because interaction with the solvent may contribute to stabilization [21]. Therefore, it is necessary to further our understanding of the experimental parameters involved in nano-ESI-IM-MS in order to develop reliable methods for the analysis of proteins and their complexes.

Here we studied the capacity of nano-ESI-IM-MS to characterize standard bovine SOD-1 and human SOD-1 purified from erythrocytes, with the aim of gaining further insight into their monomer-dimer composition. SOD-1 is a ubiquitous enzyme involved in protecting cells from oxidative damage [2-4, 23-26]. In many species, the native form of this enzyme is a homodimer of approximately 32 kDa that coordinates one Cu^{2+} and one Zn^{2+} per monomer. SOD-1 aggregates are characteristic of ALS, but the cause of this aggregation remains unclear. As only a minor percentage of ALS cases within the familial variant can be explained by SOD-1 mutations [2-4, 23, 27-29], dimer dissociation has been proposed as the trigger of oligomerization and later aggregation [2-4]. The prevention of ALS and the development of effective treatments for this disease call for greater knowledge of the mechanisms behind SOD-1 aggregation. In general, the MS techniques used to analyse SOD-1 require analytical conditions such as low pH, which promote metal release from the enzyme structure, thus leading to metal-deficient forms, mostly the apo-monomer [2, 4, 11, 16-17, 23, 27-31]. Recently, we demonstrated that capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) at neutral pH can provide improved molecular mass information that is useful to estimate monomer-dimer composition [16-17]. With the aim of developing novel tools to separate, identify and quantify monomeric and dimeric forms of SOD-1, as well as any potential intermediates involved in triggering the oligomerization, here we evaluated the capacity of nano-ESI-IM-MS to provide reliable information about the size and molecular mass of this enzyme. Such information may be highly relevant for the early diagnosis of ALS and the development of efficient drugs for this disease.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All the chemicals used to prepare the buffers and solutions were of analytical reagent grade. Ammonia (25%), ethanol, chloroform, acetone, potassium dihydrogen phosphate anhydride (99.5%) (KH_2PO_4), potassium monohydrogen phosphate anhydride (99.5%), and orthophosphoric acid (85%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride was provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). SOD-1 from bovine erythrocytes and ammonium acetate (NH_4OAc) were from Fluka (Madrid, Spain). Water with a conductivity value lower than $0.05 \mu\text{S}/\text{cm}$ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

SOD-1 samples

Bovine SOD-1

Capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) revealed commercial SOD-1 from bovine erythrocytes to be a mixture of the metallated dimeric and monomeric forms (Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 and Cu_1Zn_1 -monomer SOD-1) [16]. As an example, using mMass software [32], the average molecular mass of Cu_2Zn_2 -dimer SOD-1 ($M = 31432.2 \text{ Da}$) was calculated to be apo-SOD-1 ($M = 15591.2 \text{ Da}$, taking into account the amino acid sequence, a disulfide bond and an N-terminal acetyl group) + $2 \text{ Zn}^{2+} + 2$

$\text{Cu}^{2+} - 8 \text{ H}^+$, where the masses of Cu^{2+} , Zn^{2+} and H^+ were 63.5, 65.4 and 1.0 Da, respectively, and 8 H^+ were displaced by metals so that the net electric charge of the molecule was zero [16, 30, 33]. A solution of the commercial enzyme was obtained by diafiltering a $2000\text{-mg}\cdot\text{L}^{-1}$ solution of the commercial sample using Amicon Ultra-0.5 centrifugal devices (MWCO 10000 Da) (Millipore, Beverly, MA, USA). The filter membrane was initially washed with 500 μL of water for 5 min at 6000 rpm. Then 500 μL of the commercial sample was centrifuged for 5 min under the same force. The residue was washed three times with 250 μL of water for 5 min in the same way. The filtrates were discarded. The residue was recovered from the sample reservoir by centrifugation upside down into a new vial (2 min at 6000 rpm). Finally, sufficient water was added to adjust the protein concentration to $2000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Five μL of bovine SOD-1 solution was mixed with 43 μL of water and 2 μL of a 250 mM NH_4OAc (pH 7) solution prior to ESI-IM-MS analysis. All the analyses were performed in triplicate.

Purification of SOD-1 from human erythrocytes

Fresh blood from healthy donors and patients (males and females) diagnosed with variants of sporadic ALS and at a medium-advanced stage of the disease was collected in the *Hospital Universitari de Bellvitge* (HUB, Hospitalet de Llobregat, Spain). Samples were obtained by venipuncture and collected in 4-mL BD Vacutainer Plus Plastic K_2EDTA tubes (Franklin Lakes, NJ, USA) to prevent coagulation. Potassium phosphate buffer (PBS) was prepared with 0.565 mM of KH_2PO_4 and 1.935 mM of K_2HPO_4 adjusted to pH 7.4 with H_3PO_4 . The assay was approved by the Ethics Committee of the HUB. Written informed consent was obtained from all participants in the study.

Human SOD-1 was purified from blood using adaptations of methods described in the literature [17,34-35]. Four mL of blood was processed at a time. Plasma was separated after centrifuging the blood at 3700 rpm for 10 min at 4 °C. Erythrocytes were washed 3 times by centrifugation with 2 mL of cold 0.1 M NaCl at 4300 rpm for 5 min at 4 °C. They were then lysed with 6 mL of cold water. Hemoglobin [34-39] was removed by treatment with EtOH and CHCl_3 . The temperature was maintained at 0 °C by means of an ice-water bath while 2.7 mL of cold EtOH was added to the lysate under adequate stirring. To render hemoglobin insoluble, 1.5 mL of cold CHCl_3 was then added to the mixture, which was then stirred for 30 min [34]. The mixture was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The resulting clear supernatant (approx. 9 mL) was maintained overnight at 4°C in a refrigerator. It was then allowed to warm to room temperature, and 2.9 g of solid K_2HPO_4 was added with vigorous stirring, resulting in the separation of two liquid phases. The organic upper phase containing SOD-1 was collected after centrifuging the mixture at 2100 rpm for 10 min at 25 °C (approx. 4 mL). This solution was cooled at 4 °C in a refrigerator, and 3 mL of cold acetone was added to precipitate SOD-1. The mixture was incubated for 30 min at 4 °C with occasional manual shaking. The precipitate was then separated by centrifugation at

4300 rpm for 10 min at 25°C. This precipitate was finally dissolved in 7 mL of PBS. The SOD-1 solution was desalted and pre-concentrated at room temperature using Amicon Ultra-10 centrifugal devices (MWC0 10000 Da). The procedure was similar to that previously used for commercial bovine SOD-1. It consisted of four consecutive washing steps with PBS (7 mL x 4) and water (1 mL x 3) at 4300 rpm and 4 °C. After that, another centrifugation step was required, and the volume of the previous sample was reduced to 50 µL. There is consensus that organic solvent-based purification treatments retain SOD-1 activity and, following a similar procedure, Djalali et al. reported recoveries higher than 70% for the human native enzyme [34]. Five µL of human SOD-1 was mixed with 20 µL of water and 1 µL of a 250 mM NH₄OAc (pH 7) solution prior to nano-ESI-IM-MS analysis. All the analyses were performed in triplicate. Average molecular mass values of human SOD-1 forms were calculated as indicated above for bovine SOD-1. Samples were stored at 4 °C when not in use.

Instrumentation

Travelling wave (T-Wave) IM-MS experiments were performed on a Synapt G1 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Samples were placed on a 384-well plate refrigerated at 15°C and were introduced by automated chip-base nano-ESI using a Triversa NanoMate (Advion BioSciences) in positive ion mode. The spray voltage was set to 1.65 kV and delivery pressure to 0.5 psi. Unless otherwise indicated, nano-ESI-IM-MS was operated under the following conditions. The source pumping speed in the backing region of the mass spectrometer was reduced until achieving a pressure of 5.83 mbar to ensure optimal transmission of high mass non-covalent ions. Cone voltage, extraction cone, and source temperature were set to 20 V, 5 V and 20 °C respectively. Ions passed through a quadrupole mass filter to the IM section of the instrument. This section comprised three T-Wave devices. The first device (Trap T-Wave) accumulated ions and released them in packets into the IM T-Wave, in which the mobility separation was performed. The final device (Transfer T-Wave) was used to transport the separated ions into the oa-TOF analyzer. Trap and transfer collision energies were set to 10V. The pressure in the Trap and Transfer T-Wave regions were 6.63 10⁻² mbar of Ar and the pressure in the IM T-Wave was 0.5 mbar of N₂. Trap gas and IM gas flows were 8 and 32 mL·s⁻¹, respectively. The travelling wave used in the IM T-Wave for mobility separation was operated at a velocity of 300 m·s⁻¹. The wave amplitude was set at 9 V. The bias voltage for entering in the T-Wave cell was 18V. The instrument was calibrated over an m/z range of between 500 and 5000 Da using a solution of cesium iodide. A solution of myoglobin was analysed at the beginning of each day to check that the initial conditions allowed detection of the non-covalent interactions present in this protein. MassLynx 4.1 and Driftscope 2.1 packages were used for MS and IM data processing.

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research,

Boston, MA, USA). Centrifugations were carried out at room temperature in a Mikro 20 centrifuge with a 2073 rotor or in a controlled temperature Rotanta 460 centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

In previous studies, we demonstrated the suitability of CE-MS at neutral pH to detect the presence of monomeric and dimeric forms of bovine and human SOD-1 in solution [16-17]. However, these forms were not baseline-resolved by CE and their mass spectra overlapped greatly. Table 1 shows the multiply charged ions for native bovine SOD-1 (Cu₂Zn₂-dimer SOD-1) and its monomeric form (Cu₂Zn-monomer SOD-1). A comparison of the m/z values of the ions of both forms shows that only the ions of the dimer with an odd charge are specific to the dimeric form ('odd ions'). Therefore, careful analysis of the overlapped mass spectra obtained by CE-MS at neutral pH allowed a first approximation to the monomer-dimer composition of SOD-1 [16-17]. Furthermore, we observed that dimer dissociation was promoted by low pH of the separation buffer or by certain parameters of the MS detector, especially the fragmentor voltage of the oa-TOF mass spectrometer [16-17]. In this regard, the mild experimental conditions required in nano-ESI-IM-MS to separate gas-phase ions—even those with the same m/z ratios—on the basis of their differential drift times, are preferable for studying such metalloproteins, their conformation, monomer-dimer equilibria, and higher order oligomers [7, 13-15, 18-22, 40]. Nano-ESI provides a more reliable method of introducing small amounts of extremely labile protein assemblies, because it shows greater tolerance of salt contaminants, facilitates the spraying of neutral aqueous buffers, and removes the need for heating the source probe or desolvation gas. Furthermore, the mass spectra collected may be of better resolution [13, 22]. However, careful optimization is necessary to obtain reliable structural information.

Bovine SOD-1		
Monomer ion	m/z	Dimer ion
[M+5H] ⁵⁺	3144.2	[M+10H] ¹⁰⁺
	2858.5	[M+11H] ¹¹⁺
[M+6H] ⁶⁺	2620.4	[M+12H] ¹²⁺
	2418.9	[M+13H] ¹³⁺
[M+7H] ⁷⁺	2246.2	[M+14H] ¹⁴⁺

Table 1. Theoretical average m/z values of the ions of bovine SOD-1 with m/z values in the scanned range. Detected ions appear in bold letters.

First we studied the influence of NH₄OAc concentration on the quality of the mass spectrum for the bovine SOD-1 sample. Protein solutions containing 10, 50 and 100 mM of NH₄OAc (pH 7) were tested [13]. Neutral pH was required to avoid metal release and dimer dissociation. However, we did not detect great differences between the concentrations tested. Therefore, the lowest ionic strength solution of 10 mM of NH₄OAc (pH 7) was chosen for further analysis. This concentration was the same as the one we used for separation in CE-MS in previous studies [16-17].

To obtain improved sensitivity, mass accuracy and high resolution MS measurements, protein complexes should be activated by selecting the appropriate

injection voltages of the mass spectrometer, in our case the trap collision energy and the cone voltage [18,20]. Molecular internal energy is later removed in a region of the instrument with an appropriate backing pressure (5.83 mbar). At very low backing pressure (under 2.1 mbar), non-covalent interactions are broken because the gas pressure is not enough to promote enough collisions to allow the necessary loss of molecular internal energy [41].

Figures 1-A and -B ii show the mass spectra obtained for commercial bovine SOD-1 with 10 and 50 V of trap collision energy, respectively. Summation of the three-way dataset acquired by nano-ESI-IM-MS led to these mass spectra, which were in excellent agreement with those produced in CE-MS [16-17]. In accordance with the m/z values shown in Table 1, the two sets of mass spectra presented the overlapped charge distributions caused by monomeric (Mo) and dimeric (Di) bovine SOD-1 (see labels in Figures 1-A and -B ii). However, we observed some differences regarding signal-to-noise (S/N) ratios and relative ion intensity. At higher trap collision energy (Figure 1-B ii), the S/N ratios were better, except for the +11 ion of the dimeric form (+11 Di). The relative intensity of this ion with regard to adjacent ions (+6 Mo/+12 Di and +10 Di) decreased dramatically. This decrease was probably due to dimer dissociation. For a better understanding, ion drift time was plotted against intensity to obtain extracted ion mobility (EIM) profiles to obtain extracted ion mobility (EIM) profiles (Figures 1-A and -B i). The distinct gas-phase species associated with each ion were readily visualized from these profiles. Thus, an EIM profile showing a complex structure (two or more peaks) indicates the presence of a single species with at least two non-interconverting conformations, multiple species (monomer, dimer, etc.) or both possibilities [42]. At 10 V of trap collision energy (Figure 1-A i), assignment of +7 Mo and +11 Di in the EIM profiles was straightforward as only one peak was detected. As explained before, 'odd ions', such as +11 Di, were specific to the dimeric form of the enzyme. However,

+13 Di was not detected in the mass spectra (Figure 1-A ii), hence it was not possible to detect +14 Di, which had the same m/z value as +7 Mo (Table 1). The EIM profile of the 2620 m/z ion contained two distinct signals, the first corresponding to the dimer (+12 Di) and the second to the monomer (+6 Mo). For ions of a certain m/z value, dimer ions travelled first because they showed a lower Ω/z value (i.e. $\Omega_{Di}/z < \Omega_{Mo}/z$). In general, the Ω for the dimer (Ω_{Di}) will be less than twice the Ω of the monomer (Ω_{Mo}), because it is unlikely that monomers unravel upon forming the dimer, hence resulting in an extended structure [42]. Focusing on monomeric and dimeric ions with different charges (e.g. +10Di, +11Di and +12Di), we observed that drift time decreased with charge (Figure 1-A i). An increase in Ω with charge as a result of Coulomb repulsion was expected; however, Ω/z values are, in general, lower for higher order ions because drift times are proportional to Ω/z , and charge increase predominates over Ω increase [15, 20, 42]. Finally, the EIM profile corresponding to the 3144 m/z ion contained a single signal. This was assigned to +10Di because, in accordance with the Mo/Di ratio in the EIM profile corresponding to the 2620 m/z ion, +5Mo was undetectable. Some significant differences were observed in the EIM profiles at 50 V of trap collision energy (Figure 1-B). A higher trap collision energy may induce dissociation as well as conformational changes [19-20]. For all ions, at 50 V (Figure 1-B i), drift times and peak width increased with regard to the values recorded at 10 V. Thus, on the one hand, ions travelled later because of an increase in molecular internal energy and collisions. On the other hand, wider peaks indicated the generation of multiple unfolded intermediates [18]. These induced unfolded states were unlikely to correspond to any accessible solution-state structures because gas-phase activation occurs in an environment where solvation and Coulomb forces have vastly different magnitudes compared to those in solution [18]. Thus excessive activation with 50 V of trap collision energy should

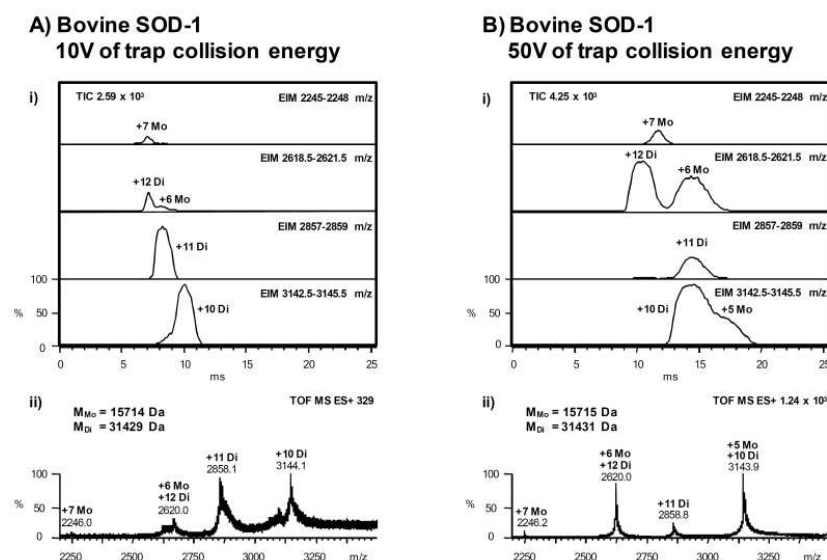


Figure 1. Extracted ion mobility (EIM) profiles (i) and mass spectra (ii) for commercial bovine SOD-1 at (a) 10 V and (b) 50 V of trap collision energy. Cone voltage was 20 V. (Mo=monomer and Di=dimer).

be avoided in order to minimize unfolding. Taking EIM profiles at 10 V as a reference, assignment of +7 Mo, +12 Di//+6 Mo, +11 Di and +10 Di//+5 Mo in the EIM profiles was straightforward (Figure 1-B i). Dimer dissociation could now be explained by the decrease in intensity of +11 Di and the increase in that of +6 Mo and +5 Mo in comparison to +12 Di and +10 Di, respectively. Similar results were observed when the trap collision energy was set at 90 V or higher (data not shown).

Having selected a trap collision energy of 10 V, we analysed bovine SOD-1 at 20, 55, 90, 120, 180 and 200 V of cone voltage (data not shown). The EIM profiles and mass spectra were very similar for the range of cone values between 20 and 90 V (Figure 1 data correspond to a cone value of 20V). Over a cone voltage of 120 V, the EIM profiles and mass spectra resembled the one of Figure 1-B, thus suggesting dimer dissociation. At 200 V, the +11 Di ion, which was the most intense specific ion of the dimer (see mass spectra of Figures 1 A-B ii and Table 1), was almost undetectable.

The results for bovine SOD-1 were the starting point to analyse SOD-1 from human erythrocytes, which resulted to be more stable. In contrast to the 50 V threshold of trap collision energy for bovine SOD-1, a value of 150 V was required to observe human SOD-1 dimer dissociation. Furthermore, this protein did not dissociate in the range of cone voltages tested (20-200V). At 90 V of trap collision energy and 20 V of cone voltage, the mass spectrum showed improved S/N ratios, mass accuracy and resolution and allowed the detection of a greater number of post-translational modifications (PTMs) than CE-TOF-MS [17]. The multiple charged ions corresponding to monomeric and dimeric forms of human SOD-1 were detected (Mo and Di, respectively, see Table 2 for m/z details), as well as those corresponding to some impurities (X) (Figure 2). This observation was in good agreement with mass spectra obtained by CE-TOF-MS [17]. However, the mass spectrum for human SOD-1 was now displaced to higher m/z values as a result of the milder composition of the sprayed solution. Thus, in nano-ESI-IM-MS, the aqueous solution of protein containing NH₄OAc was sprayed directly without the typical acidic hydroorganic sheath liquid needed in CE-MS with sheath flow interfaces [17]. The ions with higher m/z values were detected with excellent mass accuracy

and resolving power as a result of the improved performance of this TOF analyzer at m/z values above 3200. Peaks corresponding to +6 Mo (Figure 2 i) and +10 Di (Figure 2 ii) were magnified to demonstrate the detection of the distinct human SOD-1 forms, which contained a disulfide bond and from one to three acetyl groups, in the presence or absence of glutathione (GSH) (Table 2). Presence of an acetyl

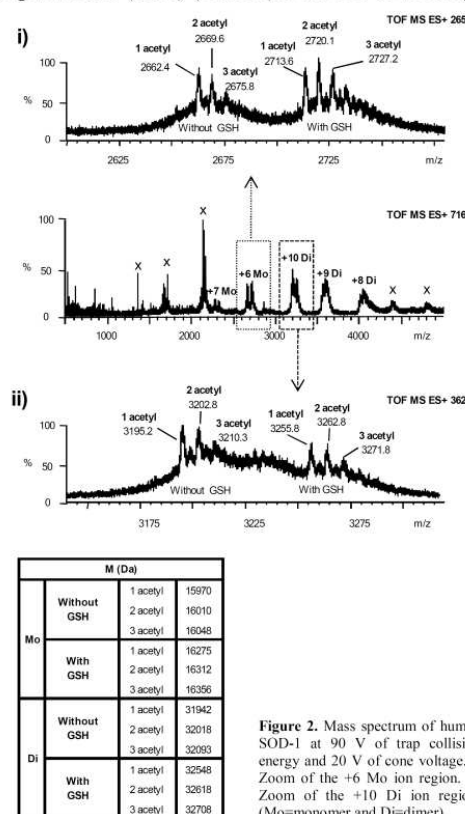


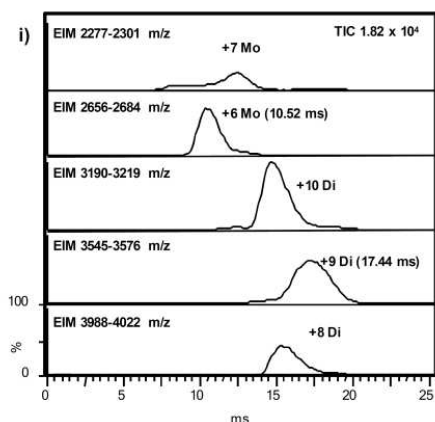
Figure 2. Mass spectrum of human SOD-1 at 90 V of trap collision energy and 20 V of cone voltage. i) Zoom of the +6 Mo ion region. ii) Zoom of the +10 Di ion region. (Mo=monomer and Di=dimer).

group and a glutathione addition have been described before by other authors [2, 29]. Figures 3-A and -B show the EIM profiles. For a better interpretation, we selected the appropriate m/z ranges to individually consider ions corresponding to forms with and without GSH. Following a similar reasoning as for bovine SOD-1 (Figure 1), the distinct peaks were easily identified, and they confirmed the presence of monomeric and dimeric forms of human SOD-1 with and without GSH. Furthermore, only a small shift in

Monomer ion	m/z						Dimer ion
	Without GSH			With GSH			
	1 acetyl	2 acetyl	3 acetyl	1 acetyl	2 acetyl	3 acetyl	
[M+4H]⁺⁴	3993.3	4003.8	4014.3	4069.6	4080.2	4090.7	[M+8H]⁺⁸
	3549.7	3559.1	3568.4	3617.6	3626.9	3636.3	[M+9H]⁺⁹
[M+5H]⁺⁵	3194.9	3203.3	3211.7	3255.9	3264.3	3272.7	[M+10H]⁺¹⁰
	2904.5	2912.2	2919.8	2960.0	2967.7	2975.3	[M+11H]⁺¹¹
[M+6H]⁺⁶	2662.5	2669.6	2676.6	2713.4	2720.4	2727.4	[M+12H]⁺¹²
	2457.8	2464.3	2470.8	2504.8	2511.2	2517.7	[M+13H]⁺¹³
[M+7H]⁺⁷	2282.3	2288.3	2294.3	2325.9	2331.9	2338.0	[M+14H]⁺¹⁴

Table 2. Theoretical average m/z values of the ions of human SOD-1 with m/z values in the scanned range. Detected ions appear in bold letters. (GSH=glutathione)

A) Human SOD-1 without GSH



B) Human SOD-1 with GSH

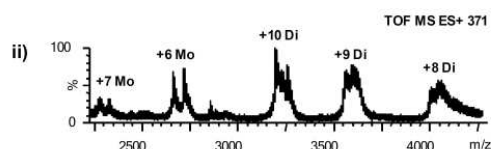
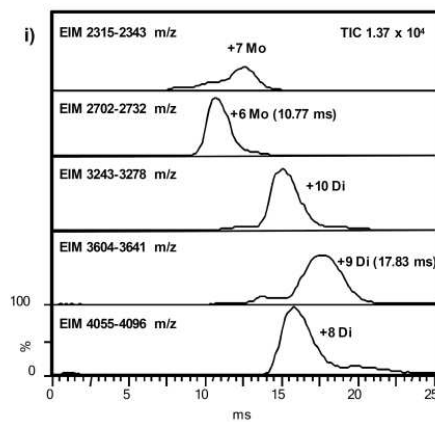


Figure 3. EIM profiles (i) and mass spectrum (ii) for human SOD-1 at 90 V of trap collision energy and 20 V of cone voltage, considering the forms (a) without GSH and (b) with GSH. (Mo=monomer and Di=dimer).

drift times was observed when comparing the two EIM profiles (see the insets beside the ions +6 Mo (10.52 and 10.77 ms) and +9 Di (17.44 and 17.83 ms) in Figures 3 A- and B- i). This observation suggests that the presence of GSH was not enough to promote a conformational change that significantly affected the molecule cross-section in the gas-phase.

Sample	Drift time +6 Mo (ms)		Drift time +9 Di (ms)	
	Without GSH	With GSH	Without GSH	With GSH
Control 1	10.52	10.77	17.31	17.70
Control 2	10.52	10.77	17.44	17.83
Patient 1	10.52	10.90	17.70	18.08
Patient 2	10.39	10.65	17.70	18.08
Patient 3	11.03	11.16	18.34	18.60
Patient 4	10.90	11.03	17.83	18.21
Patient 5	10.90	11.03	17.83	18.21
AVERAGE	10.68	10.90	17.74	18.10
s	0.25	0.18	0.33	0.29

Table 3. Drift times of the peaks detected in the EIM profiles corresponding to +6 Mo and +9 Di, with and without GSH, in control and patient samples. (s=standard deviation)

To evaluate the potential of nano-ESI-IM-MS to obtain a reliable fingerprint of human SOD-1 that could be used to gain insight into monomerization as a trigger of the oligomerization processes underlying ALS, we performed a preliminary study with samples from a small group of healthy controls and ALS patients. All the blood samples were purified and later analyzed at neutral pH under the optimum instrumental conditions to minimize dimer dissociation (i.e. 90 V of trap collision energy and 20 V of cone voltage). Table 3 shows the drift times of the peaks detected in the EIM profiles corresponding to +6 Mo and +9 Di, with and without GSH, in

control and patient samples. We selected these ions because they were specific to the monomer and the dimer, respectively, and were baseline-resolved in the ion mobility dimension (Figure 3). The repeatability of drift times between samples was satisfactory and, as indicated (Figures 3-A and -B), drift times were only slightly lower without GSH than with. Figure 4 shows a bar graph with the ratios between areas obtained for the peaks of +6 Mo and +9 Di in their EIM profiles, with and without GSH, as well as the average of both monomer-to-dimer ratios. These ratios were useful to evaluate the relative abundances of monomer and dimer, because these ions were exclusive to the monomer (+6 Mo) and the dimer (+9 Di) (see Figure 3). As it was a relative parameter, comparison between both groups of samples was more reliable, as differences caused by sample matrix, the possible dissociation (during sample purification or detection) or absolute protein concentrations, were minimized. The average ratio of

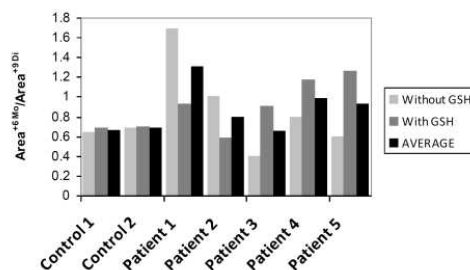


Figure 4. Bar graph with the ratios between areas obtained for the peaks of the +6 Mo and +9 Di ions in their EIM profiles, with and without GSH, for control and ALS patient samples (grey bars). The average of the ratios for both forms (with and without GSH) is shown as a black bar.

peak areas for the two control samples was similar (approx. 0.6). This value increased significantly for all patient samples, except patient 3, thus indicating the presence of a higher amount of monomer. At this point, given the limited number of samples, it was difficult to explain why the amount of monomer for some patients increased for forms with or without GSH. However, our results highlight the importance of performing larger studies with carefully selected control and patient samples or monitoring artificially induced oligomerization in samples from animal models.

CONCLUSIONS

Nano-ESI-IM-MS provides insight into protein oligomerization. The use of an automated chip-based nano-ESI interface allowed the characterization of bovine and human SOD-1 in non-denaturant conditions (10 mM NH₄OAc (pH 7)). Careful selection of the most appropriate instrumental conditions was necessary to minimize dimer dissociation, because this process precludes reliable quantitative information about the composition of the monomeric and dimeric forms. The most important parameters of nano-ESI-IM-MS were trap collision energy and cone voltage, which were maintained low enough to achieve satisfactory sensitivity while preventing dimer dissociation. However, the behaviour of bovine and human SOD-1 differed significantly, and fully metallated human dimeric SOD-1 was more stable and less prone to dissociation at high trap collision energies and cone voltages than the bovine form. These observations indicate that nano-ESI-IM-MS detection conditions should be carefully optimized for each specific protein. We conclude that nano-ESI-IM-MS is an excellent complementary tool to methods based on ESI-MS, LC-MS and CE-MS for SOD-1 analysis. However, further studies with real or artificial samples are required to evaluate the capacity of this technique to elucidate the molecular mechanisms of aggregation related to PTMs or monomerization that underlie ALS. Furthermore, this improved information may have implications for other neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, and prion diseases, thus paving the way for early diagnosis, accurate prognosis, or novel therapeutic targets.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2011-27130). M. Borges-Alvarez acknowledges the Spanish Ministry of Education and Science for a FPU (Formación del Profesorado Universitario) fellowship. We also thank Dr. M. Povedano (Hospital Universitari de Bellvitge, HUB, Hospitalet de Llobregat, Spain) for providing the blood samples.

REFERENCES

- [1] P. Keh-ming, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, S. B. Prusiner. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 10962.
- [2] K. C. Wilcox, L. Zhou, J. K. Jordon, Y. Huang, Y. Yu, R. L. Redler, X. Chen, M. Caplow, N. V. Dokholyan. Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes. A possible role in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13940.
- [3] P. A. Doucette, L. J. Whitson, X. Cao, V. Schirf, B. Demeler, J. S. Valentine, J. C. Hansen, P. J. Hart. Dissociation of human Copper-Zinc Superoxide Dismutase dimers using chaotrope and reductant. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 54558.
- [4] R. Rakhit, J. P. Crow, J. R. Lepock, L. H. Kondejewski, N. R. Cashman, A. Chakrabartty. Monomeric Cu,Zn-superoxide Dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15499.
- [5] K. Goggin, C. Bissonnette, C. Grenier, L. Volkov, X. Roucou. Aggregation of cellular prion protein is initiated by proximity-induced dimerization. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1195-1205.
- [6] C. Soto, L. Estrada, J. Castilla. Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 150-155.
- [7] D. P. Smith, K. Giles, R. H. Bateman, S. E. Radford, A. E. Ashcroft. Monitoring copopulated conformational states during protein folding events using electrospray ionization-ion mobility spectrometry-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 2180.
- [8] A. P. Garnett, J. H. Viles. Copper Binding to the Octarepeats of the Prion Protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6795.
- [9] D. K. Clodfelter, M. A. Nussbaum, J. Reilly. Comparison of free solution capillary electrophoresis and size exclusion chromatography for quantitating non-covalent aggregation of an acylated peptide. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 763.
- [10] S. Hornemann, C. Schorn, K. Wüthrich. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO rep.* **2004**, *5*, 1159.
- [11] M. Saraswathi, T. Nakanishi, A. Shimizu, *Biochim.* Relative quantification of glycosylated Cu-Zn superoxide dismutase in erythrocytes by electrospray ionization mass spectrometry. *Biophys. Acta.* **1999**, *1426*, 483.
- [12] L. Sánchez, S. Madurga, T. Pukala, M. Vilaseca, C. López-Iglesias, C. V. Robinson, E. Giral, N. Carulla. A β 40 and A β 42 amyloid fibrils exhibit distinct molecular recycling properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6505.
- [13] H. Hernández, C. V. Robinson. Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 715.
- [14] J. T. S. Hopper, N. J. Oldham, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* Collision induced unfolding of protein ions in the gas phase studied by ion mobility-mass spectrometry: The effect of

- ligand binding on conformational stability, **2009**, 20, 1851.
- [15] B. T. Ruotolo, S. J. Hyung, P. M. Robinson, K. Giles, R. H. Bateman, C. V. Robinson. Ion mobility–mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes. *Angew. Chem. Int.* **2007**, 46, 8001.
- [16] M. Borges-Alvarez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. Capillary electrophoresis/mass spectrometry for the separation and characterization of bovine Cu,Zn-superoxide dismutase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 1411-1418.
- [17] M. Borges-Alvarez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. Separation and characterization of superoxide dismutase 1 (SOD-1) from human erythrocytes by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Electrophoresis*. **2012**, in press.
- [18] B. T. Ruotolo, J. L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S. J. Hyung, C. V. Robinson. Ion mobility–mass spectrometry analysis of large protein complexes. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 1139.
- [19] C. S. Hoaglund, S. J. Valentine, C. R. Spörleder, J. P. Reilly, D. E. Clemmer. Three-dimensional ion mobility/TOFMS analysis of electrosprayed biomolecules. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2236.
- [20] I. Michaelevski, N. Kirshenbaum, M. Sharon. T-wave ion mobility-mass spectrometry: basic experimental procedures for protein complex analysis. *J. Vis. Exp.* **2010**, 41, <http://www.jovc.com/details.php?id=1985>, doi: 10.3791/1985, 1-7.
- [21] B. T. Ruotolo, C. V. Robinson. Aspects of native proteins are retained in vacuum. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 402.
- [22] J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, C. V. Robinson. Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. *Chem Rev.* **2007**, 107, 3544.
- [23] T. Sato, Y. Yamamoto, T. Nakanishi, K. Fukada, F. Sugai, Z. Zhou, T. Okuno, S. Nagano, S. Hirata, A. Shimizu, S. Sakoda. Identification of two novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: mass spectrometric and genomic analyses. *J. Neurol. Sci.* **2004**, 218, 79.
- [24] W. Jiang, T. Shen, Y. Han, Q. Pan, C. Liu. Divalent-metal-dependent nucleolytic activity of Cu, Zn superoxide dismutase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 835.
- [25] I. Fridovich. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 7761.
- [26] J. V. Bannister, W. H. Bannister, G. Rotilio. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit. Rev. Biochem.* **1987**, 22, 111.
- [27] T. Nakanishi, M. Kishikawa, A. Miyazaki, A. Shimizu, Y. Ogawa, S. Sakoda, T. Ohi, H. Shoji. Simple and defined method to detect the SOD-1 mutants from patients with familial amyotrophic lateral sclerosis by mass spectrometry. *J. Neurosci. Methods*, **1998**, 81, 41.
- [28] L. Banci, I. Bertini, A. Durazo, S. Giroto, E. B. Gralla, M. Martinelli, J. S. Valentine, M. Vieru, J. P. Whitelegge. Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: A possible general mechanism for familial ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 11263.
- [29] A. Shimizu, T. Nakanishi, A. Miyazaki. Detection and characterization of variant and modified structures of proteins in blood and tissues by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, 25, 686.
- [30] Y. Yamazaki, T. Takao. Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-Superoxide Dismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 8246.
- [31] A. Shimizu, T. Nakanishi, M. Kishikawa, A. Miyazaki. Detection and identification of protein variants and adducts in blood and tissues: an application of soft ionization mass spectrometry to clinical diagnosis. *J. Chromatogr. B.* **2002**, 776, 15.
- [32] M. Strohm, M. Hassman, B. Kosata, M. Kodicek. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 905.
- [33] H. M. Steinman, V. R. Naik, J. L. Abernethy, R. L. Hill. Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 7326.
- [34] M. Djalali, H. Abtahi, M. R. Sadeghi, M. Negahdar, H. Layegh, B. Farzami, F. Fatchi. A new method for the purification of Cu-Zn superoxide dismutase from human erythrocytes. *Iranian J Publ Health*, **2005**, 34, 58.
- [35] Y. Sun, L. W. Oberley, Y. Li. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* **1988**, 34, 497.
- [36] Y. Nuevo Ordoñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel. Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2387.
- [37] J. Bannister, W. Bannister, E. Wood. Bovine erythrocyte cupro-zinc protein. 1. Isolation and general characterization. *Eur. J. Biochem.* **1971**, 18, 178.
- [38] A. Casado, R. De la Torre, M. E. López-Fernández. Copper/zinc superoxide dismutase activity in newborns & young people in Spain. *Indian J. Med. Res.* **2007**, 125, 655.
- [39] Lan-Kai-Wei. The clinical and laboratory studies of superoxide dismutase activity in the human whole blood with early gastric cancer. *Free Rad. Res. Comms.* **1991**, 13, 759.
- [40] S. L. Koeniger, S. I. Merenbloom, D. E. Clemmer. Evidence for many resolvable structures within conformation types of electrosprayed ubiquitin ions. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 7017-7021.
- [41] H. Kreckel, M. Motsch, J. Mikosch, J. Glosik, R. Plasil, S. Altevogt, V. Andrianarijaona, H. Buhr, J. Hoffmann, L. Lammich, M. Lestinsky, I. Nevo, S. Novotny, D. A. Orlov, H. B.

Pedersen, F. Sprenger, A. S. Terekhov, J. Toker, R. Wester, D. Gerlich, D. Schwalm, A. Wolf, D. Zajfman. High-resolution dissociative recombination of cold H_3^+ and first evidence for nuclear spin effects. *Phys. Rev. Lett.* 2005, 95, 263201.

[42] S. L. Bernstein, T. Wyttchenbach, A. Baumketner, J. E. Shea., G. Bitan, D. B. Teplow, M. T. Bowers. Amyloid β -Protein: Monomer structure and early aggregation states of A β 42 and its Pro¹⁹ alloform *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2075.

CAPÍTOL 6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ DE PrP^C

La purificació del prió cel·lular (PrP^C) a partir de cervell boví és un procés complicat degut especialment, a la seva baixa resistència a la proteòlisi. Això provoca que no es trobi disponible comercialment i que molta de la informació sobre la seva estructura s'hagi obtingut a partir de l'estudi del prió recombinant (rPrP) i el prió patològic (PrP^{Sc}), que es poden obtenir més fàcilment i en més quantitat, principalment en el cas de l'rPrP. A la figura 6.1-A es pot observar l'electroferograma de l'rPrP boví mitjançant electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses amb ionització per electrospai i analitzador de trampa d'ions (CE-IT-MS) amb un electròlit de separació (BGE) àcid. A la figura 6.1-B, a partir del seu espectre de masses, que presenta el clúster d'ions multicarregats típic d'una proteïna, és senzill calcular una massa molecular (M) de 23679.4Da, molt similar al valor teòric del rPrP (23688.0Da) [172-173], corresponent a la seqüència peptídica sense glicosilar.

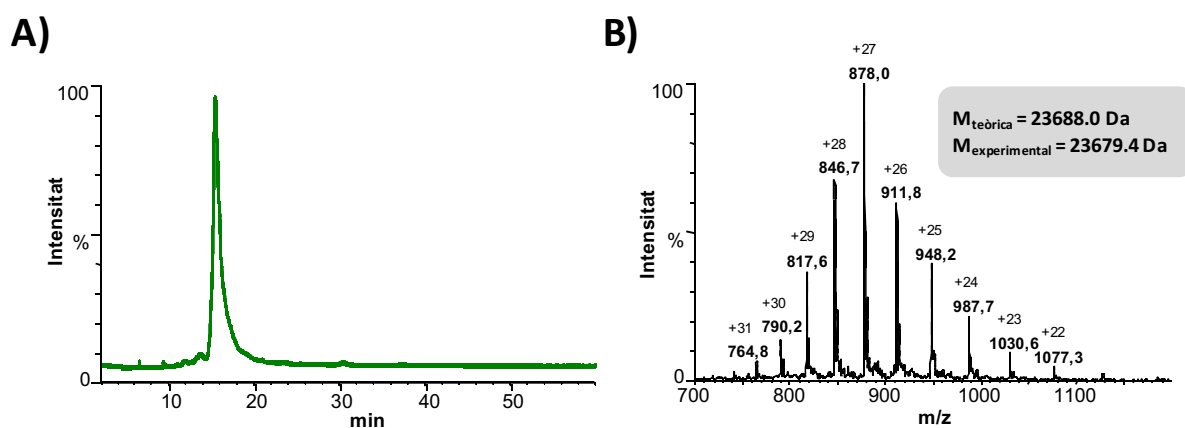


Figura 6.1. Anàlisi del rPrP boví mitjançant CE-IT-MS en un capil·lar de sílice fosa de 50cm de longitud total i 50µm de diàmetre intern, BGE: HAc:FA, 100mM : 100mM, pH 2.2. A) Electroferograma del pic base (BPE). B) Espectre de masses.

Amb l'objectiu d'obtenir PrP^C suficient per abordar la seva caracterització amb tècniques de separació d'alta resolució acoblades a l'espectrometria de masses (MS), en el capítol 2 d'aquesta tesi s'ha desenvolupat una nova metodologia d'extracció i purificació de PrP^C a partir de cervell boví (article 2.1). El mètode s'ha dissenyat com a combinació de diferents etapes descrites a la bibliografia perquè, actualment, no existeix un protocol estàndard que proporcioni uns rendiments elevats. Cap d'aquestes etapes implica tècniques immunoquímiques.

El procediment d'extracció emprant el detergent zwitterionic (zwittergent® 3-12) proposat en aquesta tesi doctoral és molt poc selectiu com ho van demostrar uns experiments preliminars amb electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecil sulfat de sodi (SDS-PAGE) amb tinció de blau de *Coomassie* realitzats amb els extractes obtinguts. Aquest fet va posar de manifest la necessitat d'introduir diferents etapes de purificació per aïllar el PrP^C. Per a la primera etapa, es van comparar dues tècniques de purificació de proteïnes tradicionals poc selectives: la cromatografia d'exclusió molecular o filtració en gel (SEC) i la diafiltració amb filtres de tall per pes molecular (MWCO). A continuació es van optimitzar unes condicions de treball amb cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC), que és molt més selectiva, i es van aplicar les fraccions obtingudes amb les tècniques anteriors.

L'eficàcia de les diferents etapes de la purificació es va avaluar mitjançant western blot (WB), que per la seva selectivitat i sensibilitat és la millor alternativa per a la detecció de les baixes concentracions de PrP^C. Aquestes anàlisis es van realitzar en col·laboració amb el Banc de Teixits Animals de Catalunya (BTAC, Universitat Autònoma de Barcelona, UAB).

6.1.1. SEC vs diafiltració

Abans de la purificació per SEC, els extractes es van preconcentrar utilitzant filtres de 10 kDa de MWCO.

Per a la purificació dels extractes concentrats es va fer servir una columna semipreparativa de SEC amb un interval de treball de 3 a 70kDa, suficient per separar les glicofomes del PrP^C boví (que pesen 37-35kDa, 32-28kDa i 27-25kDa, per a les seves formes di-, mono- i no glicosilada, respectivament). La M de les proteïnes a les diferents fraccions es va estimar a partir dels resultats del calibratge amb una mescla de proteïnes patró (albúmina (BSA), ovoalbúmina (ALB), anhidrasa carbònica (CA) i ribonucleasa A (RNase A)). A la figura 6.2 es mostren els cromatogrames de SEC corresponents a la mescla de proteïnes patró de calibratge (figura 6.2-A) i a l'extracte concentrat (figura 6.2-B). Totes les fraccions indicades a la figura 6.2-B es van analitzar per WB (figura 6.2-B-ii) i els resultats van demostrar l'existència de PrP^C a les fraccions I i J, on s'elueixen les proteïnes de M amb valors superiors de 44kDa. Aquests valors

eren molt superiors als de la M teòrica del PrP^C i es trobaven molt al límit de l'interval de treball òptim de la columna de SEC.

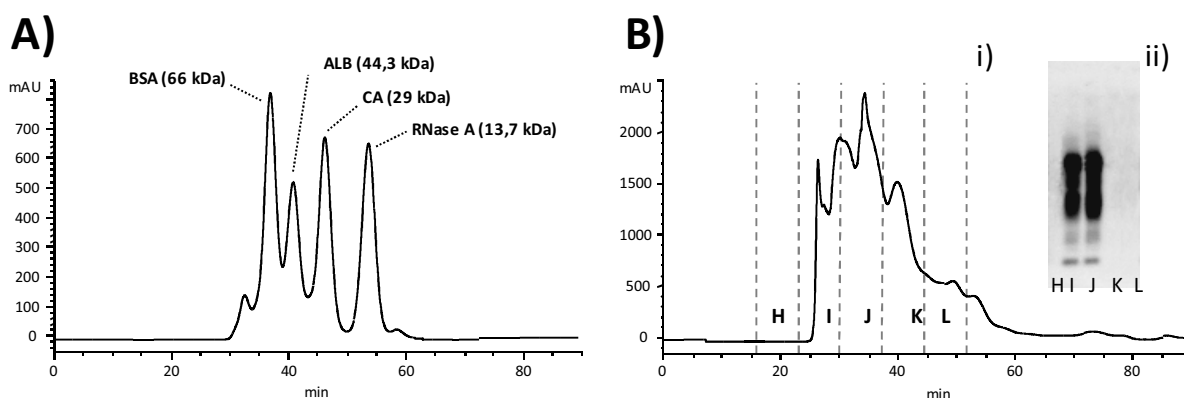


Figura 6.2. Cromatogrames de SEC. A) Mescla de proteïnes patró. B) i) Extracte concentrat per diafiltració amb filtres de 10kDa de MWCO. ii) WB de les fraccions indicades al cromatograma anterior.

La presència d'oligòmers de PrP^C en els extractes concentrats, amb una M majoritàriament superior a 70kDa (límit superior de l'interval de treball de la columna de SEC emprada) va plantejar la possibilitat d'utilitzar una columna de SEC amb un interval més adequat. Només es van trobar disponibles comercialment columnes amb intervals de treball molt més amplis (10-600kDa) que feien preveure una disminució de la separació.

Alternativament, es va estudiar la idoneïtat de fer servir un únic pas de purificació mitjançant diafiltració amb filtres de MWCO de 30, 50 o 100kDa. Per a poder separar les fraccions de proteïnes amb una M compresa entre 100-30 o 50-30kDa, es van combinar seqüencialment filtres de 100 o 50kDa amb els de 30kDa. Encara que es suposava que el PrP^C es detectaria després de tot el procés amb la combinació de filtres de 100-30kDa o 50-30kDa, la concentració detectada va ser extremadament baixa en els dos casos. La detecció per WB va ser únicament possible després d'un procés de preconcentració de 60 vegades i amb un temps d'exposició llarg en el revelatge. Això, juntament amb el fet que es va detectar gran quantitat de PrP^C en les fraccions corresponents a les proteïnes de pesos moleculars superiors a 50 i 100kDa, confirmava que el PrP^C es trobava majoritàriament en forma d'oligòmers amb M superior a 100kDa. Per tant, la diafiltració fent servir únicament els filtres de 100kDa de MWCO era una alternativa millor a SEC en quant a l'eficàcia de la purificació, la dilució, el temps, el consum de reactius, la simplicitat i la facilitat de manipulació.

6.1.2. IMAC

Després del primer pas de purificació, discutit anteriorment, es va procedir a la utilització d'IMAC. Aquesta tècnica és adequada per a un ampli grup de pèptids i proteïnes que tenen afinitat per certs metalls, com el Cu^{2+} o el Ni^{2+} . En aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat Cu^{2+} -IMAC i l'elució de les proteïnes retingudes s'ha basat en un desplaçament competitiu emprant una fase mòbil amb imidazol. En comptes de fer servir un gradient suau del contingut d'imidazol a la fase mòbil, com molts autors recomanen, es va optar per un gradient amb pendent elevada amb la intenció de recol·lectar el PrP^{C} en el mínim volum de solució possible. Els experiments preliminars i l'optimització del mètode cromatogràfic es van realitzar emprant un patró de superòxid dismutasa (SOD-1) bovina, que també presenta gran afinitat pel coure, una activitat enzimàtica del mateix tipus que el PrP^{C} , i que en humans està relacionada amb una altra malaltia neurodegenerativa caracteritzada per la formació d'agregats proteics, l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS).

El mètode cromatogràfic es va adaptar per utilitzar columnes d'1 i 20mL, però la capacitat de les primeres no era suficient per a l'elevada concentració de proteïnes amb afinitat pel Cu^{2+} als extractes purificats per SEC o per diafiltració. La figura 6.3 mostra el cromatograma d'IMAC obtingut per als extractes purificats utilitzant la diafiltració amb filtres de 100kDa de MWCO. Com es pot veure a l'anàlisi per WB de les diferents fraccions (figura 6.3-B), el PrP^{C} s'elueix majoritàriament al pic cromatogràfic de la fracció I20-7 (figura 6.3-A). També es detecten quantitats importants de PrP^{C} en les fraccions immediatament anterior (I20-6) i posterior (I20-8), i menys significatives a les següents. Aquest patró d'elució podria indicar una sobrecàrrega de la columna. Per a millorar l'eficàcia de la purificació amb IMAC i aconseguir recuperacions superiors es podrien diluir els extractes concentrats per disminuir la concentració de proteïnes però això suposaria incrementar el temps de la purificació. Com a norma general, és important arribar a un compromís entre el temps total de la purificació i la concentració de proteïnes en les mostres a purificar per evitar la sobrecàrrega de la columna. En qualsevol cas, el PrP^{C} recol·lectat en la fracció corresponent a l'elució pròpiament dita (I20-7), hauria de ser el més pur.

Utilitzant únicament el procés de diafiltració amb filtres de 100kDa de MWCO abans d'IMAC i tenint en compte que els límits de detecció del WB són, generalment, al

voltant de $0.1\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de proteïna, es va estimar que a partir de 40g de cervell s'aconseguirien purificar uns $0.26\mu\text{g}$ de PrP^C.

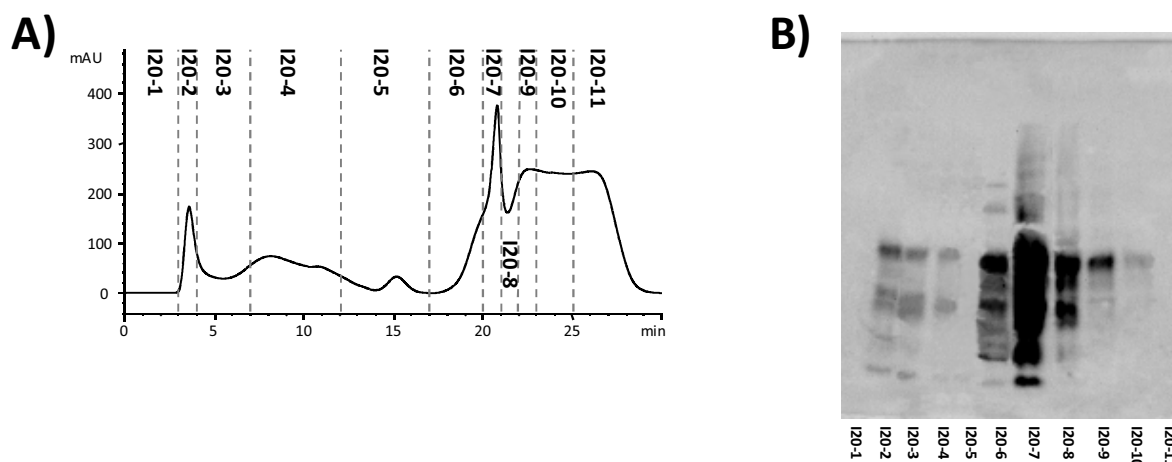


Figura 6.3. Cu²⁺-IMAC amb la columna de 20mL de l'extracte concentrat per diafiltració amb filtres de 100kDa de MWCO. A) Cromatograma. B) WB de les fraccions indicades al cromatograma anterior.

6.2. ANÀLISI DE SOD-1 PER MALDI-TOF-MS, CE-UV, CE-IT-MS

Com s'ha indicat a l'apartat anterior, es va aconseguir optimitzar un procediment d'extracció i purificació de PrP^C que es podria adaptar a escala preparativa. Però de moment, la quantitat de PrP^C obtinguda no era suficient per iniciar una caracterització amb les tècniques de separació d'alta resolució acoblades a la MS, emprant les metodologies i la instrumentació disponibles actualment. D'altra banda, el mecanisme de la conversió del PrP^C en PrP^{Sc} podria estar relacionat amb la complexitat estructural intrínseca del PrP^C, amb les seves modificacions post-transduccionals (PTMs) i la possibilitat de formar oligòmers. Per això, es va començar a treballar amb una altra proteïna que presentava certes similituds amb el PrP^C, la SOD-1, com ja s'ha apuntat a la secció anterior (6.1.2). L'objectiu final és posar a punt metodologia analítica utilitzant tècniques d'alta resolució que permetin obtenir en el futur informació rellevant sobre l'estructura d'aquest tipus de proteïnes i dels processos relacionats amb la monomerització i oligomerització proteica.

El primer treball emprant l'espectrometria de masses amb font d'ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol

(MALDI-TOF-MS), electroforesi capil·lar amb detecció ultraviolada (CE-UV) i CE-IT-MS es va realitzar amb SOD-1 bovina, perquè es troba disponible comercialment a un preu raonable a diferència de la SOD-1 humana.

Respecte a la CE, fins al moment no s'havien descrit metodologies d'electroforesi capil·lar acoblada en línia amb l'espectrometria de masses (CE-MS) per a l'anàlisi de SOD-1. La major part de la bibliografia existent per a l'anàlisi de la SOD-1 per cromatografia de líquids acoblada en línia amb l'espectrometria de masses (LC-MS) o espectrometria de masses amb font d'ionització per electrospai (ESI-MS) utilitzen fases mòbils hidroorgàniques àcides que impedeixen la detecció de la forma nativa de la proteïna, el dímer metal·lat ($\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$). Alguns autors han relacionat la monomerització de la SOD-1 humana i les seves PTMs amb l'inici de la seva oligomerització, pas previ necessari per a la formació dels agregats proteics característics de l'ALS. Així doncs, un dels principals objectius va ser desenvolupar metodologies analítiques que preservessin la forma nativa de la proteïna.

6.2.1. MALDI-TOF-MS

La SOD-1 bovina es va analitzar per MALDI-TOF-MS utilitzant diferents procediments de preparació de mostra, per a obtenir informació complementària a l'obtinguda per CE-UV i CE-MS. Els millors resultats en termes de reproductibilitat i relació senyal/soroll (S/N) es van aconseguir utilitzant l'àcid sinapínic (SA) com a matriu, amb àcid trifluoroacètic (TFA) i el mètode de cristal·lització d'evaporació ràpida ("*fast evaporation*"). A la figura 6.4 es mostra l'espectre de masses obtingut per a la SOD-1 bovina comercial (figura 6.4-A) i per a l'apo-SOD-1, preparada després de desmetal·lar la SOD-1 comercial amb TFA (figura 6.4-B). Tal i com es pot observar, els dos espectres de masses són molt similars i els pics corresponents a l'ió molecular amb una i dues càrregues de l'apo-SOD-1 monomèrica es detecten a valors nominals de m/z de 15578/15541 i 7795/7788, respectivament. La presència de l'apo-SOD-1 en ambdós casos suggereix la dissociació i desmetal·lació de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$. Això seria degut, fonamentalment, a la composició de la matriu emprada, però no s'hauria de descartar la influència de la intensitat del làser necessària per aconseguir la ionització de les molècules de proteïna [174-175]. Els resultats emprant la matriu d'àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB), amb i sense TFA, i el mètode de cristal·lització "*dried*

droplet”, o altres mètodes de preparació de mostra, no van ser significativament diferents. Un altre inconvenient és que també, en tots els casos, es va detectar el dímer d’apo-SOD-1, que es generaria durant el procés de desorció tal i com ja s’havia observat amb altres proteïnes [174-175].

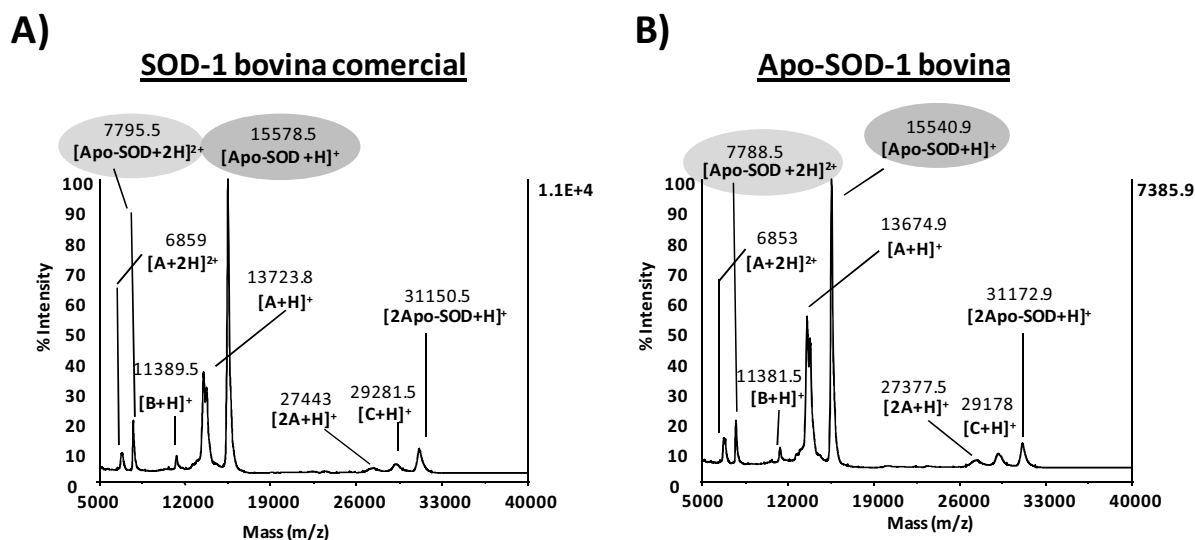


Figura 6.4. Espectre de masses de MALDI-TOF-MS de la SOD-1 comercial i l’apo-SOD-1 utilitzant SA com a matriu, amb TFA i el mètode d’evaporació ràpida. (Les impureses es troben etiquetades com A, B i C).

Això significa que tot i que MALDI-TOF-MS és una tècnica senzilla i ràpida que permet obtenir informació estructural de la SOD-1 bovina, no és gaire apropiada per a conservar el seu estat natiu. D’altra banda, s’hauria de vigilar per no arribar a conclusions poc acurades sobre dímers o altres oligòmers proteïna-proteïna que es poden generar durant la detecció.

6.2.2. CE-UV i CE-IT-MS

El MALDI-TOF-MS, l’ESI-MS i la LC-MS s’han utilitzat àmpliament per a la caracterització d’isoformes de proteïnes com per exemple l’hemoglobina, la transferrina o SOD-1 [14, 48, 64, 79, 176-178]. En la secció anterior (6.2.1) hem vist que el MALDI-TOF-MS no és una tècnica apropiada quan s’utilitzen certes condicions experimentals per a l’obtenció d’informació acurada sobre la massa molecular (M) d’algunes metal·loproteïnes o altres associacions proteïques. Pel que fa referència a l’ESI-MS i al seu acoblament en línia amb la LC, moltes vegades, les condicions òptimes requereixen la combinació de dissolvents orgànics, àcids orgànics (àcid acètic (HAc) i àcid fòrmic (FA), principalment) i temperatures elevades per afavorir la

ionització i la desolvatació dels ions [129]. Aquestes condicions poden ser apropiades per a caracteritzar l'estructura primària i les PTMs de les isoformes d'una proteïna, però no per a detectar associacions especialment làbils com els dímers metal·lats. Així, en certes condicions experimentals (pH àcid, presència d'agents oxidants, tractament amb agents quelatants, etc.) els ions metàl·lics de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ són alliberats, en part o totalment, de l'estructura proteica, conduint a formes monomèriques deficientes en metall (SOD-1 parcialment metal·lada (Cu,Zn-SOD-1 i SOD-1 desmetal·lada (apo-SOD-1)) [14, 45, 76, 78-79, 176, 179]. Tot i això, aquestes metodologies permeten la diferenciació de diverses isoformes mutants en un petit percentatge de pacients amb esclerosi lateral amiotròfica familiar (fALS).

En el cas de CE es pot treballar evitant l'ús d'electròlits de separació (BGE) que continguin dissolvents orgànics o àcids. Ara bé, la problemàtica en CE-MS quan s'utilitzen interfases de "*sheath-liquid*" és similar a l'anterior, ja que les condicions experimentals necessàries poden ser poc apropiades per al manteniment de la forma nativa de les proteïna. Quan es treballa en mode positiu són recomanables líquids auxiliars hidroorgànics, amb valors de pH àcid, amb l'objectiu d'aconseguir una detecció òptima [50, 120, 175, 180]. En qualsevol cas, la millor manera d'abordar el problema és desenvolupar en primer lloc la metodologia per a la separació per CE-UV.

Existeixen publicacions en les que s'ha analitzat la forma nativa de la SOD-1 bovina mitjançant CE-UV amb un BGE de 10mM de tris(hidroximetil)aminometà (Tris) a pH 7.3 (ajustat amb HCl) però aquestes condicions són incompatibles amb la detecció en línia per ESI-MS [114]. A l'article del capítol 3 d'aquesta tesi doctoral es presenta una metodologia alternativa per a la separació de la SOD-1 bovina mitjançant CE-UV emprant dos BGEs compatibles amb la detecció en línia per ESI-MS. Un d'ells, de pH àcid (1M HAc), proporcionava les condicions òptimes per a la detecció de la proteïna totalment desmetal·lada (apo-SOD-1) per CE-MS en mode positiu [15, 120, 180]. L'altre, de pH neutre (10mM acetat d'amoni (NH_4Ac) ajustat amb NH_3 a pH 7.3), era molt més adient per obtenir informació estructural sobre les formes dimèrica i monomèrica metal·lades ($\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ i Cu,Zn-SOD-1 , respectivament) en condicions no desnaturalitzants. Les millors separacions van ser les obtingudes amb el BGE de pH neutre. Es va intentar interpretar els diferents pics observats als electroferogrames considerant la seva intensitat i mobilitat electroforètica (m_e o μ_e),

tot i que era una tasca difícil sense disposar de la informació proporcionada per un detector d'espectrometria de masses.

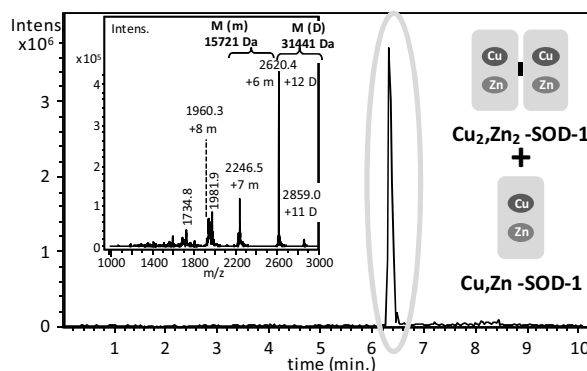
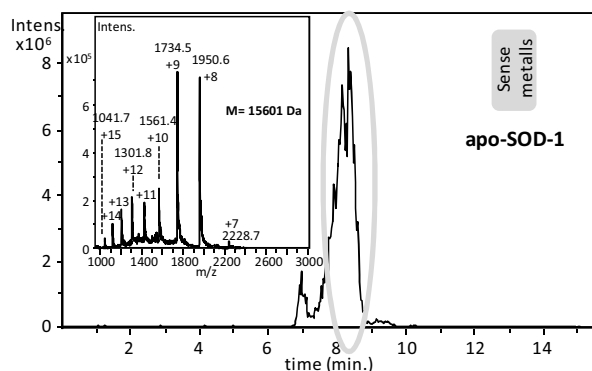
Per a obtenir una sensibilitat òptima en CE-MS en mode positiu amb els dos BGEs es va fer servir un líquid auxiliar d'isopropanol:aigua (iPrOH/aigua) (60:40 v/v) amb un 0.5% (v/v) d'FA). A la figura 6.5 es poden observar els electroferogrames de CE-IT-MS de la SOD-1 bovina comercial i l'apo-SOD-1 amb els dos BGEs, els espectres de masses corresponents i la M calculada. A partir dels valors de M experimental calculats per a les diferents espècies de SOD-1 detectades, és fàcil concloure que el BGE de pH àcid permet detectar únicament la forma apo-SOD-1 (figures 6.5-A i -B). Aquest fet indica que el BGE d'àcid acètic (HAc) desnaturalitza la SOD-1 nativa durant la separació electroforètica: s'eliminen els metalls completament i es dissocia el dímer. Quan s'analitzava la SOD-1 bovina comercial amb el BGE de pH neutre es detectaven tant el monòmer com el dímer metal·lats (Cu,Zn-SOD-1 i Cu₂Zn₂-SOD-1, respectivament).

1M HAc (pH 2.3)

10 mM NH₄Ac (pH 7.3)

A) SOD-1 bovina comercial

C) SOD-1 bovina comercial



B) Apo-SOD-1 bovina

D) Apo-SOD-1 bovina

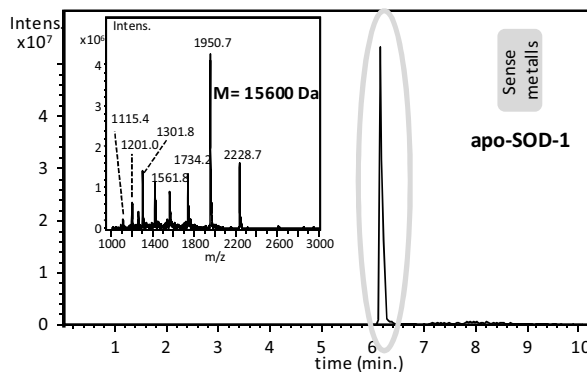
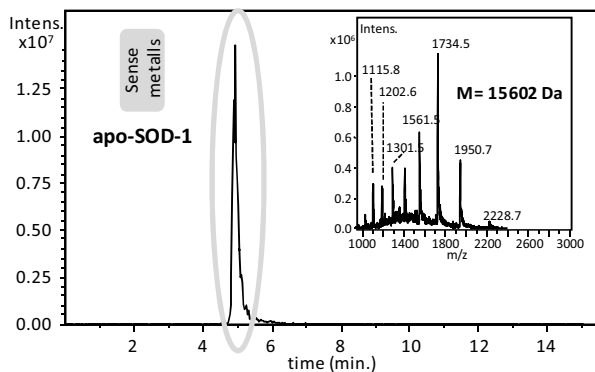


Figura 6.5. BPE i espectres de masses per CE-IT-MS de les mostres de SOD-1 comercial i apo-SOD-1 bovina utilitzant 1M HAc (A, B) i 10mM NH₄Ac (pH 7.3, amb NH₃)(C, D) (m: monòmer; D: dímer).

La interpretació de l'espectre de masses de la figura 6.5-C i figura 6.6-A, que és una ampliació de l'anterior, no es senzilla perquè els espectres de masses de la forma monomèrica i dimèrica metal·lades estan parcialment solapats, presentant ions amb el mateix valor de m/z . Com podem observar a la taula de la figura 6.6-B, els ions moleculars amb càrrega senar del dímer són exclusius del dímer. Així ha estat senzill assignar l'ió molecular +11 D a l'espectre de masses de la figura 6.6-A i descartar la presència del +13 D (2418 m/z). L'absència de l'ió molecular +13 D implica que els ions +14 D i +16 D tampoc es podrien detectar, per la qual cosa els ions +7 m i +8 m es poden assignar amb seguretat al monòmer. El solapament dels espectres només es donava al senyal dels ions moleculars +12 D/+6 m. Veurem en el següent capítol, que l'ús d'un espectròmetre de masses amb analitzador de temps de vol (TOF) d'alta resolució i massa exacta, permet intervals d'escombratge de m/z més amplis, i així es va poder millorar la interpretació d'aquests espectres de masses tan complexos.

Respecte a la presència Cu,Zn-SOD-1 a la mostra de SOD-1 comercial bovina, amb els experiments realitzats, no es va poder descartar ni que existís a la pròpia mostra comercial ni que es produís durant la ionització o desolvatació dels ions en l'espectròmetre de masses. El que sí que es va descartar és que la presència de l'FA al líquid auxiliar hidroorgànic fos la responsable de la desmetal·lació parcial de la forma dimèrica (Cu₂Zn₂-SOD-1). L'absència de l'FA feia disminuir la sensibilitat, però no feia variar la forma dels espectres.

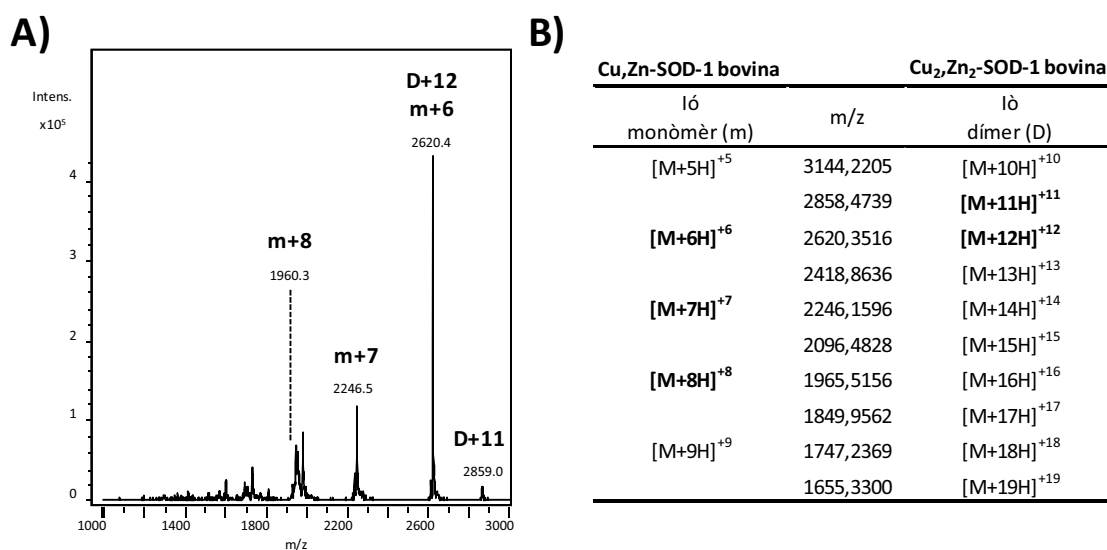


Figura 6.6. A) Ampliació de l'espectre de masses de la figura 6.5-C corresponent a la SOD-1 comercial bovina analitzada per CE-IT-MS a pH neutre; B) Llista dels ions de la forma monomèrica i dimèrica de la SOD-1 bovina que es podrien detectar en l'interval de m/z d'escombratge (fins a 1600 m/z). En negreta s'han assenyalat els ions moleculars detectats. (m: monòmer, D: dímer).

6.3. ANÀLISI DE NEUROPEPTIDS I SOD-1 PER CE-TOF-MS

6.3.1. Influència dels paràmetres instrumentals del TOF en CE-TOF-MS

En el treball realitzat mitjançant CE-IT-MS amb SOD-1 bovina es va demostrar que el pH del BGE tenia una gran importància per a preservar els metalls i l'estructura dimèrica d'aquesta metal·loproteïna (secció 6.2 i article 3.1). Per una altra banda, les prestacions de l'espectròmetre de masses, poden ser un factor limitant per a la caracterització de proteïnes complexes, sobretot pel que fa a les condicions instrumentals relacionades amb la ionització, l'interval de m/z d'escombratge, l'exactitud i la resolució.

L'espectròmetre de temps de vol d'alta resolució amb acceleració ortogonal (oa-TOF, d'ara en endavant TOF) té una major velocitat d'escombratge que la IT. També es poden obtenir espectres de massa exacta amb una resolució elevada. Això permet calcular la M monoisotòpica per a molècules petites com els pèptids i resoldre els isòtops dels ions moleculars. A més, els límits superiors d'escombratge de m/z són lleugerament més elevats que amb la IT, tant en el mode d'alta resolució com en el d'"*extended dynamic range*", la qual cosa permet la detecció dels ions moleculars amb valors de càrrega més petits (m/z més gran). Aquesta darrera possibilitat és molt interessant per a molècules grans com les proteïnes, especialment quan s'ha de treballar a pH neutre, el que dificulta la ionització.

6.3.1.1. Neuropeptids i SOD-1 bovina i humana

Abans de procedir a la caracterització d'una metal·loproteïna dimèrica complexa com la SOD-1 mitjançant CE-TOF-MS es va considerar oportú estudiar la influència dels paràmetres de la detecció amb molècules més petites, per obtenir espectres de masses més senzills d'interpretar.

En aquest sentit, i donada l'amplia experiència del nostre grup d'investigació amb neuropeptids, es van seleccionar sis neuropeptids opiacis relacionats amb malalties que cursen amb una síndrome de dolor crònica, com la fibromiàlgia. La mescla es va analitzar mitjançant una metodologia que s'havia desenvolupat i validat per CE-MS utilitzant un TOF convencional i una IT com a analitzadors als espectròmetres de

masses [119, 181]. Tal com s’esperava, les separacions i els temps de migració per CE-TOF-MS van ser molt similars als obtinguts prèviament [119, 181]. Respecte a la detecció, de tots els paràmetres estudiats del TOF es va constatar que el voltatge d’acceleració (“*fragmentor voltage*”) era el que major influència tenia a l’hora d’assegurar la integritat de les molècules analitzades i en la mesura acurada de la seva M. Aquest voltatge, que segons el fabricant s’anomena “*fragmentor voltage*”, “*declustering potential*” o “*ion transfer capillary offset voltage*” [182], es pot afirmar que juga un paper fonamental en el procés d’ionització i desolvatació.

A la figura 6.7 es recullen tres electroforogrames de CE-TOF-MS obtinguts a diferents valors d’aquest paràmetre. Com es pot observar, a l’augmentar el valor del voltatge d’acceleració la intensitat dels pics disminueix. Destaca el comportament del neuropèptid des-Tyr-Leu-encefalina (Des-Tyr), que a un valor de 275V (figura 6.7-B) gairebé ja no es pot detectar indicant que l’energia d’acceleració és tan elevada que s’ha produït la fragmentació de l’ió molecular monocarregat monitoritzat. La disminució generalitzada en l’alçada dels pics dels ions moleculars de tots els neuropèptids quan s’augmenta el valor del voltatge d’acceleració també està directament relacionada amb la fragmentació induïda per col·lisions en la font de ionització, tal i com s’ha observat amb altres molècules com pesticides i antibiòtics [142, 183-184].

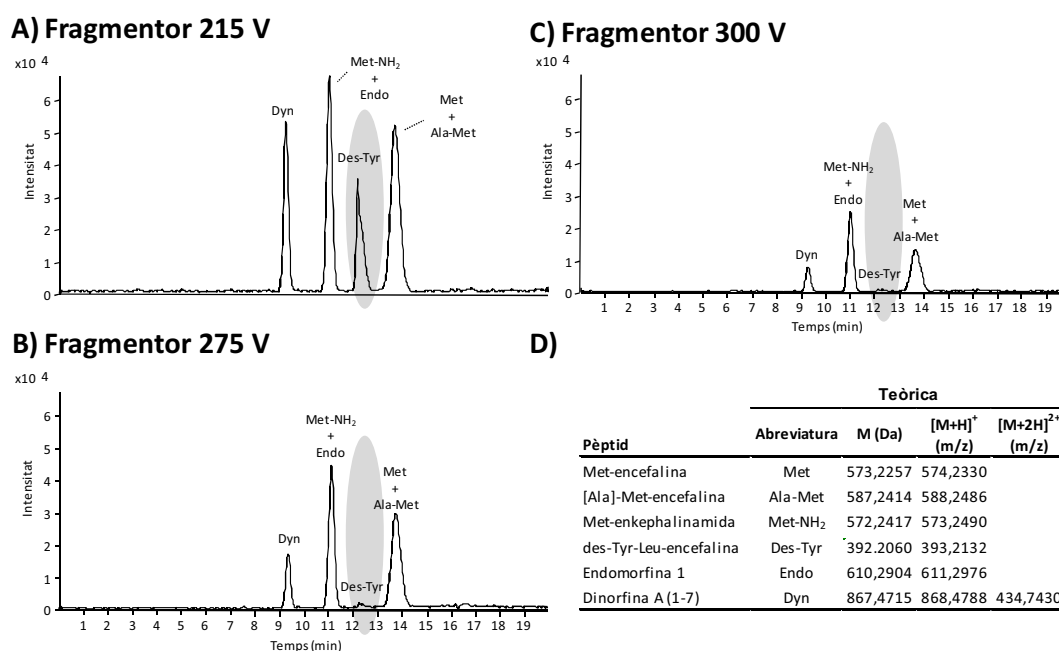


Figura 6.7. EIE per CE-TOF-MS de cadascun dels pèptids estudiats. Els valors del voltatge d’acceleració (“*fragmentor voltage*”) del TOF són: A) 215V, B) 275V i C) 300V. D) Taula de M teòrica i valors de m/z dels ions moleculars monitoritzats pels pèptids estudiats.

Per reforçar l'afirmació anterior, a la figura 6.8 es pot veure l'espectre de masses de la Met-enkefalina (Met), que comigra amb la Ala-Met-enkefalina (Ala-Met) (figura 6.7) a dos valors diferents de voltatge d'acceleració. A 215V (figura 6.8-A) la fragmentació de la Met és pràcticament negligible. L'ió molecular amb una sola càrrega és el senyal més important juntament amb els adductes amb Na^+ i K^+ . A 300V (figura 6.8-B), la intensitat d'alguns dels pics corresponents a ions producte de la fragmentació augmenta fins a ser, en alguns casos, molt semblant a la de l'ió molecular amb una sola càrrega. La resta de neuropèptids presenten un comportament molt semblant excepte la Des-Tyr que és molt més làbil, com ja s'havia apuntat anteriorment.

La fragmentació de les substàncies d'interès pot ser un desavantatge quan l'objectiu és optimitzar la detecció d'ions moleculars però pot ser una bona eina per confirmar la identitat dels compostos analitzats [142, 183-185]. Per molècules petites, aquesta informació pot complementar la informació sobre la seva M monoisotòpica i millorar la seva identificació inequívoca [139-140, 142, 183, 185].

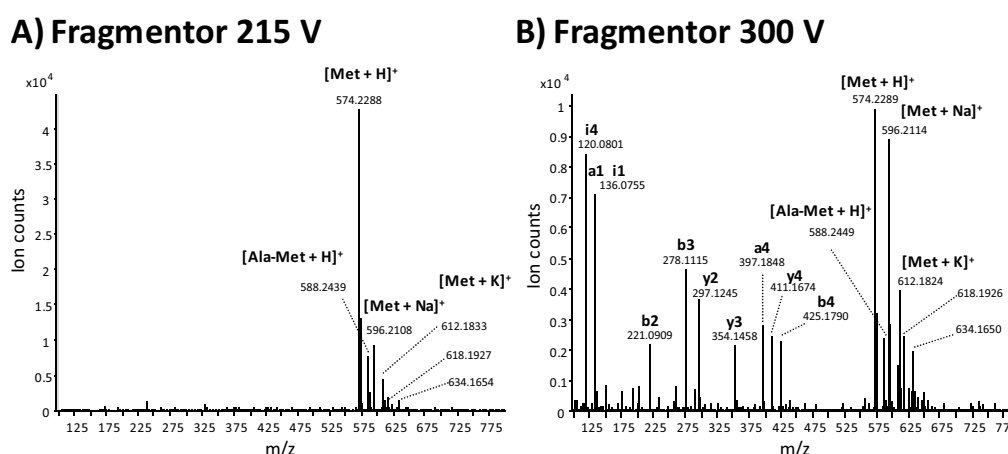


Figura 6.8. Espectre de masses de la Met a (A) 215V i (B) 300V de voltatge d'acceleració. S'han indicat els fragments més importants estan etiquetats.

A la taula 6.1 s'han calculat les M experimentals i els errors respecte a les M teòriques en tots els modes de treball estudiats amb el TOF i amb la IT. A la figura 6.9 s'observen els espectres de masses obtinguts per al pèptid Des-Tyr. Com es pot observar, l'exactitud i la resolució en tots els modes del TOF (taula 6.1 i figura 6.9-A-D) és molt més elevada que amb la IT (taula 6.1 i figura 6.9-E). Els millors resultats pel que fa a la resolució s'aconsegueix treballant a alta resolució (*“high resolution”*, 4 GHz) (figures 6.9-A i -B). Com es pot observar a la taula 6.1, les diferències en exactitud no són tan evidents entre els diferents modes del TOF i trobem valors

d'entre 3 i 11 ppm. Per a l'obtenció de mesures exactes i reproduïbles cal realitzar a diari un ajust dels paràmetres de la detecció ("standard tune") i un calibratge de l'eix de masses en el mode de treball seleccionat.

		Met	Ala-Met	Met-NH ₂	Des-Tyr	Endo	Dyn	
M _{teòrica} (Da)		573,2257	587,2414	572,2417	392,2060	610,2904	867,4715	
IT	M (Da)	573,2	587,2	572,2	392,2	610,2	867,5	
	Error (ppm)	27	54	38	143	99	21	
TOF 1700 m	Extended dynamic	M (Da)	573,2290	587,2444	572,2450	392,2103	610,2926	867,4810
		Error (ppm)	5,8	5,1	5,8	11	3,6	11
	High resolution	M (Da)	573,2290	587,2439	572,2436	392,2086	610,2926	867,4767
		Error (ppm)	5,8	4,3	3,3	6,6	3,6	6,0
TOF 3200 m	Extended dynamic	M (Da)	573,2285	587,2439	572,2447	392,2099	610,2925	867,4790
		Error (ppm)	4,9	4,3	5,3	9,9	3,4	8,6
	High resolution	M (Da)	573,2302	587,2454	572,2448	392,2104	610,2934	867,4789
		Error (ppm)	7,9	6,8	5,4	11,2	4,9	8,5

Taula 6.1. M experimental i exactitud (error en ppm) utilitzant diferents modes de treball en CE-TOF-MS i en CE-IT-MS. L'error es calcula com: $\text{error (ppm)} = M_{\text{exp}}/M_{\text{teo}} * 10^6$.

Per disminuir l'error en el càlcul de la M experimental es pot, a més, calibrar en continu l'eix de m/z durant les mesures amb la introducció de compostos de referència. En LC-TOF-MS s'utilitza una interfase dual, amb dues interfases d'ESI-MS en posició ortogonal. En una d'elles s'introdueix la mescla de compostos de referència mentre que per l'altra, simultàniament, s'ionitza el que elueix de la columna cromatogràfica. Aquesta configuració no és possible en CE-TOF-MS ja que el cabal provinent de la CE és molt petit i la solució de referència dificulta físicament, dilueix o suprimeix, la ionització dels anàlits. La millor alternativa, en aquest cas, consisteix en introduir aquests compostos en el líquid auxiliar. Amb un calibratge intern realitzat d'aquesta forma s'aconsegueix, en general, un 50% menys d'error en el càlcul de la M per a la majoria dels neuropèptids estudiats. Ara mateix, l'inconvenient d'aquesta forma d'introducció dels compostos de referència és que es degraden amb el temps, possiblement pel fet d'estar dissolts en la solució hidroorgànica àcida del líquid auxiliar. Com a alternativa a la utilització d'aquests compostos de referència aconsellats pel fabricant es poden seleccionar ions moleculars de substàncies detectades al soroll de fons. Altres autors suggereixen utilitzar ions de substàncies detectades al principi de l'electroferograma i realitzar el calibratge amb posterioritat a les mesures. Cal indicar que, per a obtenir valors acurats de M d'anàlits d'elevat pes molecular com les proteïnes, és suficient la calibració externa diària abans de les mesures.

Per últim, un altre avantatge del TOF és que els límits de detecció (LODs) són molt baixos. En el cas dels neuropèptids estudiats són d'un ordre de magnitud inferior ($0.1\mu\text{g/mL}$) que amb la IT ($1\mu\text{g/mL}$) [article 4.1, 181].

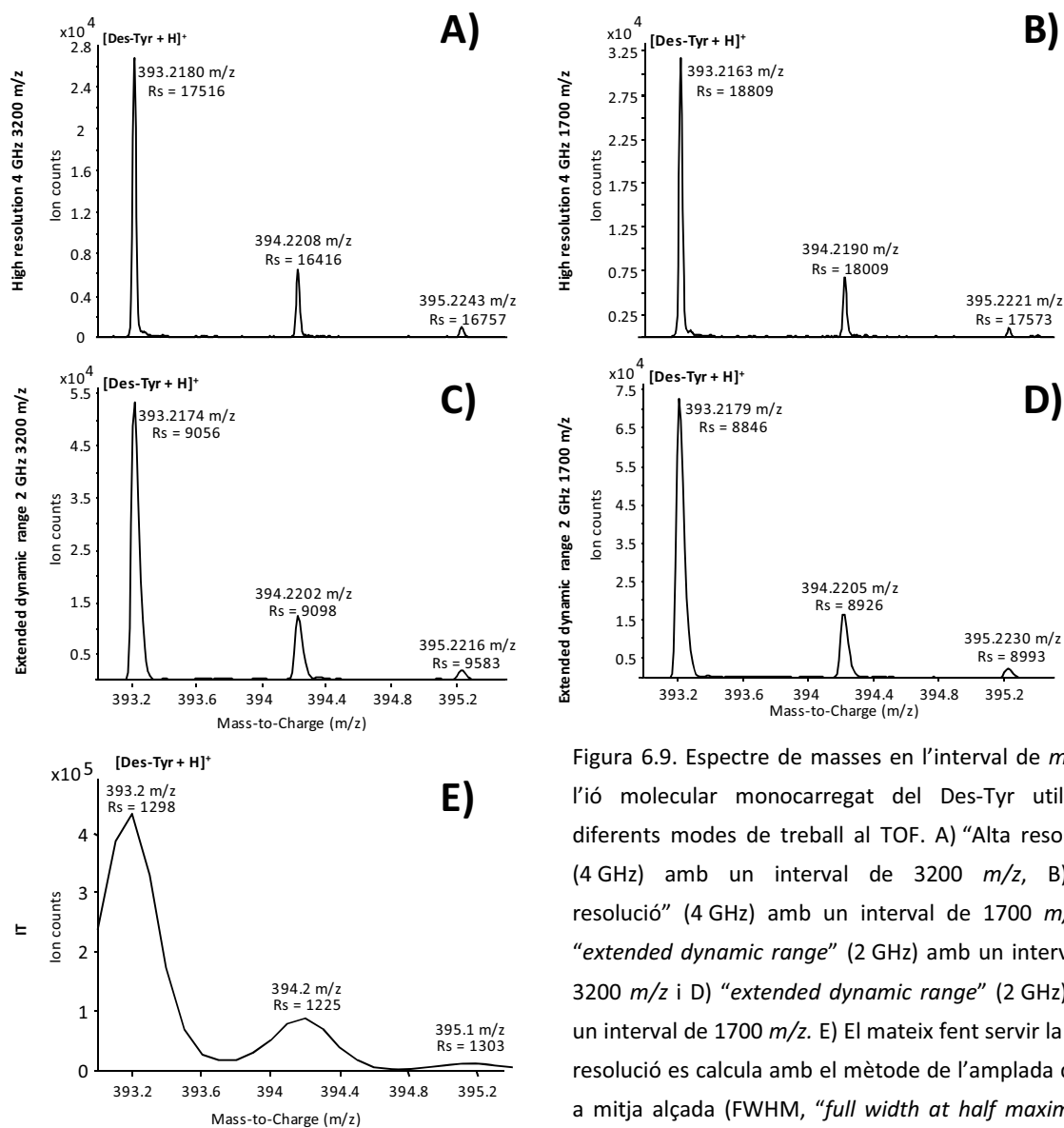


Figura 6.9. Espectre de masses en l'interval de m/z de l'ió molecular monocarregat del Des-Tyr utilitzant diferents modes de treball al TOF. A) "Alta resolució" (4 GHz) amb un interval de 3200 m/z , B) "alta resolució" (4 GHz) amb un interval de 1700 m/z , C) "extended dynamic range" (2 GHz) amb un interval de 3200 m/z i D) "extended dynamic range" (2 GHz) amb un interval de 1700 m/z . E) El mateix fent servir la IT. La resolució es calcula amb el mètode de l'amplada de pic a mitja alçada (FWHM, "full width at half maximum": $R_s = \text{FWHM}/(m/z)$)

6.3.2. Caracterització de SOD-1 bovina i humana

La possibilitat de treballar amb un espectròmetre de masses TOF, que ofereix millors prestacions que la IT, va contribuir a l'establiment de nous reptes amb la SOD-1.

A l'article 4.2 d'aquesta tesi doctoral (capítol 4) es presenta l'anàlisi de la SOD-1 bovina i humana per CE-TOF-MS. En aquest últim cas, es va desenvolupar un tractament de mostra per purificar la proteïna a partir de sang humana i es va establir

una col·laboració amb la unitat d'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) per analitzar mostres de pacients amb ALS.

SOD-1 bovina

A la secció anterior (6.3.1) hem vist que treballant amb el mode d'alta resolució (4GHz) del TOF s'obtenia la màxima resolució. No obstant això, el mode de 2GHz ("extended dynamic range") permet analitzar mescules complexes amb substàncies de diferents concentracions sense saturar el detector. En ambdós casos, el límit superior d'escombratge és de 3200 m/z . Donat que la SOD-1 presenta un pes molecular més elevat que els neuropèptids, s'ha utilitzat un mode de més baixa resolució (1 GHz) per escombrar a valors de m/z superiors.

A la figura 6.10-A es mostra l'espectre de masses de SOD-1 bovina comercial per CE-TOF-MS a 1 GHz amb el BGE de pH neutre juntament amb l'electroferograma (i) i l'ampliació del senyal corresponent a la regió de l'ió molecular amb m/z 2858 (ii).

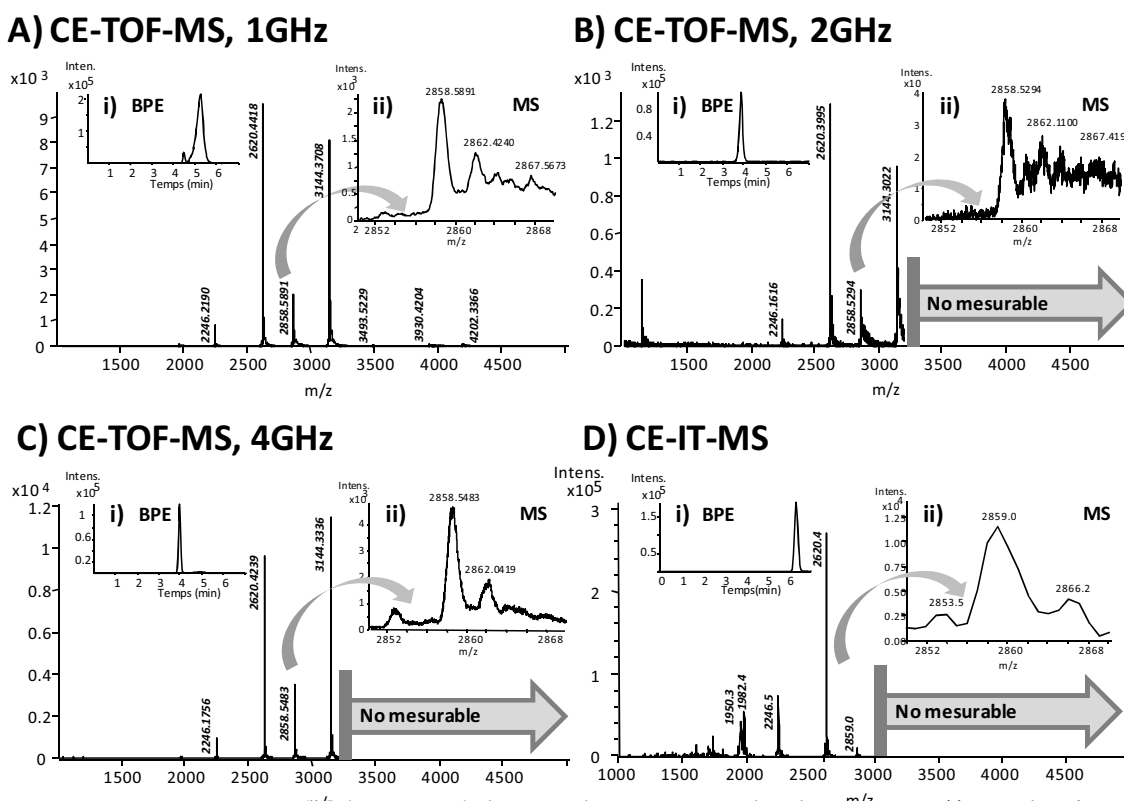


Figura 6.10. BPE i espectre de masses de la SOD-1 bovina comercial amb BGE neutre (i) i ampliació del senyal amb m/z 2858 (ii) per: A) TOF a 1 GHz, B) TOF a 2 GHz, C) TOF a 4 GHz i D) IT.

Com es pot observar a l'espectre de masses complet (figura 6.10-A), tot i que es veuen pics a valors de m/z superiors a 3200, aquests són molt menys intensos que la resta, i es podria concloure que treballar en aquest mode d'adquisició no compensa la

possible pèrdua de sensibilitat, resolució i exactitud. L'espectre de masses amb CE-IT-MS (figura 6.10-D) té un aspecte, en general, lleugerament diferent degut a les diferències instrumentals en la ionització i no permet la detecció de l'ió molecular amb m/z 3144. Però el que és més significatiu és la pèrdua d'exactitud i resolució respecte el TOF.

A la taula 6.2 es mostren els valors de M experimental determinats amb els modes d'alta resolució del TOF i la IT per a la SOD-1 bovina comercial i l'apo-SOD-1 bovina. L'exactitud és molt superior amb el TOF que amb la IT però únicament hi ha diferències significatives entre els dos modes del TOF per a l'apo-SOD-1, on el clúster d'ions multicarregats està desplaçat a m/z més petites. Per aquest mateix motiu, l'exactitud per la Cu_2,Zn_2 -SOD-1 és sempre inferior en qualsevol dels dos modes.

Analitzador	Mostra	BGE	Espècie detectada	$M_{\text{experimental}}$	Error (ppm)
TOF 2 GHz	SOD-1 bovina comercial	NH ₄ Ac	Cu ₂ ,Zn ₂ -SOD-1	31432,9860	27
		HAc	Apo-SOD-1	15591,4684	19
	Apo-SOD-1	NH ₄ Ac	Apo-SOD-1	15591,3370	10
		HAc	Apo-SOD-1	15591,4353	16
TOF 4 GHz	SOD-1 bovina comercial	NH ₄ Ac	Cu ₂ ,Zn ₂ -SOD-1	31433,1130	31
		HAc	Apo-SOD-1	15591,2300	3
	Apo-SOD-1	NH ₄ Ac	Apo-SOD-1	15591,2411	4
		HAc	Apo-SOD-1	15591,2258	3
IT	SOD-1 bovina comercial	NH ₄ Ac	Cu ₂ ,Zn ₂ -SOD-1	31434	282
		HAc	Apo-SOD-1	15604	630
	Apo-SOD-1	NH ₄ Ac	Apo-SOD-1	15604	566
		HAc	Apo-SOD-1	15607	694

Taula 6.2. Càlcul de la M experimental i l'error en ppm per a les mostres de SOD-1 bovina comercial i apo-SOD-1 bovina amb BGE de NH₄Ac (pH neutre) i HAc (pH àcid) en diferents modes de treball del TOF i amb la IT ($n = 3$).

A la figura 6.11 es mostra l'espectre de masses de la SOD-1 comercial bovina analitzada per CE-TOF-MS amb BGE de NH₄Ac (pH neutre) a 4 GHz (figura 6.11-A) juntament amb una taula amb tots els possibles ions detectables a l'interval m/z de treball (figura 6.11-B). La interpretació de l'espectre es realitza de forma similar a com es feia en CE-IT-MS.

És important considerar que, com ja passava amb els neuropèptids, el voltatge d'acceleració té una gran influència en l'espectre de masses de la SOD-1 comercial bovina i l'apo-SOD-1 (figura 6.12). En el cas de l'apo-SOD-1 (figures 6.12-A i -C), a

l'augmentar el valor del voltatge d'acceleració s'observa una disminució de la intensitat de tot l'espectre de masses indicant una possible fragmentació de la proteïna, tot i que no es té cap més evidència experimental (no s'observen els pics resultants de la fragmentació). En el cas de la SOD-1 comercial sí que es té evidència d'aquesta fragmentació (figura 6.12-B i -D). A l'augmentar el voltatge d'acceleració la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ es dissocia per a donar lloc a la Cu,Zn-SOD-1 . Si es compara la intensitat dels pics dels seus espectres de masses (figures 6.12-B i -D) s'observa que la intensitat dels ions moleculars de m/z 2620 i 3144 augmenten mentre que la del m/z 2858 disminueix a l'incrementar el valor del voltatge d'acceleració. De l'assignació dels ions moleculars comentada anteriorment (figura 6.11-A), a l'ió molecular amb m/z 2858 només contribueix la forma dimèrica de la proteïna (+11 D) mentre que tant el 2620 com el 3144 poden correspondre a la forma monomèrica i dimèrica (+6 m/+12 D i +5 m/+10 D, respectivament). Això vol dir que a l'augmentar el voltatge d'acceleració, el dímer es dissocia per donar lloc al monòmer. En tots els casos, la M experimental obtinguda per a la Cu,Zn-SOD-1 i la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$, així com per a l'apo-SOD-1, concorda amb els valors teòrics tenint en compte la seqüència aminoacídica, les PTMs (una acetilació i un pont disulfur) i la contribució dels metalls en el cas de les formes metal·lades [21, 45, 186, article 3.1, article 4.2].

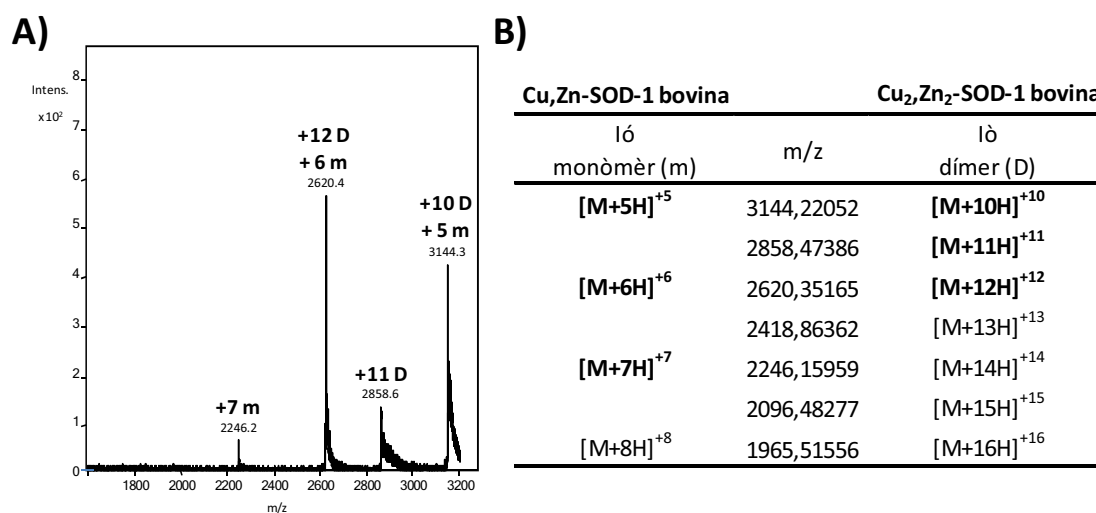


Figura 6.11. A) Ampliació de l'espectre de masses de la SOD-1 comercial bovina analitzada per CE-TOF-MS a pH neutre. B) Llista dels ions de la forma monomèrica i dimèrica de la SOD-1 bovina metal·lades que es podrien detectar en l'interval de m/z de treball (fins a 1900 m/z). En negreta s'han assenyalat els ions moleculars detectats. (m: monòmer, D: dímer).

Amb els resultats anteriors torna a fer-se palès que el voltatge d'acceleració és un paràmetre instrumental que pot distorsionar l'espectre de masses i conduir a

conclusions equivocades sobre els anàlits estudiats, especialment si són làbils, com els neuropèptids, les metal·loproteïnes, les proteïnes oligomèriques i, d'acord a la informació recopilada en estudis paral·lels a aquesta tesi pel nostre grup de recerca, glicopèptids i glicoproteïnes [60, 187].

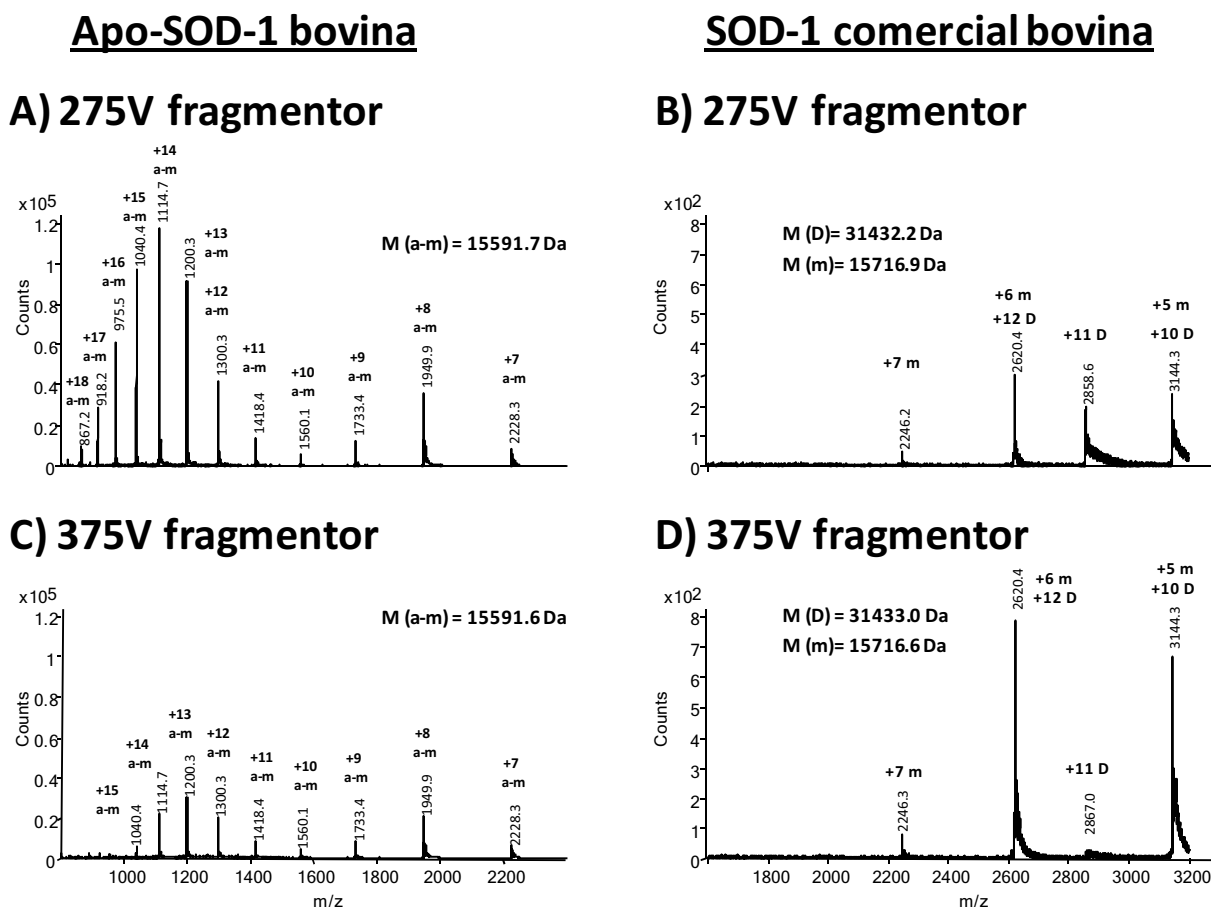


Figura 6.12. Espectre de masses de la solució d'apo-SOD-1 i SOD-1 comercial bovina per CE-TOF-MS a pH neutre i a diferents valors de voltatge d'acceleració: A i B) 275V i C i D) 375V. (a-m: apo-monòmer (desmetal·lada), m: monòmer (metal·lat), D: dímer (metal·lat)).

SOD-1 humana

Com ja s'ha comentat anteriorment, la SOD-1 humana presenta una seqüència aminoacídica amb una gran similitud amb la de la SOD-1 bovina (figura 1.11) però és més complexa perquè s'han descrit més modificacions PTMs (acetilació, pont disulfur, glutatjonització i fosforilació) [14, 48, 176-178].

Una altra dificultat és que no es troba disponible comercialment a un preu raonable, i s'ha d'aïllar a partir dels materials adequats. A l'article 4.2 d'aquesta tesi doctoral (capítol 4), es descriu un procediment per purificar-la a partir dels eritròcits de la

sang, com a pas previ a l'anàlisi per CE-TOF-MS i la posterior aplicació a pacients amb ALS.

Els mètodes d'extracció i purificació de la SOD-1 humana descrits a la bibliografia es van haver d'adaptar per a utilitzar volums de mostra relativament petits (4mL de sang). S'ha de tenir en compte que els pacients amb ALS es deterioren ràpidament i fins i tot és difícil l'extracció de volums petits de sang. Després de centrifugar la sang per separar els eritròcits del plasma, es va procedir a la seva lisi, a la precipitació de l'hemoglobina i a l'extracció, dessalat i preconcentració de la SOD-1. El tractament de mostra proposat és senzill, ràpid, econòmic, permet recuperacions elevades i es pot aplicar simultàniament a més d'una mostra, la qual cosa el fa viable per un estudi a major escala amb mostres de persones sanes (controls) i pacients. Els instruments utilitzats són molt comuns en un laboratori de recerca i al tractar tant poca quantitat de mostra, el consum de reactius és mínim. D'altra banda, existeix cert consens en el fet de que la purificació de la SOD-1 emprant dissolvents orgànics no inactiva l'enzim, el que fa pensar que la seva estructura nativa dimèrica metal·lada es conservaria intacta [153, 188].

Els resultats obtinguts per a la SOD-1 bovina comercial van ser el punt de partida per a l'anàlisi de la SOD-1 humana purificada amb CE-TOF-MS. A la figura 6.13 es mostren els electroferogrames obtinguts per a la SOD-1 humana amb 1M HAc (figura 6.13-A-ii) i amb 10 mM NH₄Ac (pH 7.3, amb NH₃) (figura 6.13-B-ii). Els perfils electroforètics són molt similars als obtinguts per a la SOD-1 comercial bovina per CE-IT-MS i CE-TOF-MS (figures 6.5 i 6.10). També, com era d'esperar, els espectres de masses de la SOD-1 humana són completament diferents en funció del pH del BGE emprat (figura 6.13-A i -B). Amb el BGE àcid els metalls són alliberats de les formes Cu,Zn-SOD-1 i la Cu₂,Zn₂-SOD-1 i l'espectre de masses correspon a les diferents isoformes de l'apo-SOD-1 (a-m, figura 6.13-A). L'excel·lent exactitud i resolució en la mesura de les *m/z* del TOF va permetre la detecció de diferents isoformes de la proteïna (figura 6.13-A i -C): la majoritària amb un grup acetil (15844.8Da) i d'altres minoritàries amb 3 grup acetils (15928.8Da), 1 grup acetil i un grup fosfat (15943.0Da) o un grup acetil i 1 glutatió (16150.0Da). Totes aquestes isoformes, que també presenten el pont disulfur, s'han descrit anteriorment a la bibliografia per a la forma apo-SOD-1 utilitzant ESI-MS i LC-MS [176, 14, 21, 48, 77, 176-178].

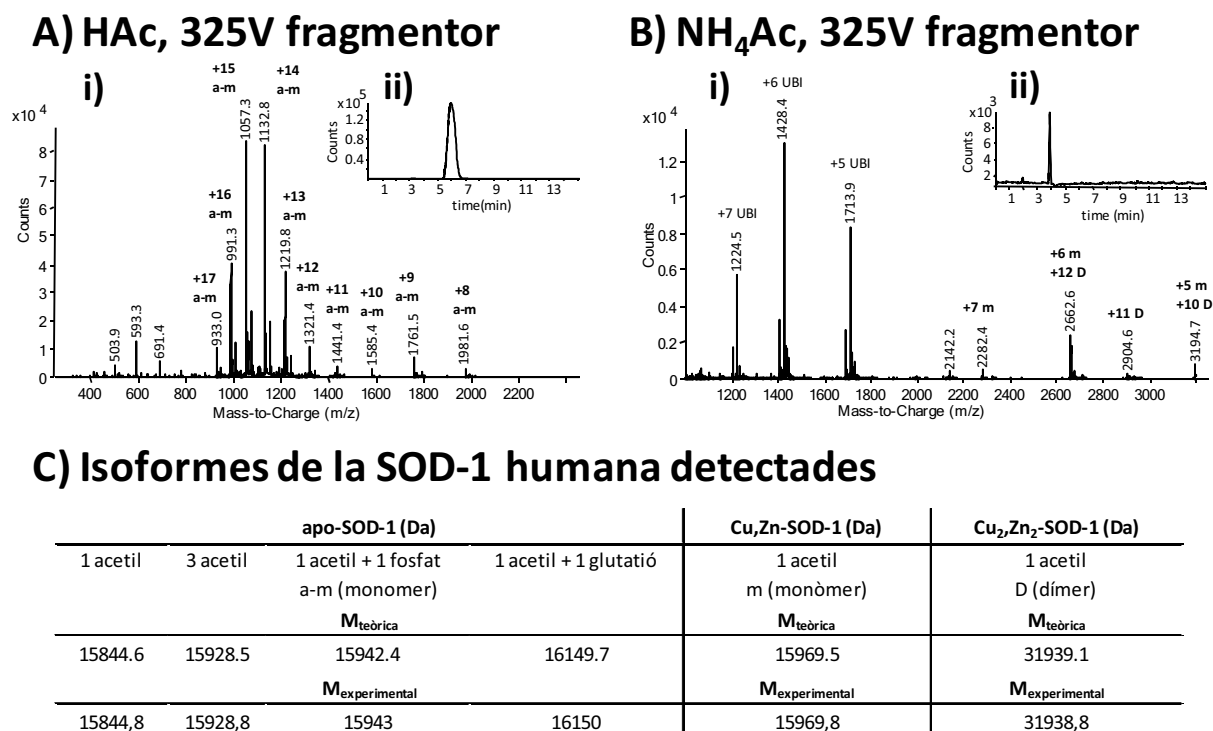


Figura 6.13. Espectre de masses (i) i electroferograma (ii) de la SOD-1 humana utilitzant BGE (A) d' HAc (pH àcid) i (B) de NH₄Ac (pH neutre). C) M experimental de les isoformes de l'apo-SOD-1 detectades per CE-TOF-MS. (a-m: apo-monòmer (desmetal·lada), m: monòmer (metal·lat), D: dímer (metal·lat) i UBI (ubiquitina, impuresa).

La interpretació de l'espectre de la SOD-1 humana, amb el BGE neutre és similar a la de la SOD-1 comercial bovina (figura 6.12). Així es va confirmar la detecció, únicament, de les formes Cu,Zn-SOD-1 i la Cu₂Zn₂-SOD-1 amb un grup acetil, en part, per la menor sensibilitat amb aquest BGE. Novament, tot i que el tractament de mostra, preservaria l'activitat enzimàtica de la SOD-1 purificada [153, 188], no podem assegurar que durant aquesta etapa no es provoqui la dissociació del dímer metal·lat per obtenir el monòmer metal·lat. Per altra banda, s'havia de tornar a considerar la influència del voltatge d'acceleració del TOF als espectres de masses. Aquesta influència sobre l'espectre de masses de la SOD-1 humana es va estudiar a partir de la relació existent entre la intensitat de dos ions moleculars detectats específicament per al Cu,Zn-SOD-1 i la Cu₂Zn₂-SOD-1 (2282, +7 m i 2905, +11 D, figura 6.13-B). Com era d'esperar, l'augment del voltatge d'acceleració provoca la monomerització de la proteïna perquè augmenta la relació d'intensitats d'aquests dos ions moleculars (I₂₂₈₂/I₂₉₀₅, figura 6.14). Entre 250 i 325V s'aconsegueix un bon compromís entre sensibilitat i dissociació, com amb la SOD-1 bovina.

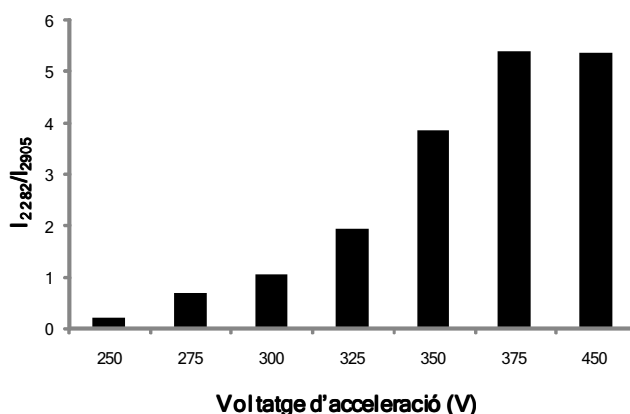


Figura 6.14. Gràfic de barres de la relació entre la intensitat dels ions de m/z nominal 2282 i 2905 de la SOD-1 humana a diferents voltatges d'acceleració.

És important assenyalar que la presència de Cu,Zn-SOD-1 pot significar un contratemps per a la determinació quantitativa acurada de la Cu₂Zn₂-SOD-1, degut a la possibilitat de dissociació del dímer durant el tractament de mostra o en la detecció per CE-TOF-MS. No obstant, això no implicaria cap inconvenient per a la comparació de diferents agrupacions de mostres de controls i pacients amb ALS, si s'utilitza un paràmetre relatiu (I_{2282}/I_{2905}). Si es tracten i s'analitzen totes les mostres de l'estudi de la mateixa forma, un paràmetre que relaciona les concentracions absolutes del dímer i el monòmer hauria de donar informació de suficient rellevància.

6.3.3. Aplicació a mostres de pacients d'ALS

La col·laboració amb la unitat d'ALS de l'HUB, va permetre l'obtenció de mostres de sang d'individus sans i pacients amb ALS per poder realitzar un petit estudi preliminar amb la metodologia analítica desenvolupada.

A la figura 6.15 es mostra el gràfic de barres de la relació d'intensitats entre els ions moleculars +7 m (2282) i +11 D (2905) (I_{2282}/I_{2905}), mesurades sobre els espectres de masses per les mostres de sang control i de pacients amb ALS purificades i analitzades per CE-TOF-MS. Aquestes relacions es presenten per a les isoformes més abundants, amb un grup acetil, amb i sense glutatió (GSH, que és una PTM important en el cas de la SOD-1 humana i un factor diferencial respecte a la SOD-1 bovina), i la mitjana d'ambdós valors. Com pot observar-se, no hi ha una diferència clara entre els dos grups en cap dels casos. A una conclusió similar s'arriba estudiant els

electroferogrames de l'ió extret (EIE) d'aquests ions moleculars o utilitzant les eines de deconvolució i tractament de dades automatitzades del TOF. La limitada separació electroforètica podria influir negativament en l'obtenció d'informació quantitativa acurada sobre el monòmer i el dímer per MS. La impossibilitat de trobar diferències significatives entre les mostres control i els pacients va fer necessària l'aplicació d'una altra tècnica de separació i detecció com l'espectrometria de masses de mobilitat iònica (IM-MS).

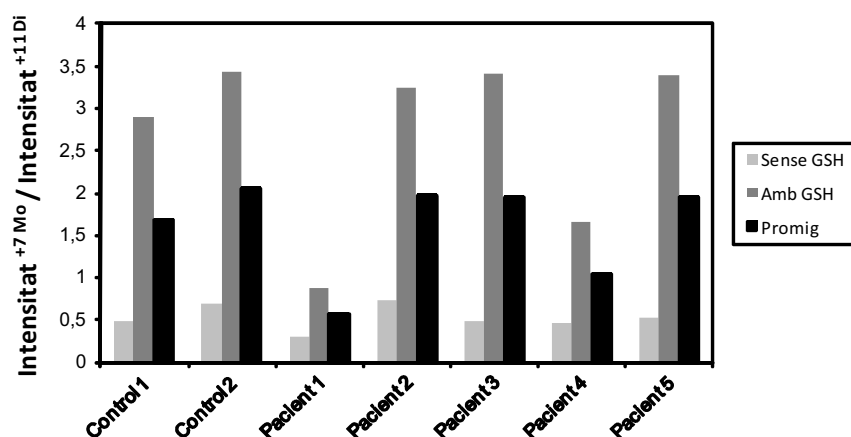


Figura 6.15. Gràfic de barres de les relacions d'intensitat obtingudes per als ions moleculars +7 m i +11 D amb i sense GSH per als controls i els pacients d'ALS (barres grises). La barra de color negre representa la mitjana de les relacions anteriors.

6.4. ANÀLISI DE SOD-1 PER n-ESI-IM-MS

Acabem de veure que en CE-MS, tant el pH del BGE com les condicions de la detecció per ESI-MS, són crítiques per preservar les interaccions no covalents a les metal·loproteïnes oligomèriques i el mateix podia passar amb altres associacions proteïques i els seus lligands [123, 146]. Un altre desavantatge de l'ESI-MS rau en que és incapaç de distingir dos ions amb idèntica relació m/z pertanyents a molècules diferents. Això dificulta la interpretació dels espectres de masses de proteïnes que existeixen com a mescles de monòmers, dímers i altres oligòmers, perquè fins a cert punt, els seus espectres de masses es troben solapats [189, article 3, article 4.2] tal i com hem pogut observar amb la SOD-1 tant bovina com humana (figures 6.5, 6.6, 6.11, 6.12 i 6.13).

L'espectrometria de mobilitat iònica (IM) és una tècnica que separa els ions en fase gas en funció de la seva mobilitat iònica, que depèn de la seva relació mida-càrrega. Acoblada en línia a l'ESI-MS permet separar i caracteritzar isòmers, confòrmers i ions de la mateixa m/z però amb mobilitats iòniques diferents [145-146, 190]. A més, habitualment s'utilitzen interfases d'ionització nano-electrosprai (n-ESI) amb els avantatges que ja s'apuntaven a la introducció d'aquesta tesi.

En aquesta secció, es demostra que la metodologia de n-ESI-IM-MS desenvolupada proporciona informació rellevant sobre l'abundància relativa de les formes Cu₂Zn-SOD-1 i Cu₂Zn₂-SOD-1, que pot ser útil per a l'estudi de mostres de pacients amb ALS.

6.4.1. Optimització dels paràmetres instrumentals

A la introducció s'ha indicat que la IM-MS proporciona informació en tres dimensions sobre els ions en fase gas detectats: temps de deriva, m/z i intensitat. A mode d'exemple, la figura 6.16 mostra la informació que proporciona la tècnica per a l'anàlisi de la SOD-1 bovina.

La figura 6.16 es troba dividida en tres gràfics diferenciats. El primer (figura 6.16-A) es correspon amb el gràfic de corbes de nivell de la intensitat dels ions moleculars detectats, segons els seus valors de m/z i temps de deriva. La intensitat màxima es correspon amb el color groc. Als valors amb massa nominal 2620 i 3144 s'observen dues senyals diferenciades indicant que se separen dos ions moleculars amb la mateixa m/z però amb diferent mobilitat iònica (+6 m/+12 D i +5 m/+10 D, respectivament). Amb ESI-MS això no era possible. El segon gràfic (figura 6.16-B) es correspon amb el perfil de la mobilitat iònica extreta (EIM) on es representa el temps de deriva per als ions moleculars detectats en diferents intervals de m/z . Seguint un paral·lelisme amb la CE-MS serien els EIEs. D'acord al que s'observa al mapa de relleu es poden observar dos pics diferenciats per als ions amb la mateixa m/z (2620 i 3144) deguts al monòmer i al dímer, perquè tenen diferent mobilitat iònica. Per últim, el gràfic de la figura 6.16-C es correspon amb l'espectre de masses de la suma total dels ions moleculars detectats.

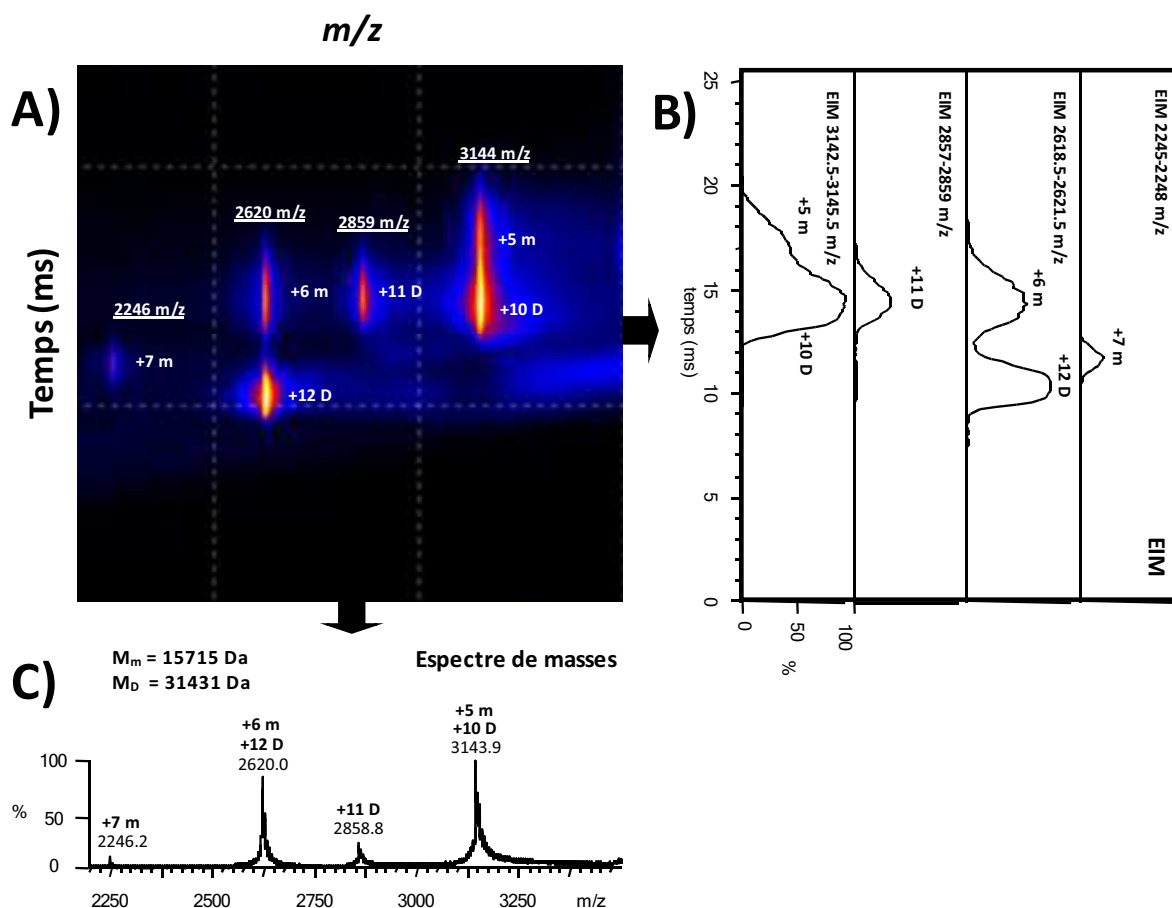


Figura 6.16. Informació obtinguda per n-ESI-IM-MS de la SOD-1 bovina comercial. A) Gràfic de corbes de nivell dels ions moleculars detectats. B) Perfil de l'EIM. C) Espectre de masses total.

Un dels grans avantatges de les fonts de n-ESI, és la gran eficàcia de la ionització, el que va permetre analitzar directament les mostres de SOD-1 bovina i humana en solució de NH_4Ac a concentracions de 10, 50 i 100mM i pH neutre (7.3 ajustat amb NH_3), tot i que no es van observar diferències significatives en funció de la concentració de sal emprada.

Per obtenir resultats en condicions òptimes, s'han d'avaluar tota una sèrie de paràmetres relacionats amb la detecció per n-ESI-IM-MS. L'activació correcta dels anàlits dins de l'espectròmetre de masses augmenta la sensibilitat, l'exactitud i la resolució [145, 191]. Aquesta energia d'activació s'aconsegueix mitjançant els voltatges d'injecció, en el nostre cas el "*trap collision energy*" i el "*cone voltage*". Per a reduir l'energia molecular interna, s'utilitza un gas a la pressió apropiada (les interaccions no covalents poden trencar-se si la pressió del gas és molt baixa i insuficient per disminuir l'energia interna de les molècules a través de col·lisions

[192]). Amb la SOD-1 es va treballar a una pressió de N_2 de 5.83mbar, però no es van trobar diferències significatives treballant a una pressió de fins a 2.1mbar. La influència dels voltatges d'injecció s'explica a continuació per a la SOD-1 bovina i humana.

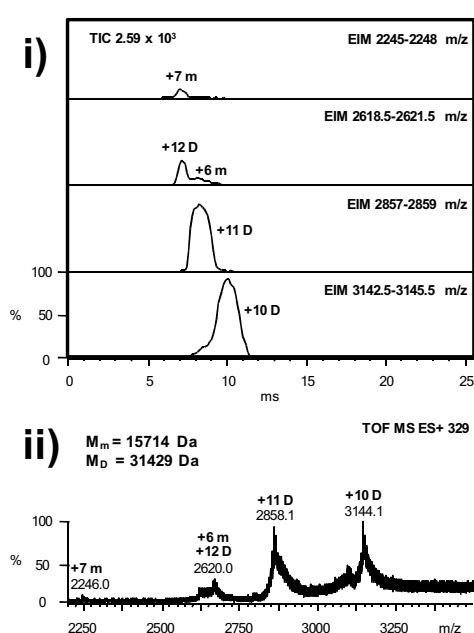
6.4.2. Anàlisi de SOD-1 bovina

La SOD-1 bovina es va analitzar com a punt de partida a la caracterització de la SOD-1 humana. La figura 6.17-A i -B mostren els espectres de masses obtinguts per a la SOD-1 bovina comercial a 10 i 50V de “*trap collision energy*”, respectivament. L'espectre de masses total obtingut per n-ESI-IM-MS (figures 6.17-A-ii i 6.17-B-ii) és molt similar al produït per CE-TOF-MS (article 4.2). Una altra vegada, tenint en compte els valors de m/z que es troben a les taules de les figures 6.6-B i 6.11-B, és fàcil deduir que els clústers d'ions multicarregats deguts a les formes Cu,Zn-SOD-1 (m, monòmer) i Cu_2,Zn_2 .SOD-1 (D, dímer) de la SOD-1 bovina es troben superposats als espectres de masses. Les millors S/N s'obtenen amb 50V excepte per l'ió +11 de la forma dimèrica (+11 D) que disminueix d'intensitat dràsticament en comparació amb els ions adjacents (+6 m//+12 D i +5 m//+10 D). Això pot ser degut a la dissociació del dímer durant l'activació com ja vam veure que passava en funció de les condicions experimentals en CE-TOF-MS (article 4.2).

Amb la comparació dels EIMs es pot arribar a la mateixa conclusió sobre la dissociació del dímer (figures 6.17-A i -B (i)). L'assignació dels ions moleculars +7 m i +11 D és molt senzilla ja que només es detectava un pic. Es té en compte una altra vegada que els “ions de càrrega senar” del dímer, com el +11 D, són específics de la forma Cu_2,Zn_2 .SOD-1 (taules de les figures 6.6-B i 6.11-B). Com no es detecta l'ió el +13 D (figura 6.17-A-ii), és impossible detectar el +14 D que té el mateix valor de m/z que el +7 m. L'EIM corresponent a l'ió 2620 m/z conté dos pics diferents. El primer correspon al dímer (+12 D) i el segon al monòmer (+6 m). Així, els ions del dímer tenen una mobilitat iònica inferior degut a que la seva relació mida/càrrega és inferior (en general, la mida d'un dímer és inferior a dues vegades la del monòmer). Si considerem els ions de diferent càrrega (per exemple: +10 D, +11 D i +12 D), el temps de deriva per als ions disminueix amb l'augment de la càrrega (figura 6.17-A-i). Tot i que a l'augmentar la repulsió coulombiana amb la càrrega, la mida de l'ió augmenta,

predomina l'increment de la càrrega per explicar la mobilitat iònica superior [123, 160, 191-192]. L'EIM corresponent a l'ió de 3144 m/z conté una única senyal que es pot assignar a l'ió molecular +10 D, perquè l'ió molecular +5 m seria indetectable a 10V, però es comença a detectar a 50V degut a la dissociació del dímer durant l'activació (figura 6.17-B-i). Una cosa similar passa amb el +6 m (2620 m/z). De la mateixa manera, la intensitat de l'ió molecular +11 D (2858 m/z) disminueix degut a la dissociació del dímer amb l'augment de l'energia d'activació.

A) SOD-1 bovina comercial 10V of trap collision energy



B) SOD-1 bovina comercial 50V of trap collision energy

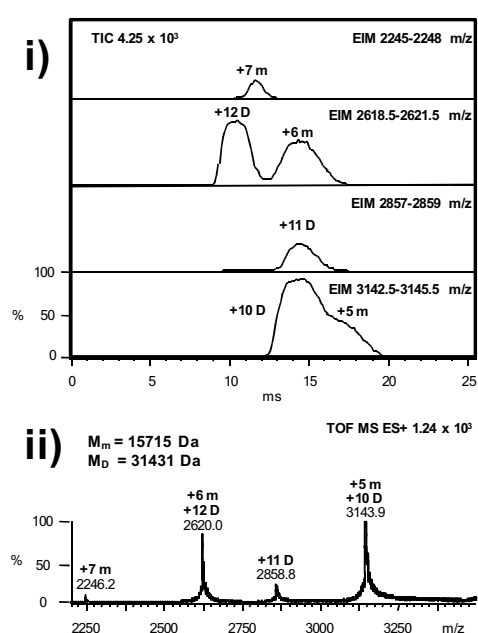


Figura 6.17. Perfil de l'EIM (i) i espectre de masses total (ii) per a la SOD-1 bovina comercial a 10V (A) i 50V (B) de "trap collision energy". ("Cone voltage" = 20V).

Com s'ha comprovat, l'augment de l'energia durant l'activació pot induir la dissociació, però també canvis de conformació [144, 191]. Així, tots els temps de deriva i l'amplada dels pics augmenten a 50V en relació als obtinguts a 10V (figura 6.17). Per una banda, els ions viatjarien més lentament perquè l'energia molecular interna i les col·lisions augmenten. Per altra banda, els pics més amples indicarien la generació de multitud d'intermedis desplegats [145]. Per aquest motiu, s'hauria d'evitar una activació excessiva. Els intermedis desplegats serien estructures poc probables de trobar en solució. L'activació ocorre en fase gas i en un medi on la solvatació i les forces coulombianes tenen magnituds molt diferents a les existents en solució [145].

L'activació també es va estudiar analitzant la SOD-1 bovina comercial a diferents valors de “*cone voltage*” i 10V de “*trap collision energy*”. Els EIMs i els espectres de masses obtinguts entre 20 i 90V no presentaven gaires variacions. La figura 6.17-A es correspon amb un “*cone voltage*” de 20V. Per sobre de 120V, els EIM i els espectres de masses s'assemblaven als de la figura 6.17-B (que es correspon amb una “*trap collision energy*” igual a 50V) cosa que suggeria la dissociació del dímer. A 200V, l'ió +11 D era pràcticament indetectable.

6.4.3. Anàlisi de SOD-1 humana

A la SOD-1 purificada a partir de sang humana, es van realitzar experiments similars als anteriors en els que la “*trap collision energy*” es va avaluar entre 10 i 150V fixant el “*cone voltage*” a 20V. Mentre que amb la SOD-1 bovina el valor llindar per a començar a observar la dissociació era de 50V, per a la SOD-1 humana aquest va augmentar fins a 150V. Treballant a 90V, la SOD-1 humana no es dissociava quan el “*cone voltage*” es va estudiar en l'interval entre (20–200V). Tot això indica una major estabilitat de la SOD-1 humana en l'anàlisi per n-ESI-IM-MS.

A la figura 6.18 es mostren els espectres de masses obtinguts per a la SOD-1 humana del mateix individu sa mitjançant CE-TOF-MS (figura 6.18-A-i) i n-ESI-IM-MS (figura 6.18-B-i). Com es pot observar, l'interval de m/z de treball amb IM-MS és molt més ampli que amb CE-TOF-MS, on no es podia mesurar a alta resolució per sobre de 3200 m/z . A més, en IM-MS l'espectre de masses de la SOD-1 es troba desplaçat cap a valors de m/z superiors degut a les condicions d'ionització més suaus. Així, per una banda s'han de considerar les diferents condicions instrumentals dels detectors i per l'altra, que en n-ESI-IM-MS no s'utilitza un solvent hidroorgànic àcid com el líquid auxiliar que es fa servir en CE-MS [189]. Aquests ions de m/z superiors corresponents a la Cu_2Zn_2 -SOD-1 es detecten en n-ESI-IM-MS amb bona exactitud de massa i resolució. El pic corresponent a un valor de m/z de 2662 (+6 m/+12 D) s'ha ampliat en cada un dels dos espectres de masses per a demostrar la detecció de diferents isoformes de la SOD-1 humana, que contenen el pont disulfur i d'una a tres acetilacions, en presència i absència de GSH.

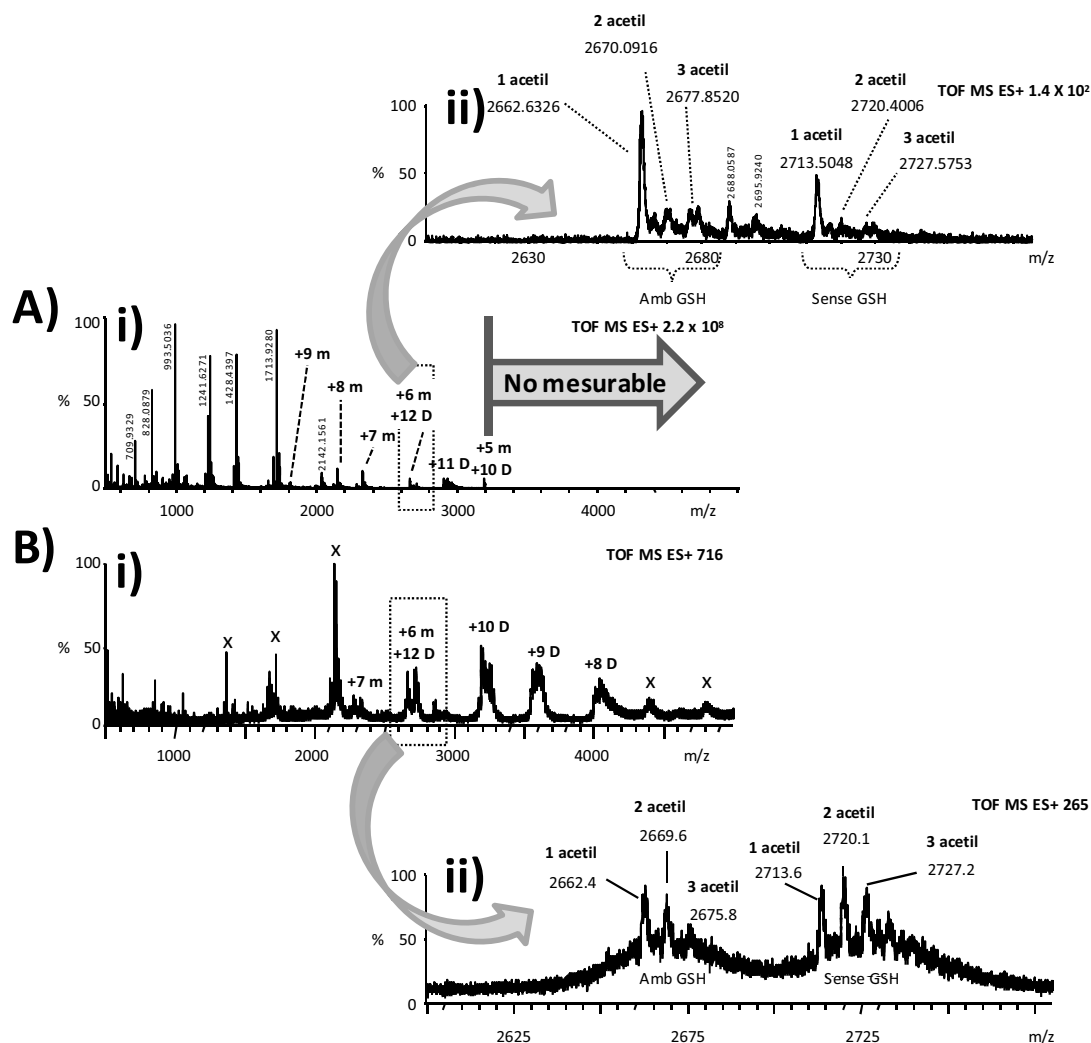


Figura 6.18. Espectre de masses de la SOD-1 humana d'un individu sà (i) i ampliació del pic corresponent a l'ió molecular amb m/z 2662 (ii). A) CE-TOF-MS (250V de voltatge d'acceleració). B) n-IM-MS (90V de "trap collision energy" i 20V de "cone voltage").

Seguint un raonament semblant al realitzat amb la SOD-1 bovina (figura 6.17), va ser relativament senzill identificar els diferents ions moleculars de l'espectre de masses alhora de confirmar la presència de les formes Cu,Zn-SOD-1 i Cu₂Zn₂-SOD-1 amb i sense GSH com es mostra a la figura 6.19. Les petites diferències entre els valors del temps de deriva, que s'han inserit sobre els ions +6 m i +9 D a les figures 6.19-A i -B, que es detecten específicament per al monòmer i el dímer respectivament, suggereixen que la presència del GSH promou canvis conformacionals que afecten significativament la mida dels ions en fase gas. Tot i això, la diferència de mobilitat iònica no seria suficient per a separar completament els ions moleculars amb la mateixa càrrega de les dues isoformes (+6 m: 10.52ms vs 10.77ms, amb i sense GSH, respectivament).

A) SOD-1 humana sense GSH B) SOD-1 humana amb GSH

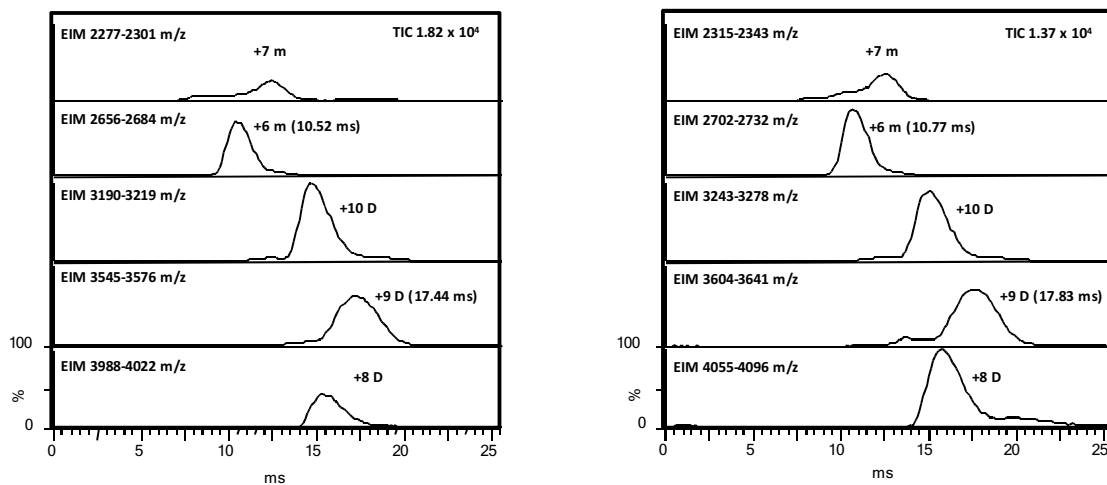


Figura 6.19. Perfil de l'EIM per a la SOD-1 humana obtinguda a 90V de "trap collision energy" i 20V de "cone voltage" considerant les isoformes sense GSH (A) i amb GSH (B).

6.4.4. Aplicació a mostres de pacients d'ALS

Amb la finalitat d'aclarir si hi ha diferències significatives en la quantitat de $\text{Cu}_2\text{Zn-SOD-1}$ i $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$, entre individus sans i pacients amb ALS, i obtenir informació que permeti estudiar si la monomerització de la proteïna pot estar relacionada amb l'oligomerització que precedeix a l'agregació, es va realitzar un estudi preliminar amb un petit grup control i de malalts.

En les condicions òptimes de mesura, es van seleccionar els ions moleculars +6 m i +9 D de les isoformes amb i sense GSH per a les comparacions dels dos grups, ja que són específics de la $\text{Cu}_2\text{Zn-SOD-1}$ i de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$, respectivament. A més, tenen valors de m/z i temps de deriva molt diferents. A la taula 6.3 es mostra el valor del temps de deriva dels pics detectats en els perfils d'EIM corresponents als ions moleculars monitoritzats, en individus sans i pacients d'ALS. Com es pot observar, i tal com s'ha indicat anteriorment (figura 6.19-A i -B), els temps de deriva són lleugerament inferiors per a les isoformes sense GSH i la repetitivitat és bona en tots els casos. A la figura 6.20-A es mostra un gràfic de barres on es representen les relacions entre les àrees obtingudes als EIM per als pics dels ions +6 m i +9 D, amb i sense GSH, així com la mitjana de les dues relacions. Com ja havíem apuntat en els estudis amb CE-TOF-MS, aquesta relació és útil per avaluar les abundàncies relatives

del monòmer i del dímer metal·lats. Com que es tracta d'un paràmetre relatiu, és més útil per a la comparació ja que les diferències degudes a la matriu de la mostra, la ionització o les concentracions absolutes es minimitzen.

Mostra	Cu,Zn-SOD-1		Cu ₂ Zn ₂ -SOD-1	
	Temps de deriva +6 m (ms)		Temps de deriva +9 D (ms)	
	Sense GSH	Amb GSH	Sense GSH	Amb GSH
Control 1	10.52	10.77	17.31	17.70
Control 2	10.52	10.77	17.44	17.83
Pacient 1	10.52	10.90	17.70	18.08
Pacient 2	10.39	10.65	17.70	18.08
Pacient 3	11.03	11.16	18.34	18.60
Pacient 4	10.90	11.03	17.83	18.21
Pacient 5	10.90	11.03	17.83	18.21
MITJANA	10.68	10.90	17.74	18.10
s	0.25	0.18	0.33	0.29

Taula 6.3. Valor del temps de deriva dels pics detectats en els perfils d'EIM corresponents al +6 m i +9 D, amb i sense GSH, en mostres de sang humana d'individus sans i pacients amb ALS. (s = desviació estàndard).

Tal i com es pot observar, la mitjana de les relacions d'àrees de les isoformes amb o sense GSH per als controls és similar. Aquest valor augmenta significativament per a totes les mostres de pacients excepte per al pacient 3, indicant que, en general, tenint en compte la mitjana de les abundàncies relatives de les isoformes amb i sense GSH, hi ha una major presència de la forma monomèrica metal·lada als pacients amb ALS. Com ja s'ha explicat a la secció anterior (6.3.3) i com es mostra una altra vegada a la figura 6.20-B, un estudi similar per CE-TOF-MS no va permetre diferenciar els dos grups de mostres. A diferència del que passa en CE-TOF-MS, aquí els ions +6 m i +9 D sí es troben separats completament en a primera dimensió perquè tenen mobilitats iòniques diferents. En aquests moments, sense fer un estudi més ampli i amb més informació sobre les mostres de pacients, és difícil explicar perquè la quantitat de Cu,Zn-SOD-1 present en les mostres de la majoria de pacients és major considerant la mitjana de les dues isoformes o perquè el comportament amb o sense GSH és uniforme. En tot cas, aquests resultats assenyalen la importància de realitzar estudis més amplis amb una acurada selecció de les mostres del grup control i el dels pacients. Paral·lelament, també es podrien realitzar estudis per a monitoritzar el procés d'oligomerització *in-vivo* i *in-vitro* en diferents teixits d'animals mutants amb

l'objectiu de poder dilucidar si aquest procés és el responsable de l'agregació de la proteïna.

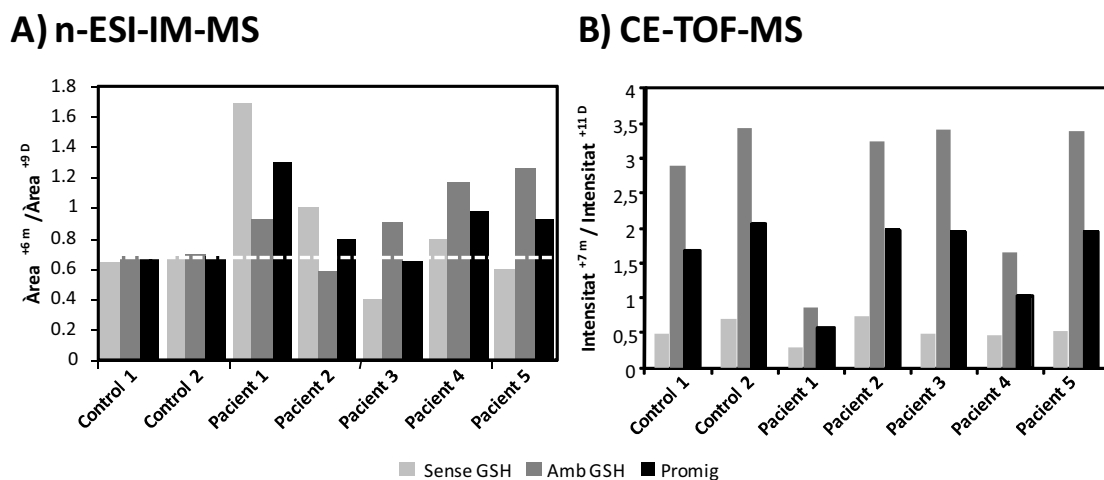


Figura 6.20. A) Gràfic de barres de la relació entre les àrees obtingudes per als pics corresponents als ions moleculars +6 m i +9 D dels EIM amb i sense GSH per als controls i els pacients d'ALS (barres en gris). La barra negra representa la mitjana de les relacions anteriors. B) Gràfic de barres de les relacions d'intensitat obtingudes per als ions moleculars +7 m i +11 D amb i sense GSH per als controls i els pacients d'ALS (barres grises). Promig de la relació de les dues isoformes (amb i sense GSH) (barra negra). La barra negra representa la mitjana de les relacions anteriors.

6.5. TREBALLS FUTURS

Els treballs realitzats en el transcurs d'aquesta tesi doctoral es poden considerar els primers passos cap a estudis molt més complexos. Entre ells es destaquen:

- Purificar suficient quantitat de PrP^C per abordar el seu estudi, així com el del PrP^{Sc} (en instal·lacions habilitades amb el nivell de seguretat biològica adequat) per CE-TOF-MS i n-ESI-IM-MS.
- Estudiar altres matrius (p.e. matrius iòniques líquides) o mètodes de preparació de mostra que permetin preservar l'estructura de les proteïnes i pèptids làbils en MALDI-TOF-MS [193].
- Modificar les condicions del buit, emprant vàlvules adequades a les primeres regions de l'espectròmetre de masses per assegurar que en ESI-MS la dissociació no té lloc en fase gas després de la ionització i la desolvatació, i abans d'arribar a l'analitzador [194-195].

- Treballar amb interfases “*sheathless*” (sense líquid auxiliar) de n-ESI per CE-MS que permetin millorar els resultats amb CE-TOF-MS i interfases de líquid auxiliar (*sheath-flow*) [196-197].
- Establir altres tractaments de mostra per purificar la SOD-1 humana de diferents materials biològics assegurant que es preservi tant l’activitat enzimàtica com l’estructura dimèrica metal·lada [187].
- Realitzar un estudi comparatiu amb un major nombre de mostres i de diferents teixits, per treure conclusions definitives sobre la monomerització de la SOD-1 i la seva relació amb l’ALS.

CAPÍTOL 7. CONCLUSIONS

- S'ha desenvolupat una metodologia per a l'extracció i purificació del príó cel·lular (PrP^C) a partir de cervell boví basada en mètodes convencionals. La concentració dels extractes finals és insuficient per a la caracterització del PrP^C amb les tècniques de separació d'alta resolució disponibles actualment. Més concretament:
 - La cromatografia d'exclusió molecular (SEC) podria ser substituïda per ultracentrifugació amb filtres de tall per pes molecular (MWCO). Això suposaria un estalvi de temps molt significatiu i una reducció de la dilució dels extractes finals.
 - L'ús de columnes de 20mL en la cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC) és recomanable per l'elevada concentració de proteïna en les etapes intermèdies.
 - La metodologia es podria aplicar a escala preparativa, per a obtenir una quantitat de PrP^C suficient per a la seva caracterització.
- Les condicions experimentals per a espectrometria de masses amb font d'ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS) estudiades en aquesta tesi doctoral no són apropiades per a l'estudi de proteïnes intactes làbils com la metal·loproteïna homodimèrica superòxid dismutasa 1 (Cu₂Zn₂-SOD-1).
- S'ha desenvolupat una alternativa a l'anàlisi de la Cu₂Zn₂-SOD-1 per espectrometria de masses amb font d'electrosprai (ESI-MS) i cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS) basada en l'electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses (CE-MS). En aquest sentit es pot concloure que:
 - La utilització d'un electròlit de separació (BGE) àcid permet l'estudi de la forma totalment desmetal·lada d'aquesta proteïna (apo-SOD-1). A més, la sensibilitat de la detecció en mode positiu és superior respecte al BGE neutre, per la qual cosa es poden detectar millor les isoformes. Els resultats obtinguts en aquestes condicions són molt similars als obtinguts per ESI-MS i LC-MS.
 - L'ús d'un BGE neutre permet la conservació de l'estructura dimèrica i totalment metal·lada de l'enzim. Això proporciona informació sobre la

monomerització complementària a l'obtinguda amb el BGE àcid, i que fins al moment, no s'havia descrit per ESI-MS i LC-MS.

- Les condicions instrumentals de l'espectròmetre de masses amb analitzador de temps de vol amb acceleració ortogonal (oa-TOF) influeixen de manera molt significativa en els espectres de masses adquirits. Una selecció adequada del voltatge d'acceleració ("*fragmentor voltage*") es molt convenient per evitar conclusions errònies sobre anàlits especialment làbils. És important destacar que:
 - En l'anàlisi de molècules de baix pes molecular, la fragmentació pot ser una bona eina per a obtenir informació estructural addicional que permeti la identificació inequívoca de l'anàlit en una mostra complexa.
 - En l'anàlisi de molècules de pes molecular elevat, com poden ser les metal·loproteïnes i les proteïnes oligomèriques, una selecció adequada dels paràmetres instrumentals és fonamental per evitar conclusions incorrectes en quant a l'estructura dels anàlits.
- L'espectrometria de masses de mobilitat iònica amb font de nano electrosprai (n-ESI-IM-MS) podria ser una bona alternativa a les tècniques de separació d'alta resolució acoblades a l'espectrometria de masses (LC-MS i CE-MS) per a l'estudi de proteïnes complexes com la SOD-1. Cal remarcar que:
 - La capacitat de n-ESI-IM-MS de separar ions moleculars amb el mateix valor de m/z però amb mobilitat iònica diferent, fa que sigui una tècnica molt apropiada per a l'estudi de proteïnes oligomèriques i altres associacions proteiques complexes.
 - Els voltatges d'activació ("*cone voltage*" i "*trap collision energy*") s'han de seleccionar adequadament d'acord a l'estabilitat de la substància analitzada.
 - Per primera vegada s'ha desenvolupat una metodologia de n-ESI-IM-MS que es pot aplicar a l'estudi de malalties caracteritzades per l'agregació de les proteïnes, com l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS). S'ha realitzat un estudi amb mostres de sang d'individus sans i de pacients amb l'objectiu d'avaluar la seva viabilitat per elucidar els mecanismes moleculars de l'agregació relacionats amb les modificacions post-transduccionals (PTMs) o la monomerització.

CAPÍTOL 8. BIBLIOGRAFIA

- [1] Introduction to genomics. **Del Giacco L., Cattaneo C.** *Methods Mol Biol.* 823 (2012) 79-88.
- [2] Capillary electrophoresis-mass spectrometry: recent trends in clinical proteomics. **Desiderio C., Rossetti D. V., Iavarone F., Messina I., Castagnola M.** *J Pharm Biomed Anal.* 53 (2010) 1161-1169.
- [3] Capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics. **Herrero M., Ibañez E., Cifuentes A.** *Electrophoresis* 29 (2008) 2148–2160.
- [4] Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis. **Fonslow B. R., Yates J. R. 3rd.** *J Sep Sci.* 32 (2009) 1175-1188.
- [5] Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. **Stutz H.** *Electrophoresis.* 26 (2005) 1254-1290.
- [6] *Clinical Proteomics: From Diagnosis to Therapy.* **Van Eyk J. E., Dunn M. J.,** Wiley-VCH, Weinheim, (2008).
- [7] *Proteomics and peptidomics : new technology platforms elucidating biology.* **Marko-Varga G., Elsevier,** Amsterdam, (2005).
- [8] *Metabolome Analyses : Strategies for Systems Biology.* **Vaidyanathan S., Harrigan G. G., Goodacre R.** Springer Science & Business Media, New York, (2005).
- [9] *Lehninger principles of biochemistr.* **Nelson D. L., Cox M. M.** 5a Edición, W.H. Freeman and Co., New York, (2008).
- [10] Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **Staub A., Guillarme D., Schappler J., Veuthey J. L., Rudaz S.** *J Pharm Biomed Anal.* 55 (2011) 810-822.
- [11] Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Biomarkers Definitions Working Group.** *Clin Pharmacol Ther.* 69 (2001) 89-95.
- [12] Preparation and Investigation of Bioactive Transferrin-Iron Complexes Formed with Different Synergistic Anions. **Gálicza J., Vargová A., Sándor V., Orbán C. K., András C. D., Abrahám B., Lányi S., Kilár F.** *Protein J.* 31 (2012) 27-34.
- [13] Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. **Wu J. J., Weis M. A., Kim L. S., Eyre D.R.** *J Biol Chem.* 285 (2010) 18537-18544.
- [14] Identification of two novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene with familial amyotrophic lateral sclerosis: mass spectrometric and genomic analyses. **Sato T., Yamamoto Y., Nakanishi T., Fukada K., Sugai F., Zhou Z., Okuno T., Nagano S., Hirata S., Shimizu A., Sakoda S.** *J Neurol Sci.* 218 (2004) 79-83.

- [15] Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis-electrospray-ion trap mass spectrometry. **Giménez E., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** *Electrophoresis*. 29 (2008) 2161-2170.
- [16] High resolution separation methods for the determination of intact human erythropoiesis stimulating agents. A review. **Girard M., Puerta A., Diez-Masa J. C., de Frutos M.** *Anal Chim Acta*. 713 (2012) 7-22.
- [17] *Bioquímica*. **Mathews C. K., Van Hole K. E., Ahern K. G.** 3ª Edició. Pearson Educación, S. A., Madrid (2002).
- [18] Alpha-1-acid glycoprotein. **Fournier T., Medjoubi-N N., Porquet D.** *Biochim Biophys Acta*. 1482 (2000) 157-171.
- [19] Isoform differentiation of intact AGP from human serum by capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Ongay S., Neusüss C.** *Anal Bioanal Chem*. 398 (2010) 845-855.
- [20] Direct Chiral Separations by Capillary Electrophoresis Using Capillaries Packed with an α -Acid Glycoprotein Chiral Stationary Phase. **Li S., Lloyd D. K.** *Anal. Chem*. 65 (1993) 3604-3690.
- [21] Swiss-Prot Protein knowledgebase. <http://www.uniprot.org/uniprot>
- [22] Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Lin M. T., Beal M. F.** *Nature*. 443 (2006) 787-795.
- [23] Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. **Eliezer D., Kutluay E., Bussell R. Jr., Browne G.** *J Mol Biol*. 307 (2001) 1061-1073.
- [24] Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. **El-Agnaf O. M., Irvine G. B.** *J Struct Biol*. 130 (2000) 300-309.
- [25] Metalloproteins and neuronal death. **Brown D. R.** *Metallomics*. 2 (2010) 186-194.
- [26] Purification of human prostatic-specific antigen (hPSA) from seminal plasma by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody anti total PSA. **Pérez L., Zulueta O., Melchor A., Hernández L., López R., Cazanave J., Béquer D.** *Hybridoma* 30 (2011) 247-251.
- [27] Human prostate-specific antigen: structural and functional similarity with serine proteases. **Watt K. W., Lee P. J., M'Timkulu T., Chan W. P., Loor R.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 83 (1986) 3166-3170.
- [28] Protein Misfolding in Disease: Cause or Response? **Howlett D. R.** *Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents*. 3 (2003) 371-383.

- [29] Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. **Burdick D., Soreghan B., Kwon M., Kosmoski J., Knauer M., Henschen A., Yates J., Cotman C., Glabe C.** *J Biol Chem.* 267 (1992) 546-554.
- [30] The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. **Smith D. G., Cappai R., Barnham K. J.** *Biochim Biophys Acta.* 1768 (2007) 1976-1990.
- [31] Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in human brain: aging-associated increases in holoprotein and in a proteolytic fragment. **Nordstedt C., Gandy S. E., Alafuzoff I., Caporaso G. L., Iverfeldt K., Grebb J. A., Winblad B., Greengard P.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 8910-8914.
- [32] Erythropoietin: physiology and pharmacology update. **Fisher J. W.** *Exp Biol Med* 228 (2003) 1-14.
- [33] Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. **Goodnough L. T., Skikne B., Brugnara C.** *Blood.* 96 (2000) 823-833.
- [34] Assessment of the suitability of a capillary zone electrophoresis method for determining isoform distribution of erythropoietin. **Bristow A., Charton E.** *Pharmaceutica.* 11 (1999) 296.
- [35] Post-translational modifications of hemoglobin. **Bunn H. F.** *Haematologia* 17 (1984) 179-186.
- [36] Binding of dihydromyricetin to human hemoglobin: Fluorescence and circular dichroism studies. **Chen T., Zhu S., Shang Y., Ge C., Jiang G.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 93 (2012) 125-130.
- [37] Dissociation of human hemoglobin by the ureas and amides. Osmotic pressure and light scattering studies. **Elbaum D., Herskovits T. T.** *Biochemistry.* 13 (1974) 1268-1278.
- [38] What is hemoglobin A1c? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **Peterson K. P., Pavlovich J. G., Goldstein D., Little R., England J., Peterson C. M.** *Clin Chem.* 44 (1998) 1951-1958.
- [39] Analysis of single cells with capillary electrophoresis electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Hofstadler S. A., Severs J. C., Smith R. D., Swanek F. D., Ewing A. G.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10 (1996) 919-922.
- [40] Expression and characterization of full-length human huntingtin, an elongated HEAT repeat protein. **Li W., Serpell L. C., Carter W. J., Rubinsztein D. C., Huntington J. A.** *J Biol Chem.* 281 (2006) 15916-15922.

- [41] Quantitative and qualitative analysis of cellular prion protein (PrP(C)) expression in bovine somatic tissues. **Peralta O. A., Eyestone W. H.** *Prion*. 3 (2009) 161-170.
- [42] Decreased brain copper due to copper deficiency has no effect on bovine prion proteins. **Legleiter L. R., Ahola J. K., Engle T. E., Spears J. W.** *Biochem Biophys Res Commun*. 352 (2007) 884-888.
- [43] The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: Zn²⁺ alters the distribution of Cu²⁺ coordination modes. **Walter E. D., Stevens D. J., Visconte M. P., Millhauser G. L.** *J Am Chem Soc*. 129 (2007) 15440-15441.
- [44] Prion diseases and the BSE crisis. **Prusiner S. B.** *Science*. 278 (1997) 245-251.
- [45] Metalation States versus Enzyme Activities of Cu, Zn-Superoxide Dismutase Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Yamazaki Y., Takao T.** *Anal. Chem*. 80 (2008) 8246–8252.
- [46] A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Sun Y., Oberley L. W., Li Y.** *Clin Chem*. 34 (1988) 497-500.
- [47] Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu,Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. **Nuevo Ordoñez Y., Montes-Bayón M., Blanco-González E., Sanz-Medel A.** *Anal Chem*. 82 (2010) 2387-2394.
- [48] Detection and characterization of variant and modified structures of proteins in blood and tissues by mass spectrometry. **Shimizu A., Nakanishi T., Miyazaki A.** *Mass Spectrom Rev*. 25 (2006) 686-712.
- [49] Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Fraga C. G.** *Mol Aspects Med*. 26 (2005) 235-244.
- [50] Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. **Sanz-Nebot V., Balaguer E., Benavente F., Neusüss C., Barbosa J.** *Electrophoresis*. 28 (2007) 1949-1957.
- [51] The Role of Biomarkers in the Treatment of Alcohol Use Disorders. *Substance Treatment Advisory*. 4 (2006) Issue 4..
- [52] Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. **Evans R. W., Kong X., Hider R. C.** *Biochim Biophys Acta*. 1820 (2012) 282-290.
- [53] Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. **Arndt T.** *Clin Chem*. 47 (2001) 13-27. Review.
- [54] Characterization and stability of transthyretin isoforms in cerebrospinal fluid examined by immunoprecipitation and high-resolution mass spectrometry of intact protein.

- Poulsen K., Bahl J. M., Tanassi J. T., Simonsen A. H., Heegaard N. H.** *Methods*. 56 (2012) 284-292.
- [55] Proteomic characterization of amyloid deposits in transthyretin amyloidosis associated with various mutations. **Valentini V., Lavatelli F., Obici L., Donadei S., Perlini S., Palladini G., Merlini G.** *Amyloid*. 18 (2011) 56-58.
- [56] Characterization of the interaction of β -amyloid with transthyretin monomers and tetramers. **Du J., Murphy R. M.** *Biochemistry*. 49 (2010) 8276-8289.
- [57] Structure and assembly-disassembly properties of wild-type transthyretin amyloid protofibrils observed with atomic force microscopy. **Pires R. H., Saraiva M. J., Damas A. M., Kellermayer M. S.** *J Mol Recognit*. 24 (2011) 467-476.
- [58] The parathyroid polyhormones: new concepts in the spectrum of peptide hormone action. **Mallette L. E.** *Endocr Rev*. 12 (1991) 110-117.
- [59] *Biología: Principios Biológicos*. **Treva M. D., Boffy S., Boulding K. H., Stanbury P.** Editorial Acribia S. A., Zaragoza (1990).
- [60] Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry for a confident elucidation of a glycopeptide map of recombinant human erythropoietin. **Giménez E., Ramos-Hernan R., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** *Rapid Commun Mass Spectrom*. 25 (2011) 2307-2316.
- [61] Metalloproteins. **Finkelstein J.** *Nature*. 460 (2009) 813.
- [62] Metalloproteins and metal sensing. **Waldron K. J., Rutherford J. C., Ford D., Robinson N. J.** *Nature*. 460 (2009) 823-830.
- [63] Coordination geometries of selected transition metal ions (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Hg^{2+}) in metalloproteins. **Rulíšek L., Vondrásek J.** *J Inorg Biochem*. 71 (1998) 115-127.
- [64] Characterization of human transferrin glycoforms by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. **Sanz-Nebot V., González P., Toro I., Ribes A., Barbosa J.** *Journal of Chromatography B*, 798 (2003) 1-7.
- [65] Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **Walters G. O., Miller F. M., Worwood M.** *J Clin Pathol*. 26 (1973) 770-772.
- [66] Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **Fridovich I.** *J Biol Chem*. 264 (1989) 7761-7764.
- [67] *Environmental Oxidants*. **Nriagu J. O., Simmons M. S.** Ed. John Wiley&Sons. Nueva York (1994).

- [68] Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Walsh C. T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G. J. Jr.** *Angew Chem Int Ed.* 44 (2005) 7342-7372.
- [69] Post-translational modifications in signal integration. **Deribe Y. L., Pawson T., Dikic I.** *Nat Struct Mol Biol.* 17 (2010) 666-672.
- [70] The Association of Biomolecular Resource Facilities.
<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home> (accessed March 2011). DELTA MASS
- [71] Glicoproteins. **Hughes R. C., Chapman and Hall**, 1ª Edició, New York (1983).
- [72] Protein oligomerization: how and why. **Ali M. H., Imperiali B.** *Bioorg Med Chem.* 13 (2005) 5013-5020.
- [73] Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. **Hashimoto K., Panchenko A. R.** *Proc Natl Acad Sci.* 23 (2010) 20352-20357.
- [74] Coordinated assembly of multisubunit proteins: oligomerization of bacterial enterotoxins in vivo and in vitro. **Hardy S. J., Holmgren J., Johansson S., Sanchez J., Hirst T. R.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (1988) 7109-7113.
- [75] Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Fink A. L.** *Fold Des.* 3 (1998) R9-R23.
- [76] Monomeric Cu,Zn-superoxide dismutase is a common misfolding intermediate in the oxidation models of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Rakhit R., Crow J. P., Lepock J. R., Kondejewski L. H., Cashman N. R., Chakrabartty A.** *J Biol Chem.* 279 (2004) 15499-15504.
- [77] Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. **Wilcox K. C., Zhou L., Jordon J. K., Huang Y., Yu Y., Redler R. L., Chen X., Caplow M., Dokholyan N. V.** *J Biol Chem.* 284 (2009) 13940-13947.
- [78] Dissociation of human copper-zinc superoxide dismutase dimers using chaotrope and reductant. Insights into the molecular basis for dimer stability. **Doucette P. A., Whitson L. J., Cao X., Schirf V., Demeler B., Valentine J. S., Hansen J. C., Hart P. J.** *J Biol Chem.* 279 (2004) 54558-54566.
- [79] Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS. **Banci L., Bertini I., Durazo A., Giroto S., Gralla E. B., Martinelli M., Valentine J. S., Vieru M., Whitelegge J. P.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (2007) 11263-11267.

- [80] Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. **Soto C., Estrada L., Castilla J.** Trends Biochem Sci. 31 (2006) 150-155.
- [81] Separation of native prion protein (PrP) glycoforms by copper-binding using immobilized metal affinity chromatography (IMAC). **Müller H., Strom A., Hunsmann G., Stuke A. W.** Biochem J. 15 (2005) 371-378.
- [82] NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. **Hornemann S., Schorn C., Wüthrich K.** EMBO Rep. 5 (2004) 1159-1164.
- [83] Copper (II) ions potently inhibit purified PrPres amplification. **Orem N. R., Geoghegan J. C., Deleault N. R., Kacsak R., Supattapone S.** J Neurochem. 96 (2006) 1409-1415.
- [84] Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. **Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D.** Methods. 39 (2006) 50-55.
- [85] Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. **Vieira C. R., Biasutti E. A. B., Capobianco M., Afonso W. O., Silvestre M. P. C.** Ars Pharm 47 (2006) 281-292.
- [86] Affinity chromatography: a review of clinical applications. **Hage D. S.** Clin Chem. 45 (1999) 593-615.
- [87] Evaluacion de un nuevo metodo automatizado de cromatografia de afinidad con boronato para la determinacion de glicohemoglobina. **Garcia Garcia B., Carretero Casimiro I., Gomez del Campo A., Cava Valenciano F., Navarro Nieto E.** Química clínica 15 (1996) 425-428.
- [88] A quantitative proteomic approach to prion disease biomarker research: delving into the glycoproteome. **Wei X., Herbst A., Ma D., Aiken J., Li L.** J Proteome Res. 10 (2011) 2687-2702.
- [89] Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography for the fractionation of natural Cu complexing ligands. **Paunovic I., Schulin R., Nowack B.** J Chromatogr A. 1100 (2005) 176-184.
- [90] Purification of normal cellular prion protein from human platelets and the formation of a high molecular weight prion protein complex following platelet activation. **Jones M., Head M. W., Connolly J. G., Farquhar C. F., Hornsey V. S., Pepper D. S., MacGregor I. R.** Biochem Biophys Res Commun. 16 (2005) 48-56.

- [91] Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. **Pergami P., Jaffe H., Safar J.** *Anal Biochem.* 236 (1996) 63-73.
- [92] Structural dependence of the cellular isoform of prion protein on solvent: spectroscopic characterization of an intermediate conformation. **Pergami P., Bramanti E., Ascoli G. A.** *Biochem Biophys Res Commun.* 264 (1999) 972-978.
- [93] Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody. **Bond M. D., Panek M. E., Zhang Z., Wang D., Mehndiratta P., Zhao H., Gunton K., Ni A., Nedved M. L., Burman S., Volkin D. B.** *J Pharm Sci.* 99 (2010) 2582-2597.
- [94] Liquid chromatography detectors. **Scott R. P. W.** *Chrom-Ed Book Series.* 2003
- [95] Characterization of high-molecular-weight nonnative aggregates and aggregation kinetics by size exclusion chromatography with inline multi-angle laser light scattering. **Li Y., Weiss W. F. 4th, Roberts C. J.** *J Pharm Sci.* 98 (2009) 3997-4016.
- [96] Comparative study of protein molecular weights by size-exclusion chromatography and laser-light scattering. **Oliva A., Llabrés M., Fariña J. B.** *J Pharm Biomed Anal.* 25 (2001) 833-841.
- [97] *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* **Harlow E. Lane D.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- [98] *Advanced dairy chemistry. Volume 1: Proteins.* **Fox P. F., McSweeney P. L. H.** Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- [99] *Immunology.* **Klein J.** BlackWell Scientific Publications (1997) Londres.
- [100] Validation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect the triggering proteins and peptides for celiac disease: interlaboratory study. **Mujico J. R., Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., Verheijen R., van Wichen P., Streppel L., Sajic N., Drijfhout J. W., Koning F.** *J AOAC Int.* 95 (2012) 206-215.
- [101] Detection of hazelnut in foods using ELISA: challenges related to the detectability in processed foodstuffs. **Cucu T., Devreese B., Trashin S., Kerkaert B., Rogge M., De Meulenaer B.** *J AOAC Int.* 95 (2012) 149-156.
- [102] Prions. **Prusiner S. B.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (1998) 13363-13383.
- [103] *Practical HPLC Method Development* Snyder L. R., Kirkland J. J., Glajch J. L. 2a Edició Wiley, New York (1997).

- [104] Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Niessen W. M. A. 2a Edició. Chromatographic Science Series, 79. New York (1999).
- [105] Recent advances in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for structural glycomics. **Zauner G., Deelder A. M., Wuhrer M.** Electrophoresis. 32 (2011) 3456-3466.
- [106] HILIC methods in pharmaceutical analysis. **Dejaegher B., Vander Heyden Y.** J Sep Sci. 33 (2010) 698-715.
- [107] CE-TOF/MS: fundamental concepts, instrumental considerations and applications. **Staub A., Schappler J., Rudaz S., Veuthey J. L.** Electrophoresis. 30 (2009) 1610-1623.
- [108] CE-MS in metabolomics. **Ramautar R., Somsen G. W., de Jong G. J.** Electrophoresis. 30 (2009) 276-291.
- [109] DNA sequencers: the next generation. **Mukhopadhyay R.** Anal Chem. 81 (2009) 1736-1740.
- [110] Capillary electrophoresis in bioanalysis. **Kostal V., Katzenmeyer J., Arriaga E. A.** Anal. Chem. 80 (2008) 4533-4550.
- [111] Recent developments in CE and CEC of peptides. **Kasicka V.** Electrophoresis. 29 (2008) 179-206.
- [112] Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. **Dolník V.** Electrophoresis. 29 (2008) 143-156.
- [113] CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010. **Ramautar R., Mayboroda O. A., Somsen G. W., de Jong G. J.** Electrophoresis. 32 (2011) 52-65.
- [114] Detection of structural change of superoxide dismutase in solution. **Chiba Y., Sutoh Y., Nishida Y.** Z Naturforsch C. 61 (2006) 273-277.
- [115] High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction. **Heiger D.** Agilent Technologies (2000) Germany.
- [116] Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications. **Schmitt-Kopplin P., Frommberger M.** Electrophoresis. 24 (2003) 3837-3867.
- [117] The CE way of thinking: "all is relative!". **Schmitt-Kopplin P., Fekete A.** Methods Mol Biol. 384 (2008) 611-629.
- [118] Evaluation of migration behaviour of therapeutic peptide hormones in capillary electrophoresis using polybrene-coated capillaries. **Aptisa G., Benavente F., Sanz-Nebot V., Chirila E., Barbosa J.** Anal Bioanal Chem. 396 (2010) 1571-1579.

- [119] mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. **Strohalm M., Hassman M., Kosata B., Kodíček M.** Rapid Commun Mass Spectrom. 22 (2008) 905-908.
- [120] Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins. **Haselberg R., de Jong G. J., Somsen G. W.** J Chromatogr A. 1159 (2007) 81-109.
- [121] Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry. **Hernández H., Robinson C. V.** Nat Protoc. 2 (2007) 715-726.
- [122] Separation and detection of intact noncovalent protein complexes from mixtures by on-line capillary isoelectric focusing-mass spectrometry. **Martinović S., Berger S. J., Pasa-Tolić L., Smith R. D.** Anal Chem. 72 (2000) 5356-5360.
- [123] Collision induced unfolding of protein ions in the gas phase studied by ion mobility-mass spectrometry: the effect of ligand binding on conformational stability. **Hopper J. T., Oldham N. J.** J Am Soc Mass Spectrom. 20 (2009)1851-1858.
- [124] The Official Web Site of the Nobel Prize.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/
- [125] CE with MS detection: a rapidly developing hyphenated technique. **Klampfl C. W.** Electrophoresis. 30 (2009) S83-S91.
- [126] Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. **Whittal R. M., Ball H. L., Cohen F. E., Burlingame A. L., Prusiner S. B., Baldwin M. A.** Protein Sci. 9 (2000) 332-343.
- [127] Approaches to enhancing the sensitivity of capillary electrophoresis methods for the determination of inorganic and small organic anions. **Breadmore M. C., Haddad P. R.** Electrophoresis. 22 (2001) 2464-2489.
- [128] The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery. **Ahmed F. E.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.877 (2009) 1963-1981.
- [129] Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry. **Hilton G. R., Benesch J. L.** J R Soc Interface. 9 (2012) 801-816.
- [130] Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. **Benesch J. L., Ruotolo B. T., Simmons D. A., Robinson C. V.** Chem Rev. 107 (2007) 3544-3567.
- [131] Nanoelectrospray emitters: trends and perspective. **Gibson G. T., Mugo S. M., Oleschuk R. D.** Mass Spectrom Rev. 28 (2009) 918-936.

- [132] Nano-LC and HPLC-chip-ESI-MS: an emerging technique for glycobioanalysis. **Kirsch S., Bindila L.** *Bioanalysis*. 1 (2009) 1307-1327.
- [133] Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. Instrumentation and Applications. **Muddiman D. C., Bakhtiar R., Hofstadler S. A., Smith R. D.** *J. Chem. Educ.*, 74 (1997) 1288-1292.
- [134] MALDI MS and strategies for protein analysis. **Fenselau C.** *Anal Chem.* 69 (1997) 661A-665A.
- [135] Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Karas M., Hillenkamp F.** *Anal Chem.* 60 (1988) 2299-2301.
- [136] High-resolution mass spectrometers. **Marshall A. G., Hendrickson C.L.** *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. 1 (2008) 579-599.
- [137] Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. **Simpson D. C., Smith R. D.** *Electrophoresis*. 26 (2005) 1291-1305.
- [138] 10 years of MS instrumental developments - Impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. **Himmelsbach M.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 883–884 (2012) 3–7.
- [139] Identification of unknown pesticides in fruits using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Imazalil as a case study of quantification. **Picó Y., la Farré M., Soler C., Barceló D.** *J Chromatogr A.* 28 (2007) 123-134.
- [140] Development of a simple and reliable accurate mass liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry method for high-resolution accurate mass determinations of new drug entities on a triple quadrupole mass spectrometer. **Pucci V., Bonelli F.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21 (2007) 3051-3059.
- [141] Debating Resolution and Mass Accuracy. **Balogh, M. P.** *LC GC Europe* 17 (2004) 152-159.
- [142] Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS. **Ferrer I., Thurman E. M., Fernández-Alba A. R.** *Anal Chem.* 77 (2005) 2818-2825.
- [143] Investigation into the factors affecting accuracy of mass measurements on a time-of-flight mass spectrometer using Design of Experiment. **Laures A. M., Wolff J. C., Eckers C., Borman P. J., Chatfield M. J.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21 (2007) 529-535.
- [144] T-wave ion mobility-mass spectrometry: basic experimental procedures for protein complex analysis. **Michaelevski I., Kirshenbaum N., Sharon M.** *J Vis Exp.* 31 (2010) pii: 1985. doi: 10.3791/1985.

- [145] Three-dimensional ion mobility/TOFMS analysis of electrosprayed biomolecules. **Hoaglund C. S., Valentine S. J., Sporleder C. R., Reilly J. P., Clemmer D. E.** *Anal Chem.* 70 (1998) 2236-2242.
- [146] Ion mobility-mass spectrometry reveals long-lived, unfolded intermediates in the dissociation of protein complexes. **Ruotolo B. T., Hyung S. J., Robinson P. M., Giles K., Bateman R. H., Robinson C. V.** *Angew Chem Int Ed Engl.* 46 (2007) 8001-8004.
- [147] Evaluation of on-line solid phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of neuropeptides in human plasma. **Hernández E., Benavente F., Sanz-Nebot V., Barbosa J.** *Electrophoresis.* 29 (2008) 3366-3376.
- [148] Evaluation of the electrophoretic behaviour of opioid peptides Separation by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry. **Sanz-Nebot V., Benavente F., Hernández E., Barbosa J.** *Anal Chim Acta.* 577 (2006) 68-76.
- [149] Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. **Baraniuk J. N., Whalen G., Cunningham J., Clauw D. J.** *BMC Musculoskelet Disord.* 5 (2004) 48-54.
- [150] Measurement of neuropeptides in clinical samples using chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis. **Phillips T. M., Wellner E.** *J Chromatogr A.* 1111 (2006) 106-111.
- [151] Fibromyalgia: a disorder of the brain? **Schweinhardt P., Sauro K. M., Bushnell M. C.** *Neuroscientist.* 14 (2008) 415-421.
- [152] Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **McCord J. M., Fridovich I.** *J Biol Chem.* 244 (1969) 6049-6055.
- [153] Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu,Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. **Nuevo Ordoñez Y., Montes-Bayón M., Blanco-González E., Sanz-Medel A.** *Anal Chem.* 82 (2010) 2387-2394.
- [154] Divalent-metal-dependent nucleolytic activity of Cu, Zn superoxide dismutase. **Jiang W., Shen T., Han Y., Pan Q., Liu C.** *J Biol Inorg Chem.* 11 (2006) 835-848.
- [155] Bovine erythrocyte cupro-zinc protein. 1. Isolation and general characterization. **Bannister J., Bannister W., Wood E.** *Eur J Biochem.* 18 (1971) 178-186.
- [156] Copper/zinc superoxide dismutase activity in newborns & young people in Spain. **Casado A., de la Torre R., López-Fernández M. E.** *Indian J Med Res.* 125 (2007) 655-660.
- [157] Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. **Michalski W. P.** *J Chromatogr B Biomed Appl.* 684 (1996) 59-75.

- [158] Fundación Española para el Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica. <http://www.fundela.info>
- [159] The Official Web Site of the Nobel Prize.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1997/prusiner-autobio.html
- [160] Aggregation of cellular prion protein is initiated by proximity-induced dimerization. **Goggin K., Bissonnette C., Grenier C., Volkov L., Roucou X.** J Neurochem. 102 (2007) 1195-1205.
- [161] Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. **Jones S., Batchelor M., Bheht D., Clarke A. R., Collinge J., Jackson G. S.** Biochem J. 392 (2005) 309-312.
- [162] Prion protein and developments in its detection. **MacGregor I.** Transfus Med. 11 (2001) 3-14.
- [163] Cu(II) induces small-size aggregates with amyloid characteristics in two alleles of recombinant ovine prion proteins. **Tsirounikov K., Rezaei H., Dalgarrondo M., Chobert J. M., Grosclaude J., Haertlé T.** Biochim Biophys Acta. 1764 (2006) 1218-1226.
- [164] Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Pan K. M., Stahl N., Prusiner S. B.** Protein Science 1 (1992) 1343-1352.
- [165] Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. **Burns C. S., Aronoff-Spencer E., Dunham C. M., Lario P., Avdievich N. I., Antholine W. E., Olmstead M. M., Vrieling A., Gerfen G. J., Peisach J., Scott W. G., Millhauser G. L.** Biochemistry. 41 (2002) 3991-4001.
- [166] Prion protein binds copper within the physiological concentration range. **Kramer M. L., Kratzin H. D., Schmidt B., Römer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S., Kretzschmar H.** J Biol Chem. 276 (2001) 16711-16719.
- [167] Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. **Garnett A. P., Viles J. H.** J Biol Chem. 278 (2003) 6795-6802.
- [168] Medidas de seguridad, gestión de residuos y descontaminación para laboratorios que realicen controles analíticos de detección de la EEB.
<http://www.gencat.cat/salut/depsalut/html/es/dir90/spgestio.htm#m4>.
- [169] Medidas de seguridad y prevención frente a las enfermedades priónicas. **Monge Jodra V.** Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Ramón y Cajal. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares.
<http://www.uninet.edu/neurocon/congreso-1/conferencias/priones-14.html>

- [170] Enfermedades de Creutzfeldt-Jakob y otras Encefalopatía Espongiformes Transmisibles Humanas. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- [171] Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Pan K. M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R. J., Cohen F. E., et al.** Proc Natl Acad Sci U S A. 90 (1993) 10962-10966.
- [172] Deconvolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry isotope patterns to determine ratios of A-type to B-type interflavan bonds in cranberry proanthocyanidins. **Feliciano R. P., Krueger C. G., Shanmuganayagam D., Vestling M. M., Reed J. D.** Food Chem. 135 (2012) 1485-1493.
- [173] Instrument and process independent binning and baseline correction methods for liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry deconvolution. **Krishnan S., Vogels J. T., Coulier L., Bas R. C., Hendriks M. W., Hankemeier T., Thissen U.** Anal Chim Acta. 740 (2012) 712-719.
- [174] Towards a reliable molecular mass determination of intact glycoproteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Giménez E., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** Rapid Commun Mass Spectrom. 21 (2007) 2555-2563.
- [175] Separation of recombinant human erythropoietin glycoforms by capillary electrophoresis using volatile electrolytes. Assessment of mass spectrometry for the characterization of erythropoietin glycoforms. **Sanz-Nebot V., Benavente F., Vallverdú A., Guzman N. A., Barbosa J.** Anal Chem. 75 (2003) 5220-5229.
- [176] Relative quantification of glycated Cu-Zn superoxide dismutase in erythrocytes by electrospray ionization mass spectrometry. **Saraswathi M., Nakanishi T., Shimizu A.** Biochim Biophys Acta. 1426 (1999) 483-490.
- [177] Simple and defined method to detect the SOD-1 mutants from patients with familial amyotrophic lateral sclerosis by mass spectrometry. **Nakanishi T., Kishikawa M., Miyazaki A., Shimizu A., Ogawa Y., Sakoda S., Ohi T., Shoji H.** J Neurosci Methods. 81 (1998) 41-44.
- [178] Detection and identification of protein variants and adducts in blood and tissues: an application of soft ionization mass spectrometry to clinical diagnosis. **Shimizu A., Nakanishi T., Kishikawa M., Miyazaki A.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 776 (2002) 15-30.

- [179] Modeling the migration behavior of rabbit liver apothioneins in capillary electrophoresis. **Benavente F., Andón B., Giménez E., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** *Electrophoresis*. 29 (2008) 2790-2800.
- [180] Glycoform characterization of erythropoietin combining glycan and intact protein analysis by capillary electrophoresis-electrospray-time-of-flight mass spectrometry. **Balaguer E., Demelbauer .U, Pelzing M., Sanz-Nebot V., Barbosa J., Neusüss C.** *Electrophoresis*. 27 (2006) 2638-2650.
- [181] Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS. **Hernández E., Benavente F., Sanz-Nebot V., Barbosa J.** *Electrophoresis*. 28 (2007) 3957-3965.
- [182] Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. **Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R.** *Mol Syst Biol*. 4 (2008) 222.
- [183] Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry. **Polettini A., Gottardo R., Pascali J. P., Tagliaro F.** *Anal Chem*. 80 (2008) 3050-3057.
- [184] Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples. High-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection. **Hermo M. P., Barrón D., Barbosa J.** *J Chromatogr A*. 1201 (2008) 1-14.
- [185] Methodology for accurate mass measurement of small molecules, Best Practice guide. **Web K., Bristow T., Sargent M., Stein B.** First Edition, LGC Limited, Teddington, UK 2004.
- [186] Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. **Steinman H. M., Naik V. R., Abernethy J. L., Hill R. L.** *J Biol Chem*. 249 (1974) 7326-7338.
- [187] Analysis of recombinant human erythropoietin glycopeptides by capillary electrophoresis electrospray-time of flight-mass spectrometry. **Giménez E., Ramos-Hernan R., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** *Anal Chim Acta*. 709 (2012) 81-90.
- [188] A New Method for the Purification of Cu-Zn Superoxide Dismutase from Human Erythrocytes. Djalali M, Abtahi H, Sadeghi M. R., Negahdar M., Layegh H., Farzami B., Fatehi F. **Iranian J Publ Health**. 34 (2005) 58-66.

- [189] Ion mobility-mass spectrometry analysis of large protein complexes. **Ruotolo B. T., Benesch J. L., Sandercock A. M., Hyung S. J., Robinson C. V.** *Nat Protoc.* 3 (2008) 1139-1152.
- [190] Monitoring copopulated conformational states during protein folding events using electrospray ionization-ion mobility spectrometry-mass spectrometry. **Smith D. P., Giles K., Bateman R. H., Radford S. E., Ashcroft A. E.** *J Am Soc Mass Spectrom.* 18 (2007) 2180-2190.
- [191] Aspects of native proteins are retained in vacuum. **Ruotolo B. T., Robinson C. V.** *Curr Opin Chem Biol.* 10 (2006) 402-408.
- [192] Amyloid β -protein: monomer structure and early aggregation states of A β 42 and its Pro¹⁹ alloform. **Bernstein S. L., Wyttenbach T., Baumketner A., Shea J. E., Bitan G., Teplow D. B., Bowers M. T.** *J Am Chem Soc.* 127 (2005) 2075-2084.
- [193] Ionic liquid matrices for MALDI-TOF-MS analysis of intact glycoproteins. **Giménez E., Benavente F., Barbosa J., Sanz-Nebot V.** *Anal Bioanal Chem.* 398 (2010) 357-365.
- [194] Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS. **Schmidt A., Bahr U., Karas M.** *Anal Chem.* 73 (2001) 6040-6046.
- [195] The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument. **Tahallah N., Pinkse M., Maier C. S., Heck A. J.** *Rapid Commun Mass Spectrom.* 15 (2001) 596-601.
- [196] Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. **Haselberg R., Harmsen S., Dolman M. E., de Jong G. J., Kok R. J., Somsen G. W.** *Anal Chim Acta.* 698 (2011) 77-83.
- [197] Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins. **Haselberg R., Ratnayake C. K., de Jong G. J., Somsen G. W.** *J Chromatogr A.* 1217 (2010) 7605-7611.

ANNEX

RESUM ARTICLE 2.1

Títol: Avaluació de mètodes no immunoquímics per a l'aïllament de la proteïna priònica cel·lular de cervell boví.

Les encefalopaties espongiformes transmissibles (TSEs) són un grup de malalties neurodegeneratives que afecten al sistema nerviós central de molts animals, fins i tot el dels humans. Alguns autors suggereixen que la causa de les TSEs és la conversió de la proteïna priònica cel·lular (PrP^C), que s'expressa en molts teixits especialment al cervell, a la forma patològica (PrP^{Sc}). Aquest canvi afecta a la seva estructura, conferint propietats bioquímiques diferents al PrP^{Sc}, com una major resistència a la proteasa K, que s'ha utilitzat àmpliament per a la seva purificació. Per contra, el PrP^C és menys resistent i la seva purificació més complicada.

En aquest article es proposa una estratègia de purificació per recuperar eficientment PrP^C de cervell boví sà utilitzant mètodes convencionals no immunoquímics. Es tracta en detall l'aplicabilitat de l'extracció amb detergents, la cromatografia d'exclusió molecular (SEC), la diafiltració amb filtres de tall per pes molecular (MWCO) i la cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC) utilitzant el western blot (WB) per detectar la presència de PrP^C.

RESUM ARTICLE 3.1

Títol: Electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses per a la separació i caracterització de la Cu,Zn-superòxid dismutasa bovina 1.

La forma nativa de la Cu₂Zn₂-superòxid dismutasa (SOD-1) és un homodímer que coordina un Cu²⁺ i un Zn²⁺ per monòmer. El Cu²⁺ i el Zn²⁺ juguen un paper molt important en l'activitat enzimàtica i l'estabilitat estructural, respectivament. A més, la forma dimèrica és essencial per a la funcionalitat de la SOD-1. Diverses isoformes mutants de la SOD-1 humana s'han relacionat amb un cert tipus d'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), que és una malaltia neurodegenerativa.

En aquest article s'utilitza la CE i la MS per a l'estudi de les diferents espècies de la SOD-1 bovina. Els ions metàl·lics de l'enzim natiu ($\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ dimèrica) són alliberats en medi àcid per a obtenir la forma apo-SOD-1, que és monomèrica. Aquestes dues formes s'analitzen per espectrometria de masses amb font d'ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS), electroforesi capil·lar amb detecció ultraviolada (CE-UV) i electroforesi capil·lar acoblada amb l'espectrometria de masses amb font d'ionització per electrospai (CE-ESI-MS).

En MALDI s'obtenen espectres molt semblants per a les dues mostres de SOD-1, amb metalls i sense metalls, fent servir com a matrius l'àcid sinapínic (SA) i l'àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB) amb i sense àcid trifluoroacètic (TFA). En els dos casos es va calcular la massa molecular mitjana del monòmer d'apo-SOD-1. Aquests resultats indiquen que els metalls són alliberats de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ durant la preparació de les mostres o la ionització.

Per a la CE-UV i la CE-ESI-MS es van fer servir dos electròlits de separació (BGE) potencialment compatibles amb la detecció per ESI-MS: 1M d'àcid acètic (HAc, pH 2) i 10mM d'acetat d'amoni (NH_4Ac , pH 7.3)). La utilització d'un líquid auxiliar de 2-propanol/aigua (60:40 v/v) amb 0.1% v/v d'àcid fòrmic (FA) i el BGE àcid proporcionava una major sensibilitat. No obstant, els perfils electroforètics i els espectres de masses obtinguts suggereixen que els metalls de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ dimèrica són alliberats durant la separació electroforètica generant la forma apo-SOD-1 monomèrica. Per contra, el BGE neutre proporciona unes condicions millors per a la detecció de la forma nativa de l'enzim. Les diferències entre els espectres de masses obtinguts per a la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD-1}$ dimèrica i l'apo-SOD-1 són significatives i la presència d'FA al líquid auxiliar només afecta a la sensibilitat.

Els nostres resultats destaquen la importància de seleccionar condicions de separació i detecció no desnaturalitzants apropiades per a obtenir informació estructural fiable sobre complexos proteics no covalents per CE-ESI-MS.

RESUM ARTICLE 4.1

Títol: Avaluació de l'electroforesi capil·lar acoblada a la espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol (TOF-MS) per a la identificació fiable de pèptids.

L'electroforesi capil·lar acoblada en línia a l'espectrometria de masses amb un analitzador de temps de vol amb acceleració ortogonal (CE-oa-TOF-MS) és una tècnica emergent que ofereix separacions eficients basades en la relació càrrega-massa i mesures de massa exacta i d'alta resolució.

En aquest article s'investiguen els factors principals que influeixen en l'anàlisi de pèptids de baix pes molecular utilitzant una interfase d'ionització per electrosprai amb líquid auxiliar coaxial i diversos neuropèptids com a compostos model.

Els valors moderats del voltatge d'acceleració ("*fragmentor voltage*") són fonamentals per a maximitzar la producció d'ions moleculars i obtenir una sensibilitat òptima, minimitzant la fragmentació. No obstant, els fragments majoritaris proporcionen informació específica que pot resultar valuosa per a la confirmació estructural dels anàlits.

També es tracten, en termes d'exactitud en la mesura de massa i sensibilitat, els avantatges i desavantatges d'afegir compostos com a referència interna en el líquid auxiliar per a realitzar un calibratge continu de l'eix de m/z durant les separacions electroforètiques. A més a més, s'avaluen diferents modes instrumentals relacionats amb la resolució.

Finalment, el mètode es valida per a l'anàlisi quantitatiu dels neuropèptids estudiats en relació a la repetitivitat, linealitat i límits de detecció. Els resultats obtinguts amb CE-oa-TOF-MS es comparen amb els obtinguts utilitzant CE acoblada a d'altres espectròmetres de masses. A més de la simplicitat i fiabilitat de la identificació, la CE-oa-TOF-MS permet millorar la repetitivitat i els límits de detecció en un ordre de magnitud respecte als TOF amb reflectró convencional i als analitzadors amb trampa d'ions (IT).

RESUM ARTICLE 4.2

Títol: Separació i caracterització de superòxid dismutasa 1 (SOD-1) d'eritròcits humans amb electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol (CE-TOF-MS).

La Cu,Zn-superòxid dismutasa (SOD-1) és un metal·loenzim homodimèric relacionat amb l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS). La majoria dels casos d'ALS són esporàdics mentre que, aproximadament, un 10% són hereditaris (ALS familiar, fALS). Només un 25% dels casos de fALS són causats per mutacions a la seqüència aminoacídica de la SOD-1 humana, mentre que l'explicació per a la resta encara no és gaire clara. En aquest sentit, diversos autors suggereixen la gran importància de les modificacions post-transduccionals (PTMs) o la dissociació del dímer en la formació dels agregats intraneuronals de SOD-1 característics d'aquesta malaltia.

En aquest article s'utilitza la CE-TOF-MS per a la separació i caracterització de SOD-1 bovina patró i SOD-1 humana purificada a partir d'eritròcits. Per a la realització dels experiments de CE-TOF-MS en mode positiu s'han utilitzat dos electròlits de separació (BGE). L'ús d'un BGE àcid permet la detecció de la forma apo-SOD-1 monomèrica, perquè els metalls s'alliberen completament durant la separació electroforètica. Amb aquest BGE àcid també s'aconsegueix una millor sensibilitat especialment interessant per a la detecció de diferents isoformes de la SOD-1 humana. Per contra, el BGE neutre millora les condicions per a la detecció de les formes metal·lades dimèrica i monomèrica de l'enzim, però la selecció d'un valor de voltatge d'acceleració ("*fragmentor voltage*") adequat en el TOF és fonamental per a obtenir informació quantitativa fiable. En qualsevol cas, en aquestes condicions, només es detecten les formes metal·lades de la principal isoforma de la SOD-1 humana degut a la menor sensibilitat. Per tant, la combinació de les dues metodologies resulta necessària per a l'obtenció d'informació estructural detallada de l'enzim.

RESUM ARTICLE 5.1

Títol: Caracterització de superòxid dismutasa 1 (SOD-1) per espectrometria de masses de mobilitat iònica amb font d'ionització per electrospai.

En aquest article s'utilitza l'espectrometria de masses de mobilitat iònica amb font d'ionització per nano-electrospai (n-ESI-IM-MS) per a la caracterització de la SOD-1 bovina i humana purificada a partir d'eritròcits. La SOD-1 nativa en diferents espècies animals és un enzim homodimèric que coordina un Cu^{2+} i un Zn^{2+} per monòmer.

Els agregats de SOD-1 són característics de l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS), una malaltia neurodegenerativa mortal. Com només un petit percentatge dels casos d'ALS, dins de la variant familiar, es poden explicar per les mutacions de la SOD-1, diversos autors suggereixen que la dissociació del dímer podria ser el desencadenant de l'oligomerització i posterior agregació.

En aquest article es mostra que la n-ESI-IM-MS es pot utilitzar per a la detecció de monòmers, dímers i altres complexos proteics en condicions no desnaturalitzants. A diferència que en ESI-MS, la n-ESI-IM-MS permet una dimensió addicional per a la separació dels ions, produint un espectre de masses en tres dimensions (temps de deriva ("*drift time*"), relació de massa-càrrega (m/z) i intensitat). El temps de deriva proporciona informació estructural valuosa relacionada amb la mida de l'ió i demostra que pot ser molt útil per a diferenciar entre les formes monomèrica i dimèrica de la SOD-1.

També s'avaluen diferents paràmetres del mètode d'IM, com la composició de la mostra o els voltatges d'activació, per a obtenir informació estructural detallada dels enzims boví i humà, que es comporten significativament diferent. Finalment s'analitza un petit grup de mostres de sang de pacients d'ALS per a obtenir algunes conclusions preliminars.

