

Análisis de las proteínas intactas Eritropoyetina y NESP mediante electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas con analizador de trampa iónica

Sanz-Nebot V, Giménez E, Benavente F, Barbosa J.

Departamento de Química Analítica. Universidad de Barcelona. Diagonal, 647. 08028 Barcelona.

Introducción

La Eritropoyetina (EPO) y su análogo hiperglicosilado NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein) son glicoproteínas ampliamente utilizadas en el tratamiento de anemias derivadas de transtornos diversos, aunque su popularidad deriva de su uso ilegal en deportes de resistencia [1,2]. Su determinación y la caracterización de sus glicofórmulas es de interés, tanto para asegurar la calidad de los análogos sintéticos, como para detectar su uso fraudulento en determinadas disciplinas deportivas.

Material y métodos

El instrumento de electroforesis capilar utilizado ha sido HP^{3D} CE de Agilent Technologies, empleándose capilares recubiertos con polímeros de poliácridamida derivatizada (UltraTo1TM LN y HR de Target Discovery)

Se ha utilizado un electrolito de separación consistente en una disolución de ácido acético 2M (pH<3). Los parámetros óptimos de uso del espectrómetro de masas (LC/MSD Trap SL de Agilent Technologies), se han establecido por infusión directa de glicoproteínas con diferente grado de glicosilación. El acoplamiento se ha llevado a cabo mediante una interfase con líquido auxiliar de isopropanol: agua (1:1 (v/v)) con ácido acético a concentración del 1%. Las proteínas estudiadas han sido EPO humana recombinante (rHuEPO, Farmacopea Europea) y NESP (Amgen Inc.).

Resultados

Con el objeto de evitar, en la medida de lo posible, el efecto negativo que los azúcares de las glicoproteínas tienen en la respuesta del espectrómetro de masas, se han optimizado los parámetros de operación del analizador de trampa de iones utilizando glicoproteínas con diferentes grados de glicosilación

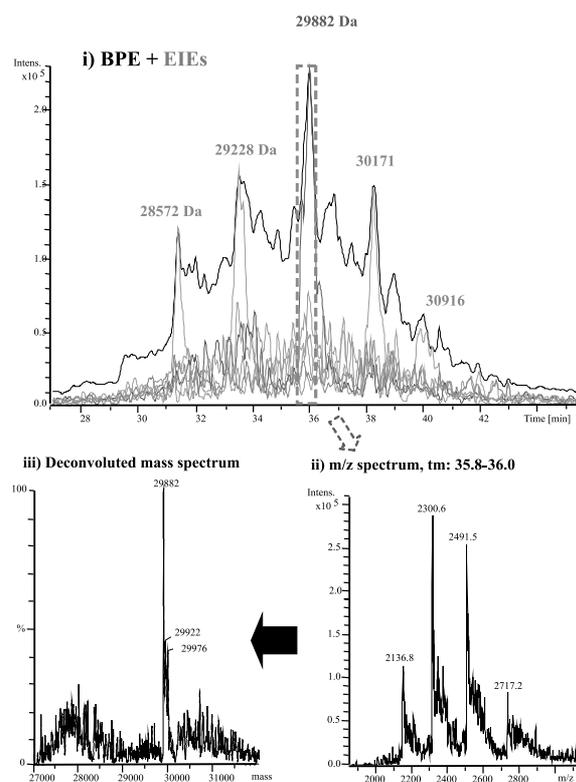


Figura 1. Electroferograma correspondiente a rHuEPO

(transferrina, fetuina, alfa-glicoproteína ácida). Se ha podido observar que el parámetro que más influencia presenta es el trap drive, relacionado con la fuerza del campo de radiofrecuencia de la trampa de iones que determina los valores de m/z que el analizador atrapa.

Con estos parámetros óptimos, se ha utilizado una metodología CE-ESI-IT-MS, para el análisis de rHuEPO y NESP y la caracterización de sus glicofórmulas [3,4]. Los mejores resultados se han obtenido al utilizar un recubrimiento de poliácridamida derivatizada de características neutras, con el que el flujo electrosmótico se suprime casi por completo al emplear un electrolito de separación ácido. La Figura 1 muestra el electroferograma obtenido para

el análisis de rHuEPO, en el que se puede observar la presencia de un cierto número de glicofomas. La interacción entre éstas y el recubrimiento del capilar determina la resolución obtenida en el análisis.

Junto al electroferograma (Figura 1) se muestra el espectro de masas de las glicofomas más abundantes y su deconvolución. La información que proporciona el espectro de masas deconvolucionado se ha utilizado para obtener el electroferograma de iones extraídos, que se puede observar superpuesto en la Figura 1.

En el caso de la NESP, su mayor grado de glicosilación provoca una interacción más fuerte con las paredes del capilar, dificultando la caracterización de sus glicofomas. Además, la eficacia y la resolución van disminuyendo con el número de análisis, sugiriendo la falta de estabilidad del recubrimiento utilizado. El uso de otros recubrimientos más estables, ha proporcionado resultados similares en la separación y caracterización de glicofomas de NESP y rHuEPO. En el caso de esta glicoproteína, se ha demostrado que, aunque el analizador de trampa iónica no es capaz de caracterizar completamente el elevado número de glicofomas de la rHuEPO, proporciona suficiente información para caracterizar las principales [3].

Conclusiones

Se ha llevado a cabo la identificación de las principales glicofomas de una glicoproteína intacta de considerable complejidad como es la rHuEPO, mediante el uso de la electroforesis capilar con capilares recubiertos acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica. Los resultados son menos significativos en el caso de NESP debido a su mayor grado de glicosilación. En ambos casos, la optimización correcta de los parámetros del analizador es crítica. La detección óptima de los analitos requiere el uso de un electrolito de separación extremadamente ácido, con el consiguiente deterioro en la estabilidad de los recubrimientos.

Bibliografía

- Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A., Lykos, M. A., *Exp Hematology* 2003, 31, 290-299.
- Lasne, F., Martin, L., Crepin, N., Ceaurriz, J., *Anal Biochem* 2002, 311, 119-126.
- Balaguer, E., Neusüß, C., *Anal. Chem.* 2006, 78, 5384-5393.
- Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Giménez, E., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1451-1456.

Estudio de los cambios de expresión en el proteoma de membrana mitocondrial de cardiomiocitos de rata en respuesta a un modelo de acondicionamiento isquémico

Serrano H[&], Jorge I[&], Martínez-Acedo P[&], Navarro PJ[&], Pérez-Hernández D[&], Nuñez E[&], Ramírez-Boo M⁺, Bonzón E[&], Radfar A[&], Miró-Casas E[#], García D[#], Vázquez J.^{&1}

[&]Laboratorio de Química de Proteínas y Proteómica, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España. ⁺Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico en Arecibo, Puerto Rico, USA. [#]Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. [#]Servicio de Cardiología, Hospital Vall d' Hebron, Barcelona, España.

Introducción

El análisis de la expresión diferencial en proteínas es fundamental para entender los procesos biológicos y juega cada vez más un rol importante

en la biología y la investigación médica (Li *et al.*, 2003). En un trabajo anterior (Serrano *et al.* 2007) describimos un método para llevar a cabo una identificación y detección masivas de los cambios de expresión en proteínas de membrana mitocondrial.