



Universidad de Oviedo

## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

**Cuantificación absoluta del grado de fosforilación global y específico de fosfoproteínas empleando capHPLC-ICPQQQ**

**Laura Freije Carrelo**

**Julio 2014, Oviedo**



**Jorge Ruiz Encinar**, Profesor Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado **Cuantificación absoluta del grado de fosforilación global y específico de fosfoproteínas empleando capHPLC-ICPQQQ**

ha sido realizado por el licenciado Laura Freije Carrelo, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 24 de Junio de 2014

Fdo: Jorge Ruiz Encinar

# ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN .....	1
A.1. PROTEÓMICA.....	2
A.2. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES .....	2
A.2.1. Fosforilación de proteínas .....	3
A.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FOSFOPROTEÍNAS.....	4
A.3.1. Métodos tradicionales.....	4
A.3.2. Espectrometría de masas molecular .....	5
A.3.3. Espectrometría de masas elemental .....	10
B. OBJETIVOS .....	16
C. EXPERIMENTAL .....	18
C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....	19
C.1.1. Instrumentación .....	19
C.1.2. Reactivos .....	21
C.2. PROCEDIMIENTOS.....	22
C.2.1. Protocolo de limpieza .....	22
C.2.2. Corrección de la variación de la sensibilidad .....	22
C.2.3. Cuantificación del grado de fosforilación global de $\beta$ -caseína empleando capHPLC-ICPQQ .....	23
C.2.4. Cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido triptico de $\beta$ -caseína empleando capHPLC-ICPQQ .....	24
C.2.5. Identificación de los péptidos y fosfopéptidos mediante MS molecular .....	25
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
D.1. CORRECCIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA SENSIBILIDAD .....	27
D.2. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN GLOBAL DE $\beta$ -CASEÍNA .....	29
D.2.1. Cálculo del <i>delay time</i> y porcentaje de acetonitrilo de elución de la $\beta$ -caseína.....	30
D.2.2. Calibrado de la relación molar P/S .....	30
D.2.3. Determinación cuantitativa del grado de fosforilación global de la $\beta$ -caseína .....	32
D.3. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN ESPECÍFICO DE UN DIGERIDO TRÍPTICO DE $\beta$ -CASEÍNA .....	34

D.3.1. Elección de patrones .....	34
D.3.2. Determinación cuantitativa del grado de fosforilación específico del digerido tríptico de $\beta$ -caseína .....	35
D.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS Y FOSFOPÉPTIDOS MEDIANTE MS MOLECULAR	37
E. CONCLUSIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	44
APÉNDICES.....	50

# A. INTRODUCCIÓN

### A.1. PROTEÓMICA

El desarrollo de la genómica, en especial la secuenciación del genoma humano,<sup>1</sup> supuso el primer paso para conocer en profundidad los procesos celulares. Si bien la información necesaria para el completo funcionamiento de un organismo se codifica en sus genes, dichos genes se expresan mediante proteínas, que son las que realmente llevan a cabo las funciones vitales y están implicadas en la mayoría de procesos celulares. La proteómica es la ciencia que estudia el conjunto de proteínas, que constituyen el proteoma, expresadas a partir de un genoma concreto.<sup>2</sup>

El estudio del proteoma presenta una gran complejidad, ya que las proteínas que lo constituyen se expresan o modifican a lo largo del tiempo, cambiando su abundancia, estructura, interacciones... Además, a partir de la transcripción de un solo gen se pueden generar diversas proteínas, que pueden ser modificadas a su vez después de su traducción. Por otra parte, las proteínas se hallan en la célula en un amplísimo rango de concentraciones.<sup>3</sup>

Desde que surgió el concepto de proteoma en 1994,<sup>4</sup> las nuevas metodologías desarrolladas para la determinación cualitativa y cuantitativa de proteínas, esencialmente basadas en espectrometría de masas, proporcionan una poderosa herramienta en el estudio dinámico y espacio-temporal de las actividades de las mismas, pudiendo desentrañar así su misión en procesos biológicos y enfermedades.

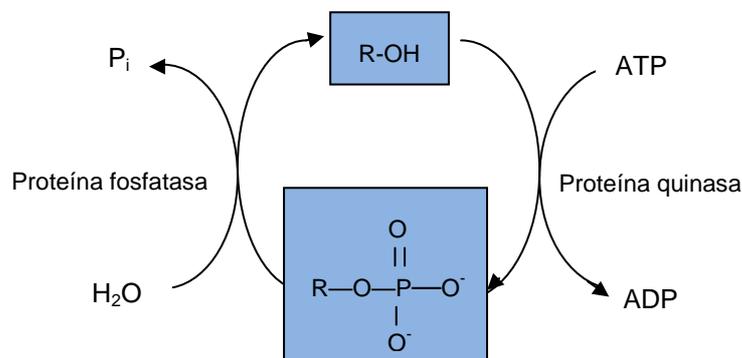
### A.2. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES

La actividad de las proteínas no está controlada únicamente por la relación entre su biosíntesis y su degradación, sino que también se regula mediante procesos covalentes específicos y selectivos. Estos procesos covalentes, denominados modificaciones post-traduccionales (PTMs), cambian las propiedades de una proteína, procesándola proteolíticamente y/o modificando químicamente residuos de aminoácidos. Las PTMs modulan la actividad, localización, recambio o degradación, así como las interacciones moleculares de las proteínas. Se conocen hasta 300 tipos de PTMs, entre las que destacan la fosforilación, metilación, acetilación, glicosilación o sulfonación.<sup>5</sup>

El ser humano presenta unos 30000 genes, de los cuales se generan a su vez 5 ó 6 RNAs mensajeros diferentes (mRNA). La mayoría de los mRNA se traducen en proteínas procesadas por múltiples caminos, generando entre 8 y 10 formas modificadas por cada cadena polipeptídica. Por tanto, el genoma humano puede dar lugar hasta a 1,8 millones de proteínas diferentes.<sup>6</sup> Esta complejidad provoca que, a pesar de la gran importancia de las PTMs en las funciones biológicas, todavía exista un gran desconocimiento de su extensión e importancia concreta dentro de las células.<sup>5</sup>

### A.2.1. Fosforilación de proteínas

La fosforilación de proteínas es una de las PTMs más importantes, ya que está involucrada en el control del ciclo celular, diferenciación, proliferación, transformación, metabolismo celular, degradación de proteínas, homeostasis... Los enzimas responsables de la fosforilación y defosforilación son, respectivamente, las quinasas y fosfatasa, que emplean casi exclusivamente adenosín trifosfato (ATP) como donador del grupo fosfato. En las células eucariotas, dicho grupo fosfato forma un enlace fosfoéster con el grupo hidroxilo de los aminoácidos serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), como se esquematiza en la Figura 1.<sup>7,8</sup> La fosforilación en Ser o Thr es mucho más abundante que la fosforilación en Tyr. En vertebrados, la relación de fosforilación en Ser:Thr:Tyr es 1800:200:1.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Proceso de fosforilación/defosforilación en células eucariotas.

Aunque se estima que al menos un tercio de todas las proteínas celulares se encuentran fosforiladas en algún momento, sus niveles de fosforilación varían ampliamente, lo que dificulta su estudio. Sin embargo, la importancia de la fosforilación ha sido ampliamente descrita en la bibliografía. En procesos de señalización, la fosforilación supone una activación o desactivación de la actividad de la proteína. Un desorden en el sistema de control habitualmente desemboca en enfermedades.<sup>8</sup> Por ejemplo, la fosforilación tiene un papel relevante en enfermedades como el cáncer,<sup>10,11</sup> la diabetes,<sup>12</sup> respuestas frente a virus y necrosis programadas<sup>13</sup> o enfermedades cardíacas,<sup>14</sup> entre muchas otras. Interviene también en la regulación de la mitosis<sup>15</sup> y en diversos procesos cerebrales.<sup>16,17</sup>

En definitiva, existe un gran interés en el estudio de la fosforilación y, en concreto, en el desarrollo de estrategias para la determinación cualitativa y cuantitativa de fosfoproteínas, dada su importancia en los procesos biológicos.

### **A.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FOSFOPROTEÍNAS**

Las primeras metodologías para el análisis de fosfoproteínas únicamente proporcionaban resultados cualitativos, identificando las fosfoproteínas presentes en la muestra. Sin embargo, las respuestas celulares dependen no sólo de la identidad de la fosfoproteína sino también de los sitios de fosforilación, estequiometría y cambios temporales en el grado de fosforilación. Por todos estos motivos, es necesario el desarrollo de estrategias cuantitativas en fosfoproteómica.<sup>18</sup>

Los análisis cuantitativos pueden proporcionar la cantidad absoluta de proteína en una muestra o el cambio relativo en la cantidad de proteína entre dos estados. La cuantificación absoluta es la determinación de la cantidad de la especie concreta, por ejemplo,  $\text{ng mL}^{-1}$  de un biomarcador o el número de copias de una proteína por célula. En cambio, en cuantificaciones relativas la cantidad de proteína se define en relación con otra medida de la misma proteína, comparando así, al menos, dos estados celulares. Como es obvio, la cuantificación absoluta permite también una determinación relativa fácilmente.<sup>19</sup>

En este apartado se describirán los métodos disponibles para la cuantificación de fosfoproteínas, clasificados según las técnicas empleadas (métodos tradicionales, espectrometría de masas molecular y espectrometría de masas elemental) y distinguiendo si proporcionan una cuantificación relativa o absoluta.

#### **A.3.1. Métodos tradicionales**

##### **A.3.1.1. Cuantificación relativa**

Los primeros trabajos publicados para la detección y determinación de proteínas empleaban electroforesis en geles de poliacrilamida de una o dos dimensiones.<sup>4</sup> La electroforesis en gel de dos dimensiones es una técnica poderosa para separar y aislar proteínas, pudiendo incluso resolver diferentes PTMs de una proteína dada.

Para la detección de fosfoproteínas, se incorpora in vivo o in vitro  $^{32}\text{P}$ . Posteriormente, las bandas de las proteínas se detectan en una película de autorradiografía o con equipos de imágenes digitales.<sup>6</sup> El marcaje con  $^{32}\text{P}$  presenta varios inconvenientes. En primer lugar, el tejido debe poder ser marcado radiactivamente y no siempre la eficacia del marcaje es elevada. Además, altos niveles de  $^{32}\text{P}$  pueden provocar daños celulares y alterar los niveles de fosforilación. Por último, el laborante se ve sometido a elevadas cantidades de radiactividad, con los peligros que ello conlleva. En cuanto a la posibilidad de cuantificación, ésta es poco precisa ya que se basa en la comparación de las bandas observadas en las placas radiográficas.<sup>20,21</sup>

Otra técnica aplicada en la detección de fosfoproteínas es la técnica Western-Blot, que emplea anticuerpos fosfoespecíficos. Una importante limitación es que los anticuerpos anti-

fosfoserina y –fosfotreonina son muy escasos. Además, el uso de anticuerpos específicos exige conocer previamente la fosfoproteína que se está buscando.<sup>22</sup>

### A.3.1.2. Cuantificación absoluta

La aparición de fosfoanticuerpos ha permitido también el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos heterogéneos específicos (ELISAs) para proteínas fosforiladas, siendo los más empleados los ELISAs tipo sandwich. Tras la adición secuencial de los anticuerpos y sustratos necesarios, se genera un producto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente. A pesar de que esta técnica es versátil y robusta, es necesario disponer de anticuerpos fosfoespecíficos, por lo que cae en las limitaciones ya discutidas anteriormente para Western-Blot.<sup>23</sup>

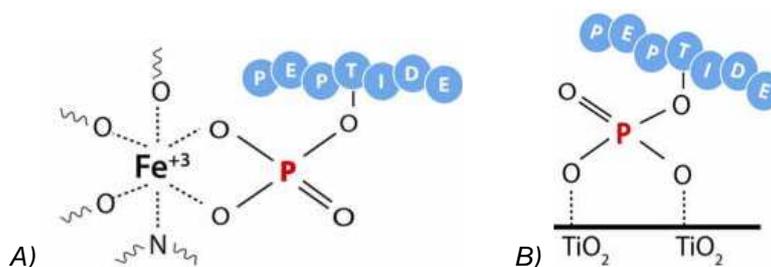
### A.3.2. **Espectrometría de masas molecular**

Aunque la fosforilación es fácilmente detectada con los métodos tradicionales comentados, que de hecho son una herramienta básica en el mapeo del fosfoproteoma, dichos métodos no permiten identificar nuevas fosfoproteínas o localizar los sitios de fosforilación específicos en una fosfoproteína concreta. La espectrometría de masas molecular (MS molecular), empleando como fuentes de ionización electrospray (ESI) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), se ha utilizado ampliamente en los últimos años para el estudio de la fosforilación. La MS puede, a priori, identificar cada fosfopéptido y localizar los sitios de fosforilación en una proteína concreta, además de presentar elevada sensibilidad, versatilidad y rapidez. Por estos motivos, la MS molecular se ha postulado como la técnica capaz de superar las limitaciones de los métodos tradicionales en el análisis de fosfoproteínas.<sup>8</sup>

El análisis de fosfoproteínas por MS molecular resulta complicado debido a varios motivos. Por una parte, las fosfoproteínas suelen ser muy poco abundantes y solo una pequeña parte de la proteína total está fosforilada, presentando un amplio rango dinámico. Además, en MS molecular se dan interferencias de péptidos no fosforilados, ya que estos últimos se ionizan mejor y están en mayor abundancia, lo que afecta a la ionización y, por tanto, detección del péptido fosforilado. Por todos estos motivos, las fosfoproteínas deben ser enriquecidas o purificadas antes del análisis cuantitativo por MS molecular.<sup>8,9</sup>

#### A.3.2.1. Estrategias de enriquecimiento

Los métodos más usados para el enriquecimiento de fosfopéptidos son la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) y la cromatografía de afinidad de óxidos metálicos (MOAC), ilustrados en la Figura 2.

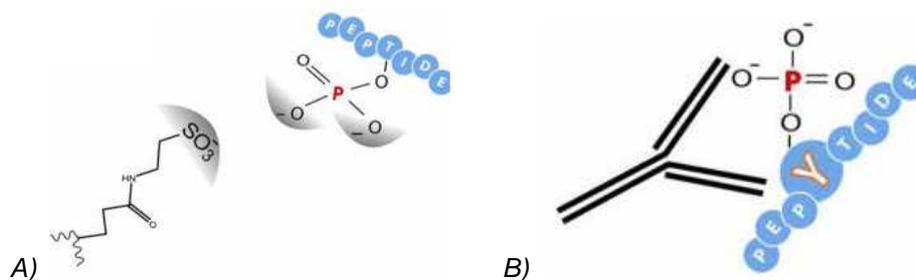


**Figura 2.** Enriquecimiento de fosfopéptidos: A) IMAC; B) MOAC.<sup>24</sup>

IMAC se basa en la afinidad de los grupos fosfato por iones metálicos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ti}^{4+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{4+}$ ...) inmovilizados en la fase estacionaria gracias a diversos quelantes.<sup>25,26</sup> Las mayores limitaciones del método son la unión de péptidos no fosforilados que contienen un alto número de residuos de aminoácidos ácidos y la influencia de la naturaleza del material, el quelante empleado y las condiciones de elución. Se han desarrollado recientemente diferentes estrategias para superar estos inconvenientes y mejorar el enriquecimiento, por ejemplo, empleando microesferas magnéticas<sup>27</sup> o IMAC-IMAC.<sup>28</sup>

Debido a las limitaciones nombradas, MOAC surgió como alternativa a IMAC en 1997.<sup>29</sup> Se basa en el empleo de resinas de óxidos metálicos, fundamentalmente  $\text{TiO}_2$ , que permite obtener mayor selectividad y recuperación de fosfopéptidos.<sup>30</sup>

La cromatografía de intercambio catiónico (SCX) también se ha empleado en el enriquecimiento de fosfopéptidos (Figura 3.A). El enriquecimiento mediante SCX se debe a las diferencias entre cargas que presentan en disolución los fosfopéptidos respecto a los péptidos no fosforilados. A  $\text{pH}=2.7$  un péptido tríptico típico suele tener carga neta  $+2$  mientras que el mismo péptido fosforilado reduce la carga en una unidad.<sup>8</sup> La elución se produce aplicando un gradiente de sales. Aunque el método aún no es totalmente específico para fosfopéptidos,<sup>31</sup> ha sido empleado como un primer paso de separación seguido de IMAC o MOAC en múltiples trabajos.<sup>32-34</sup>



**Figura 3.** Enriquecimiento de fosfopéptidos: A) SCX; B) Inmunoprecipitación p-Tyr.<sup>24</sup>

Recientemente, la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) ha demostrado ser una herramienta poderosa en la separación de fosfopéptidos.<sup>35</sup> Emplea una columna con fase estacionaria polar y fase móvil parcialmente hidrofílica, de modo que los péptidos son retenidos en proporción a su hidrofiliidad. Tiene como ventaja que no requiere adición de sales no volátiles a las muestras (como en SCX) y por tanto puede ser acoplada online a MS.<sup>36</sup>

También se ha aplicado la cromatografía líquida de interacción de repulsión hidrofílica (ERLIC). La separación se puede llevar a cabo en isocrático ya que la columna (intercambio aniónico débil) presenta una carga similar a los analitos pero el disolvente contiene suficiente fase orgánica para forzar a los solutos a permanecer en la columna a pesar de la repulsión electrostática.<sup>37</sup> Esta técnica está ganando popularidad en los últimos años.<sup>38</sup>

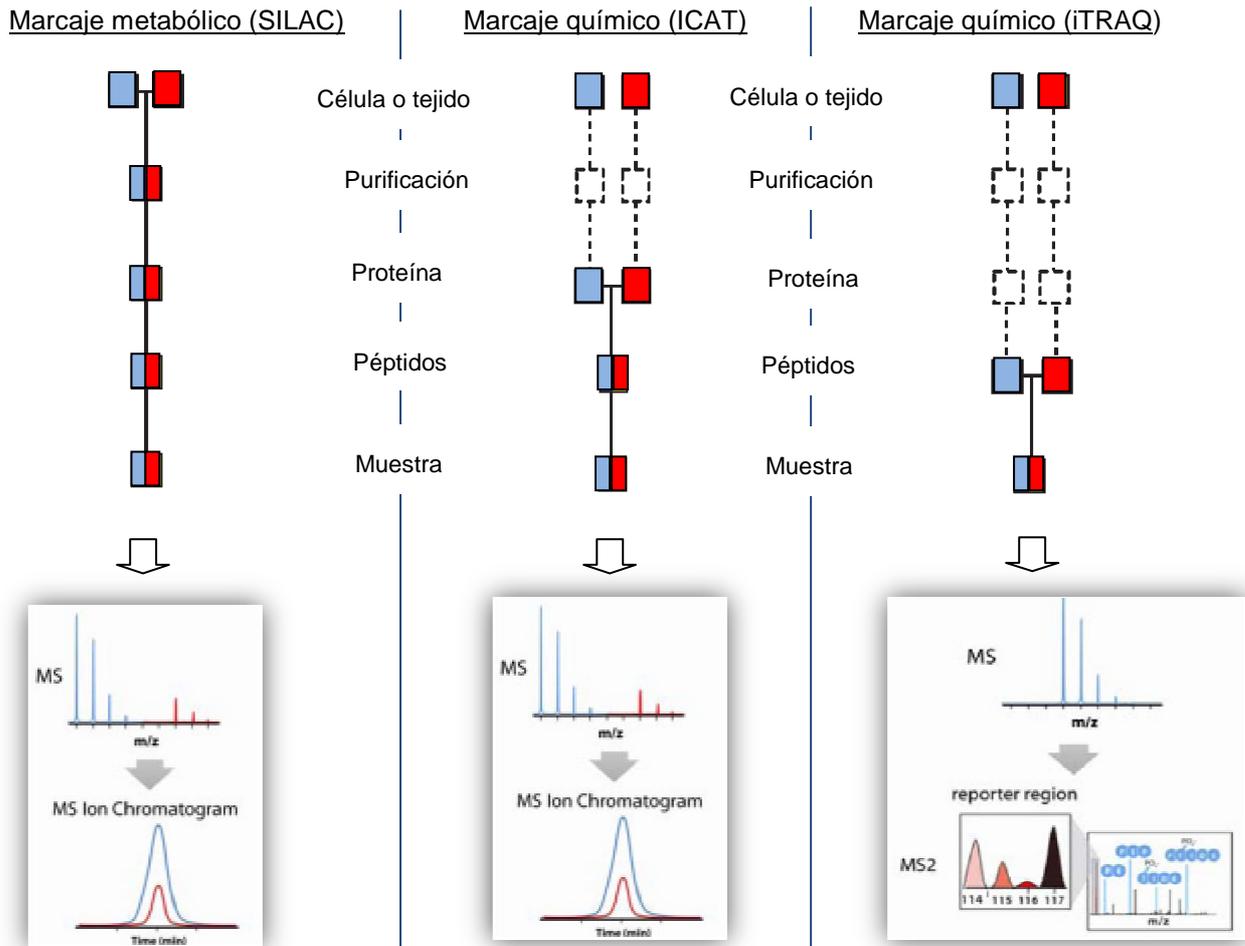
Finalmente, el empleo de anticuerpos permite la inmunoprecipitación específica en una muestra compleja de una proteína que se sospecha que pueda estar fosforilada (Figura 3.B). La inmunopurificación más empleada utiliza anticuerpos antifosfoTyr ya que presentan mayor eficacia que los pSer y pThr. En este caso, es necesario el uso de métodos alternativos.<sup>39</sup>

### A.3.2.2. Cuantificación relativa

Aunque la espectrometría de masas molecular ha probado ser una extraordinaria herramienta para la caracterización de proteínas, la medida de las intensidades de los péptidos no proporciona información cuantitativa de forma directa, ya que la eficiencia de ionización en MS molecular varía dependiendo de las propiedades físico-químicas del péptido y la presencia de otros componentes en la matriz. Por este motivo, se han desarrollado fundamentalmente estrategias de cuantificación relativa basadas en el marcaje con isótopos estables, por comparación de una muestra que mantiene el elemento natural con otra muestra que incorpora la marca isotópica.<sup>19</sup>

Las características y propiedades físico-químicas de los péptidos sin marcar y marcados con isótopos estables permanecen semejantes exceptuando la diferencia de masa introducida por la marca isotópica. Tras mezclar las dos poblaciones, los péptidos se analizan simultáneamente, apareciendo como pares (dobletes) en el espectro de MS. Las intensidades del doblete permiten realizar la cuantificación de péptido relativa para las dos muestras comparadas.<sup>8</sup>

Los marcajes se clasifican, según el momento en el que se realizan, en marcajes *in vivo* o *in vitro*, también denominados metabólico o químico, respectivamente. En la Figura 4 se esquematizan los diferentes tipos de marcaje que serán descritos a continuación más detalladamente.



**Figura 4.** Diagramas de cuantificación relativa de fosfoproteínas con marcaje metabólico (SILAC) y marcaje químico (ICAT e iTRAQ). En rojo se representa la muestra marcada isotópicamente y en azul la no marcada.<sup>19,24</sup>

#### A.3.2.2.1. Marcaje *in vivo* o metabólico

La estrategia más empleada consiste en introducir aminoácidos marcados con isótopos estables en los cultivos celulares (SILAC), por ejemplo  $^{13}\text{C}_6\text{-Arg}$ .<sup>40</sup> Se hacen crecer dos poblaciones celulares idénticas añadiendo a una de ellas el aminoácido marcado y a otra el “natural”, de modo que cada proteoma celular incorpora el aminoácido que se le ha suministrado. Así, cada par de péptidos estará separado en el espectro por la diferencia de masa introducida por el aminoácido marcado.<sup>41</sup> La estrategia SILAC ha sido empleada ampliamente en fosfoproteómica por ser especialmente adecuada para el estudio de cambios en el grado de fosforilación.<sup>42</sup>

Una alternativa a SILAC es el marcaje metabólico incorporando el isótopo a todos los aminoácidos sintetizados por la célula por enriquecimiento del medio del cultivo celular en  $^{15}\text{N}$ . El principal inconveniente de esta metodología es la dificultad en la interpretación de los espectros obtenidos.<sup>41</sup>

### A.3.2.2.2. *Marcaje in vitro o químico*

Otra posibilidad para la cuantificación relativa consiste en modificar químicamente los dos proteomas bajo estudio, antes o después de la digestión proteolítica, derivatizando químicamente los péptidos. Existen fundamentalmente dos estrategias: Marcaje isotópico o marcaje isobárico.

El marcaje isotópico diferencial de afinidad (ICAT) emplea un reactivo dirigido a la cisteína que puede incorporar  $^1\text{H}$  o deuterio. Las muestras se marcan una con el reactivo ICAT ligero (con  $^1\text{H}$ ) y otra con el pesado (con deuterio), resultando en una diferencia en masa de 8 Da.<sup>43</sup> Este procedimiento sólo permite la cuantificación de sitios de fosforilación presentes en los péptidos tripticos marcados químicamente. Sin embargo, el marcaje también puede dirigirse específicamente a fosfoSer y fosfoThr por  $\beta$ -eliminación del fosfato y adición de 1,2-etanoditiol marcado isotópicamente (PhIAT).<sup>44</sup>

Otra estrategia de marcaje emplea metanol común o deuterado para derivatizar el grupo C-terminal de los fosfopéptidos en O-metil ésteres.<sup>45</sup> Una estrategia similar derivatiza las aminas por dimetilación con formaldehído normal o deuterado.<sup>46</sup> Finalmente, otra posibilidad combina una digestión con tripsina y agua con  $^{16}\text{O}$  y  $^{18}\text{O}$  seguida de formación de un O-metil éster usando metanol con  $^{16}\text{O}$  u  $^{18}\text{O}$ .<sup>47</sup>

Por otra parte, se han desarrollado reactivos para marcaje isobárico (iTRAQ o TMT), que reaccionan con los extremos N-terminales y los residuos de lisina después de digerir la proteína. Los péptidos de diferentes muestras se marcan con reactivos que tienen la misma masa nominal. Sin embargo, cuando se someten a MS/MS, cada marca se disocia del péptido produciendo iones con menor m/z diferenciados en 1 Da. Esto permite cuantificar de forma relativa hasta 4 muestras diferentes.<sup>48</sup>

### A.3.2.3. Cuantificación absoluta

Los métodos descritos en el apartado anterior permiten obtener las abundancias relativas de hasta cientos de sitios de fosforilación específicos. Sin embargo, la cuantificación absoluta mediante MS molecular requiere el uso de patrones específicos de cada péptido, debido a la variabilidad de la eficiencia de ionización de los péptidos ya comentada.

Una metodología común consiste en sintetizar químicamente péptidos marcados isotópicamente a través de tecnología AQUA y después añadirlos en una cantidad determinada a la muestra como patrones internos. El espectro de masas obtenido está representado por un doblete de picos espectrales separados una m/z determinada correspondiente al marcaje, de modo que la cuantificación se realiza mediante dilución isotópica. El empleo de esta estrategia para el análisis de (fosfo)proteínas requiere la síntesis de (fosfo)péptidos tripticos marcados isotópicamente y, en el caso de que se encuentren fosforiladas, estas deben contener el sitio de fosforilación buscado. Obviamente, la secuencia de la (fosfo)proteína debe ser conocida de antemano.<sup>49</sup>

Otra estrategia para la cuantificación absoluta se conoce como QconCAT y se basa en la síntesis artificial mediante ingeniería genética de una cierta proteína formada por varios péptidos trípticos marcados isotópicamente. Al igual que en el caso de AQUA, la secuencia debe ser conocida de antemano.<sup>50</sup>

### A.3.3. Espectrometría de masas elemental

La espectrometría de masas molecular es una herramienta útil para la evaluación de cambios entre una muestra y otra (cuantificación relativa). Sin embargo, las estrategias de cuantificación absoluta mediante MS molecular requieren la síntesis química de cada fosfopéptido y, por tanto, están limitadas a proteínas con fosforilaciones conocidas y a la disponibilidad de fosfopéptidos marcados isotópicamente.

Hoy en día, la espectrometría de masas elemental con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) es una técnica ampliamente reconocida para el análisis de biomoléculas que contienen elementos detectables mediante ICP, pudiendo aplicarse también a proteínas, ya que estas contienen heteroátomos (cualquier elemento presente en la biomolécula que sea diferente de C, H, O, o N), por ejemplo, S, P, Se ó diversos metales (Zn, Fe, Mn...)<sup>51</sup>

El empleo de ICPMS presenta varias ventajas: bajos límites de detección para la mayoría de elementos, mínimos efectos de matriz, amplio rango lineal, información de relaciones isotópicas y facilidad en el acoplamiento con técnicas de separación.<sup>52</sup> Sin embargo, la característica más excepcional es que la respuesta elemental obtenida con ICPMS, bajo ciertas condiciones, puede ser directamente proporcional a la cantidad absoluta del elemento medido, independientemente de la estructura del compuesto. Esto posibilita el desarrollo de metodologías para la cuantificación absoluta de (fosfo)proteínas con ICPMS empleando patrones genéricos. De este modo, se podría monitorizar (fosfo)proteínas de forma simultánea o calcular su recuperación en preparaciones y purificaciones de muestra.<sup>53</sup>

Por contra, el ICPMS como analizador elemental que es, no puede distinguir entre las distintas especies que contienen un determinado elemento en una muestra, a no ser que dichas especies lleguen al plasma separadas en el tiempo. De ahí que el empleo del ICPMS en proteómica esté supeditado al uso de una técnica separativa acoplada (normalmente cromatografía) lo suficientemente eficiente que permita aislar completamente las especies en estudio.

#### A.3.3.1. Análisis de <sup>31</sup>P y <sup>32</sup>S por ICPMS

Las proteínas contienen heteroátomos de forma natural que pueden ser medidos mediante ICPMS. El azufre está presente en los aminoácidos cisteína (Cys) y metionina (Met). Estadísticamente, un péptido o proteína que contenga más de 20 aminoácidos contendrá al menos un

azufre y por tanto, será detectable mediante ICPMS.<sup>54</sup> Una medida adecuada del azufre en proteínas mediante ICPMS posibilitaría la cuantificación absoluta de proteínas.

Por otra parte, el fósforo se incorpora a los aminoácidos Ser, Thr y Tyr mediante el proceso de fosforilación ya descrito. Una medida adecuada de fósforo mediante ICPMS podría emplearse, por tanto, para la cuantificación absoluta de fosforilación en proteínas.

Sin embargo, la medida de  $^{31}\text{P}$  y  $^{32}\text{S}$  mediante el ICPMS con un único cuadrupolo (ICPQMS) presenta importantes limitaciones. En primer lugar, ambos elementos tienen un alto potencial de ionización (10.484 eV para P y 10.360 eV para S), lo que implica una baja eficacia de ionización en el plasma. Además, existen una gran cantidad de interferencias poliatómicas para ambos elementos, dando lugar a una elevada señal de fondo a las  $m/z$  31 y  $m/z$  32, siendo dichas interferencias más acusadas para el  $^{32}\text{S}$ .<sup>52</sup>

Estas interferencias han sido minimizadas hasta la fecha empleando las siguientes aproximaciones instrumentales:

- i) ICPMS de alta resolución (o doble enfoque). Esta técnica permite separar físicamente  $^{31}\text{P}^+$  y  $^{32}\text{S}^+$  de sus interferencias poliatómicas. El factor limitante es su elevado precio.<sup>55,56</sup>
- ii) ICPMS con celda de reacción dinámica (DRC). Resuelve químicamente  $^{31}\text{P}^+$  y  $^{32}\text{S}^+$  de sus interferencias poliatómicas por oxidación a  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  ( $m/z$  47) y  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$  ( $m/z$  48). Sin embargo, los límites de detección para DRC son tres veces más altos que para ICP de doble enfoque debido fundamentalmente a que las señales de fondo a esas nuevas  $m/z$  son todavía elevadas.<sup>57</sup>
- iii) ICPMS con celda de colisión empleando un gas de colisión, siendo lo común para interferencias de  $^{31}\text{P}$  utilizar He ó Xe.<sup>58</sup>
- iv) Recientemente, el desarrollo de un nuevo ICP con triple cuadrupolo (ICPQQQ) posibilita la detección de S y P libre de interferencias. Este equipo, empleado en el presente Trabajo Fin de Máster, será descrito con más detalle en el apartado A.3.3.4.

### A.3.3.2. Acoplamiento a HPLC

Como se ha comentado anteriormente, dado que la señal en ICPMS puede ser independiente de la especie que contiene el elemento, antes de la detección es estrictamente necesaria la separación adecuada de las distintas especies que contienen el elemento de interés.

Se han empleado fundamentalmente dos acoplamientos al ICPMS para la detección de fosfoproteínas. Por una parte, el análisis de los heteroátomos presentes en las manchas de geles de electroforesis se puede realizar mediante el acoplamiento de un sistema de ablación láser (LA) al ICPMS.<sup>59</sup>

Sin embargo, la técnica híbrida más empleada para estudios de especiación biológica es la basada en el acoplamiento de HPLC-ICPMS.<sup>60</sup> En concreto, HPLC en fase reversa (RP-HPLC) ofrece mejores características para separación de péptidos.<sup>61</sup>

El acoplamiento de RP-HPLC con ICPMS presenta un importante problema: las fases móviles empleadas contienen altos porcentajes de modificadores orgánicos, que afectan negativamente a la estabilidad del plasma y producen un descenso en su temperatura. Como consecuencia, se produce una acusada variación de la sensibilidad del elemento medido a lo largo del gradiente, especialmente para elementos con altos potenciales de ionización, como P y S. Esto supone una importante limitación para el desarrollo de metodologías de cuantificación absoluta. Además, se forman depósitos de carbono en los conos que producen fuertes efectos de deriva.<sup>62</sup>

Una estrategia para minimizar el impacto de las fases móviles con altos porcentajes de modificadores orgánicos consiste en reducir el flujo a los niveles de HPLC nano y capilar (capHPLC) y el empleo de micronebulizadores de consumo total.<sup>55,63</sup> En la Tabla 1 se muestran comparativamente los parámetros típicos en HPLC convencional, capilar y nano.

**Tabla 1.** Comparación entre HPLC convencional, capilar y nano.

<b>Cromatografía</b>	<b>Diámetro interno de la columna</b>	<b>Rango de flujos típicos</b>
<b>Convencional</b>	3.2 – 4.6 mm	0,3 - 1 mL/min
<b>Capilar</b>	250 – 500 µm	1 – 10 µL/min
<b>Nano</b>	10 – 150 µm	10 – 1000 nL/min

El empleo de capHPLC presenta además algunas ventajas, como son la alta eficacia de separación, bajo consumo de fase móvil y bajo consumo de muestra, además de una drástica reducción de los iones poliatómicos que interfieren, fondos más bajos y mejores LD.<sup>63</sup>

Desafortunadamente, el empleo de capHPLC no es suficiente por sí solo para corregir la variación de la sensibilidad producida durante el gradiente. Una alternativa para minimizar la fuerte variación de la señal de P y S durante el gradiente en RP-HPLC consiste en emplear un flujo post-columna que contenga el mismo modificador orgánico durante el gradiente. Este concepto fue probado, inicialmente, empleando nanoHPLC-ICPMS para el análisis de biomoléculas que contienen Co and Se.<sup>64</sup>

### A.3.3.3. Cuantificación de fosforilación de proteínas empleando ICPQMS

Teniendo en cuenta las aproximaciones descritas en el apartado anterior, Ana Pereira Navaza et al. desarrollaron una cuantificación independiente de la matriz y de la especie para fosforilación de proteínas mediante cap-RP-HPLC acoplado a ICPQMS (tipo cuadrupolo equipado con una celda de colisión) y empleando como patrón de cuantificación un estándar comercial de P.<sup>65</sup>

En esta metodología, la adición de un flujo postcolumna al 40% de acetonitrilo (ACN) logra mantener constante la sensibilidad de  $^{31}\text{P}$  durante la parte del gradiente donde eluyen los (fosfo)péptidos, de modo que la señal de  $^{31}\text{P}$  obtenida puede ser directamente proporcional a la masa de  $^{31}\text{P}$  presente en la especie e independiente de su estructura química. Se logra así una cuantificación absoluta y genérica de fosfopéptidos seleccionando bis(4-nitrofenil) fosfato (BNPP) como patrón genérico.

La metodología se aplicó a la cuantificación absoluta de la fosforilación de dos patrones de fosfopéptidos y a un digerido triptico de  $\beta$ -caseína de leche bovina. Puesto que el ICPQMS sólo permite una medida adecuada del  $^{31}\text{P}$ , una determinación absoluta del grado de fosforilación requiere conocer la concentración exacta de proteína. Para ello, en primer lugar se determinó el P total en el digerido mediante adiciones estándar y capFIA-ICPMS y, a continuación, el P inorgánico por microcentrifugación y medida del P en el filtrado. Se calculó además la recuperación de las especies de P de la columna de fase reversa ya que para la cuantificación de fosfopéptidos se requiere que la suma total de P cuantificados para los fosfopéptidos coincida con el total de P enlazado a los péptidos inyectados y eluidos de la columna de fase reversa empleada. Finalmente, se adicionó el BNPP al digerido triptico y, teniendo en cuenta la recuperación de la columna, el P total y el P inorgánico presente, se calculó el grado de fosforilación de la  $\beta$ -caseína, mediante capHPLC-ICP-MS. El acoplamiento de capHPLC a ESIQ-TOF posibilitó la elucidación de las secuencias de aminoácidos de cada péptido.

Esta metodología se aplicó para la evaluación de procesos de enriquecimiento de fosfopéptidos basados en el uso de cartuchos de  $\text{TiO}_2$ <sup>66</sup> y la determinación de la cinética de fosforilación/defosforilación.<sup>67</sup>

### A.3.3.4. Cuantificación de fosforilación de proteínas empleando ICPQQQ

La metodología descrita en el apartado A.3.3.3 emplea únicamente la medida de  $^{31}\text{P}$ , ya que el ICPMS equipado con un único cuadrupolo no permite una medida adecuada de  $^{32}\text{S}$  debido a las serias interferencias poliatómicas que presenta este elemento.

El desarrollo de un ICP equipado con un triple cuadrupolo (ICPQQQ) ha supuesto un importante avance en la cuantificación absoluta de proteínas y fosfoproteínas. Este equipo se basa en el concepto de MS en tándem (QQQ) típicamente usado en MS molecular.

El ICPQQQ fue empleado por Silvia Diez Fernández et al. por primera vez para la medida de especies de P y S en fosfoproteómica.<sup>68</sup> La Figura 5 describe el fundamento del equipo para la eliminación de las interferencias poliatómicas de P y S.

El primer cuadrupolo (Q1) trabaja como un filtro de masas seleccionando los iones analito ( $^{31}\text{P}^+$  y  $^{32}\text{S}^+$ ) y sus interferencias poliatómicas. La reacción con  $\text{O}_2$  en la celda separa los analitos de sus interferencias desplazándolos a una nueva masa, ya que la reacción es mucho más eficiente para  $^{31}\text{P}^+$  y  $^{32}\text{S}^+$  que para sus interferencias poliatómicas. Esto posibilita una detección de P y S libre de interferencias tras fijar el segundo cuadrupolo (Q2) a 16 unidades de masa mayor que Q1: m/z 47 para  $\text{PO}^+$  y m/z 48 para  $\text{SO}^+$ . Es importante reseñar que la principal diferencia entre el ICPQQQ y el DRC es el primer nivel específico fijado en Q1. Este nivel, a m/z 31 y 32, permite eliminar las interferencias de los iones producto a m/z 47 y 48 y, por tanto, reducir drásticamente el fondo y el ruido donde se va a realizar la detección final.

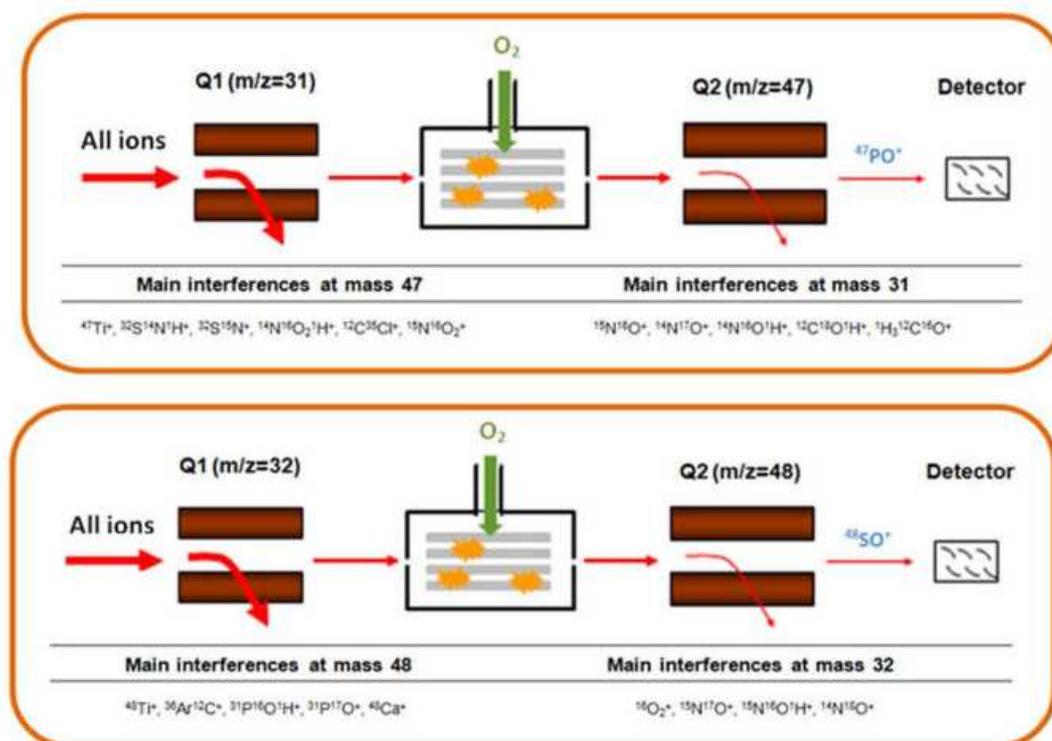


Figura 5. Configuración del ICPQQQ para la detección libre de interferencias de P y S.<sup>68</sup>

Empleando capHPLC acoplado al ICPQQQ se analizó BNPP y metionina (Met) reportando los límites de detección más bajos publicados usando ICPMS para el análisis de especies que contienen S y P. También se analizaron patrones de péptidos y fosfopéptidos, demostrando así el potencial del ICPQQQ para el análisis de S y P y su aplicabilidad en fosfoproteómica.

Recientemente, en investigaciones realizadas en el Grupo de Espectrometría Analítica previas a este Trabajo Fin de Máster, se ha empleado el ICPQQQ para la determinación del grado de

fosforilación en proteína intacta acoplándolo a cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) mediante un nebulizador convencional. En primer lugar, se realizó un calibrado de la relación molar P/S en base a la relación de áreas obtenida para los patrones genéricos BNPP y Metionina. A continuación, se analizó  $\beta$ -caseína intacta acoplando la columna de SEC al ICPQQQ. Tras calcular la relación de áreas, se obtuvo la relación molar P/S y, finalmente, el grado de fosforilación de la proteína.

## **B. OBJETIVOS**

En la introducción de este trabajo se ha puesto de manifiesto el creciente interés en la cuantificación absoluta de la fosforilación de proteínas y las limitaciones de los métodos existentes en la actualidad.

Por una parte, se ha descrito una metodología basada en el acoplamiento de cap-RP-HPLC a ICPQMS para la cuantificación de la fosforilación absoluta de fosfopéptidos, desarrollada previamente en el Grupo de Investigación de Espectrometría Analítica. Por otra parte, como se ha mencionado, el nuevo ICPQQQ posibilita la medida simultánea de P y S, lo que ha permitido también determinar el grado de fosforilación en proteína intacta mediante SEC-ICPQQQ. En este contexto, resulta lógico aunar ambas estrategias (cap-RP-HPLC acoplado al ICPQQQ) para lograr una cuantificación absoluta del grado de fosforilación no sólo de proteína intacta, si no también de fosfopéptidos trípticos gracias a la medida simultánea de S y P.

El objetivo analítico del presente Trabajo Fin de Máster consiste en el desarrollo de una metodología para la **cuantificación absoluta del grado de fosforilación global y específico de fosfoproteínas mediante capHPLC-ICPQQQ**. Para ello, se han abordado los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización del flujo post-columna para compensar los cambios de sensibilidad durante el gradiente de fase reversa. Este paso resulta imprescindible para el desarrollo de una cuantificación absoluta.
2. Cuantificación absoluta del grado de fosforilación global en proteína intacta ( $\beta$ -caseína) empleando capHPLC-ICPQQQ y patrones genéricos de P y S.
3. Cuantificación absoluta del grado de fosforilación específico de un digerido tríptico de  $\beta$ -caseína empleando capHPLC-ICPQQQ y patrones genéricos de P y S.
4. Identificación de los fosfopéptidos del digerido tríptico mediante MS molecular.

Desde el punto de vista académico, mediante este trabajo Fin de Máster se ha pretendido desarrollar las siguientes competencias y habilidades entre las que destacan:

1. Conocimiento de los fundamentos teóricos de las técnicas empleadas y, especialmente, su aplicación a la resolución de problemas analíticos.
2. Manejo de técnicas analíticas, concretamente, cromatografía de líquidos y espectrometría de masas elemental y molecular.
3. Desarrollo de trabajo autónomo y en equipo.
4. Interpretación y tratamiento de los datos obtenidos, pudiendo emitir juicios científicos y conclusiones a partir de los mismos.
5. Desarrollo de la capacidad de comunicación de resultados científicos, tanto de forma oral como escrita.

## **C. EXPERIMENTAL**

## C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

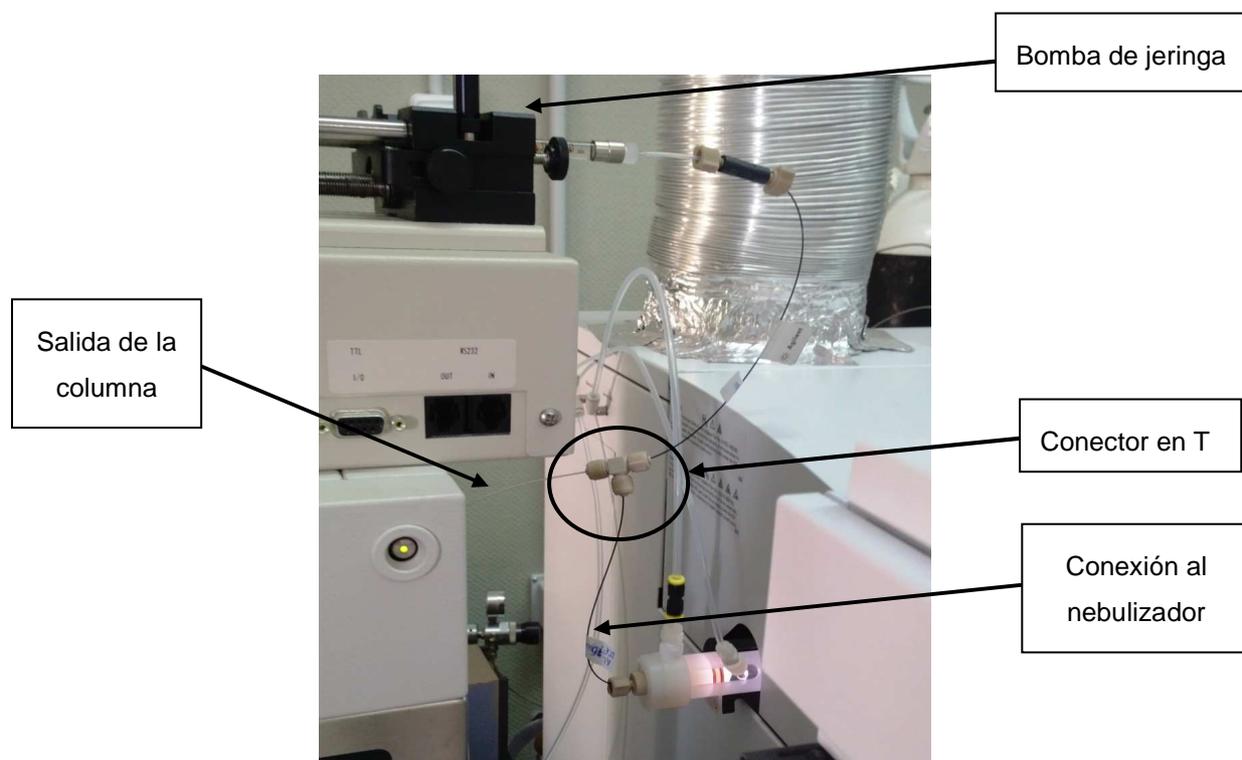
### C.1.1. Instrumentación

#### C.1.1.1. Sistema HPLC capilar y horno de columnas

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando un sistema de HPLC capilar Agilent 1200 Series (Agilent, Alemania). La columna de fase reversa empleada fue una Zorbax SB C18 (Agilent, Alemania) de 150 mm de longitud, 0.3 mm de diámetro interno (d.i.) y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Las fases móviles A y B consistieron en agua y acetonitrilo, respectivamente, con 0,1% de ácido fórmico. Se empleó un volumen de inyección de 1-2  $\mu\text{L}$  y un flujo, para experimentos regulares, de 3.5  $\mu\text{L min}^{-1}$ . En los cromatogramas que requirieron temperatura, se empleó un horno de columna Mistral (Spark, Holanda).

#### C.1.1.2. Dilución post-columna

El flujo post-columna se añadió a través de una bomba de jeringa digital KDS 410 (KD Scientific, EE.UU.). Se empleó un conector en forma de T de PEEK (Upchurch, EE.UU.). El capilar que sale de la columna (50  $\mu\text{m}$  d.i.) y el capilar proveniente de la bomba de jeringa (100  $\mu\text{m}$  d.i.) se conectan a la T. A su vez, se conecta a la T un capilar (75  $\mu\text{m}$  d.i.) que dirige la mezcla de los flujos hacia el nebulizador. En la Figura 6 se observa el montaje experimental descrito.



**Figura 6.** Montaje experimental para dilución post-columna.

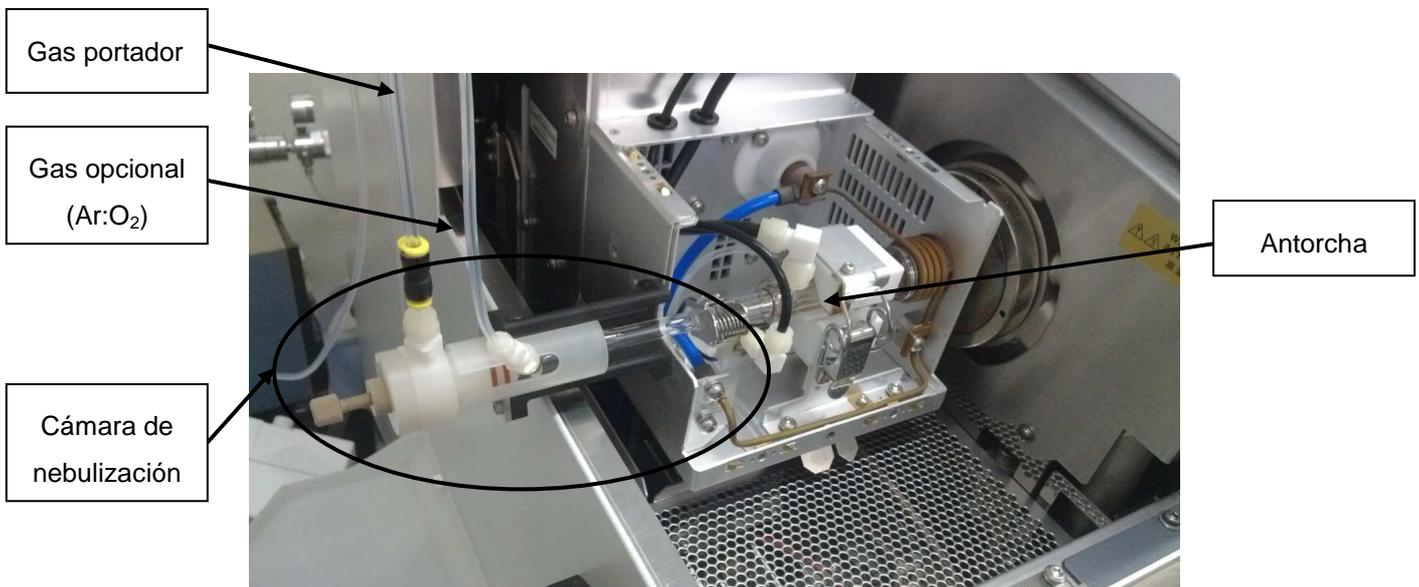
C.1.1.3. Interfase capHPLC-ICPMS

Para acoplar el capHPLC al ICPMS se empleó el kit de interfase capilar G3680A de Agilent, que consiste en un nebulizador de consumo total dentro de una pequeña cámara de nebulización de cuarzo.



**Figura 7.** Nebulizador de consumo total.

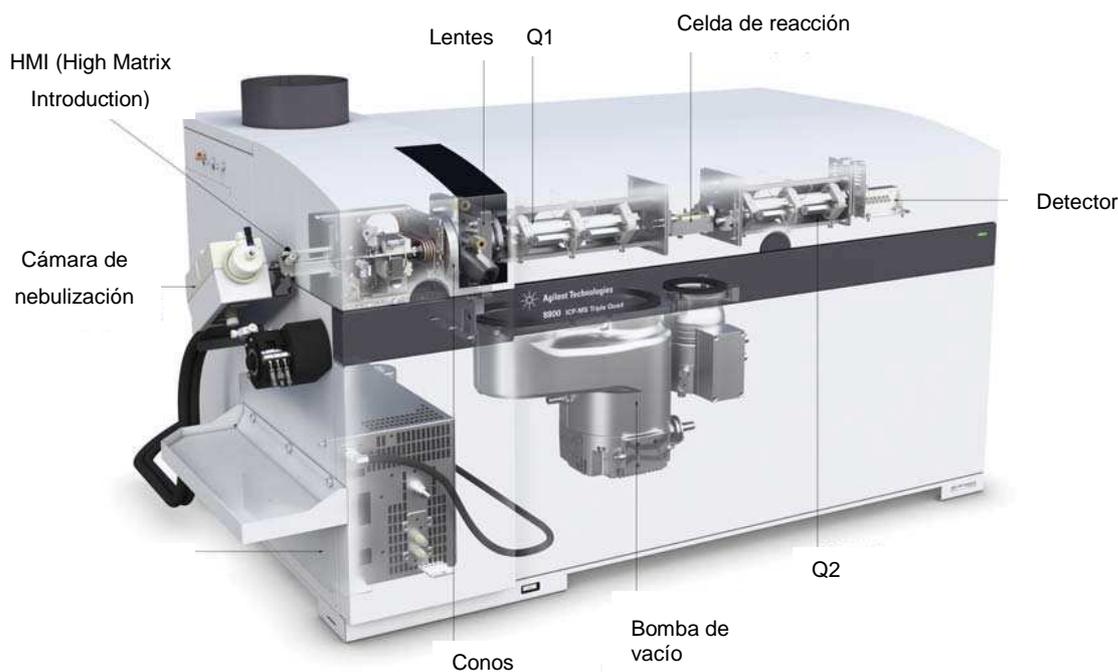
En la Figura 7 se observa el nebulizador de consumo total empleado y el capilar que contiene dicho nebulizador. En la Figura 8 se observa la interfase completa acoplada a la antorcha del ICPMS.



**Figura 8.** Acoplamiento de la interfase capilar a la antorcha del ICPMS.

C.1.1.4. Espectrómetro de masas atómico: ICPQQQ

Se empleó un ICPQQQ (8800 ICPQQQ, Agilent, Japón). Un esquema del equipo se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.** ICPQQQ.

El flujo portador de Ar se fijó a  $0.85 \text{ L min}^{-1}$ . Debido al uso de altos porcentajes de modificadores orgánicos, se empleó un flujo opcional de  $\text{O}_2$  directamente añadido a la cámara de nebulización conectada a la antorcha del ICP (ver Figura 8). Este flujo de  $\text{O}_2$  se introdujo por medio de un flujo  $\text{Ar}:\text{O}_2$  (80:20) a  $0.068 \text{ L min}^{-1}$ . Los conos (Sampler y Skimmer) que se emplearon fueron de platino. Se introdujo también  $\text{O}_2$  en la celda de reacción a  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$ . Esto permite separar las distintas interferencias de P y S, tal como se explicó en el apartado A.3.3.4. Se empleó un tiempo de integración de 0.15 s. La integración de los picos cromatográficos se llevó a cabo usando el software MassHunter (Agilent).

#### C.1.1.5. Espectrómetro de masas molecular (UPLC-QqQ)

Para la identificación de los péptidos del digerido triptico se empleó un equipo UPLC-ESI-QqQ (modelo 6460, Agilent). En este equipo se acopla UPLC a un espectrómetro de masas que emplea como fuente de ionización ESI y un triple cuadrupolo como analizador de masas. La columna empleada fue una Zorbax SB C18, de 50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y  $1.8 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

#### C.1.2. Reactivos

El agua MilliQ se obtuvo utilizando un sistema ChemLabor Millipore (EE.UU.) con un filtro de  $0.22 \mu\text{m}$ . El acetonitrilo empleado fue Optima® LC/MS, suministrado por Fisher Scientific (EE.UU.). El ácido fórmico empleado fue suministrado por Merck KGaA (Alemania).

La  $\beta$ -caseína, la tripsina y el acetato amónico empleados en la digestión fueron suministrados por Sigma Aldrich (Suiza).

Los patrones de bis(4-nitro-fenil) fosfato (BNPP), metionina (Met), metioninas modificadas N-Acetil-DL-metionina (NAc-Met) y BOC-Metionina-OH (BOC-Met) y el péptido de secuencia VPMLK (BAX) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Suiza).

Los patrones de ICP certificados de P, S, Se y Ge ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) fueron proporcionados por Merck KGaA (Alemania).

## C.2. PROCEDIMIENTOS

### C.2.1. Protocolo de limpieza

Parte del material empleado fue limpiado para reducir los fondos de S. El protocolo de limpieza consistió en dejar el material en un baño de ácido nítrico al 4% durante 24 horas y, posteriormente, en un baño de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ durante otras 24 h. Finalmente, se aclaró y se dejó secar en estufa.

### C.2.2. Corrección de la variación de la sensibilidad

Se ensayaron diferentes combinaciones del flujo proveniente de la bomba de jeringa (post-columna) y del capHPLC, empleando un flujo post-columna al 35 ó al 40% de ACN.

El P y el S en estudio se introdujeron a través de las fases móviles. Empleando las condiciones experimentales recogidas en la Tabla 2, se registraron los cromatogramas para las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$ ,  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$ ,  $^{72}\text{Ge}^+ \rightarrow ^{72}\text{Ge}^+$  y  $^{78}\text{Se}^+ \rightarrow ^{78}\text{Se}^+$  mediante el ICPQQQ. Se registró, además, un cromatograma sin flujo-postcolumna empleando un flujo de capHPLC de  $5.5 \mu\text{L min}^{-1}$ .

**Tabla 2.** Condiciones experimentales para la optimización de la variación de la sensibilidad.

<b>Fase móvil A</b>	$\text{H}_2\text{O}$ milliQ - 1 ppm de S - 1 ppm de P – 50 ppb de Ge (w/v)
<b>Fase móvil B</b>	Acetonitrilo - 1 ppm de S - 1 ppm de P – 50 ppb de Se (w/v)
<b>Gradiente</b>	0-20 min lineal de 2 a 80 %B, 20-25 min lineal de 80 a 2%B
<b>Flujo capHPLC</b>	$3.5$ ó $4 \mu\text{L min}^{-1}$ dependiendo del ensayo
<b>Composición post-columna</b>	35 ó 40 % acetonitrilo (w/w), dependiendo del ensayo
<b>Flujo bomba de jeringa</b>	$5.5$ ó $6 \mu\text{L min}^{-1}$ dependiendo del ensayo

### C.2.3. Cuantificación del grado de fosforilación global de $\beta$ -caseína empleando capHPLC-ICPQQ

#### C.2.3.1. Cálculo del *delay time* y porcentaje de acetonitrilo de elución de la $\beta$ -caseína

Para calcular el *delay time* del equipo de capHPLC se inyectó NAc-Met con las condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 3. Se midió en el ICPQQQ la transición  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$ .

**Tabla 3.** Condiciones cromatográficas para el cálculo del “*delay time*”.

<b>Fase móvil A</b>	H <sub>2</sub> O milliQ - Ácido fórmico 0.1%
<b>Fase móvil B</b>	Acetonitrilo - Ácido fórmico 0.1%
<b>Gradiente</b>	0-5 min isocrático a 2%B, 5.00-5.01 min lineal de 2 a 30% B
<b>Volumen de inyección</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Flujo capHPLC</b>	4.5 $\mu\text{L min}^{-1}$

A continuación, se inyectó  $\beta$ -caseína en una concentración aproximada de 2 ppm de S y preparada en fase A, en las condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 4. Se registraron las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$ ,  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$  en el ICPQQQ y, teniendo en cuenta el *delay time* calculado, se determinó exactamente el porcentaje de acetonitrilo al que eluye.

**Tabla 4.** Condiciones cromatográficas para el cálculo del %ACN de elución de la  $\beta$ -caseína.

<b>Fase móvil A</b>	H <sub>2</sub> O-milliQ – Ácido fórmico 0.1%
<b>Fase móvil B</b>	Acetonitrilo – Ácido fórmico 0.1%
<b>Gradiente</b>	0-2 min isocrático a 2 %B, 2-15 min lineal de 2 a 60 %B, 15-18 min lineal de 60 a 80 %B, 18-21 min isocrático a 80 %B, 21-23 min lineal de 80 a 2 %B
<b>Volumen de inyección</b>	1 $\mu\text{L}$
<b>Flujo capHPLC</b>	4.5 $\mu\text{L min}^{-1}$

#### C.2.3.2. Calibrado de la relación molar P/S

Se realizó un calibrado de la relación molar P/S mediante análisis por inyección de flujo capilar (capFIA). Se empleó como fase móvil 40% de acetonitrilo a un flujo de 3.5  $\mu\text{L min}^{-1}$  en combinación con un flujo post-columna al 40% de acetonitrilo a 6  $\mu\text{L min}^{-1}$ . Se empleó como patrón de

P un estándar de ICP certificado y como patrón de S metionina. A partir de dichos patrones, se realizó un calibrado manteniendo en todos los puntos una concentración constante de S ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) variando la concentración de P de 0 a  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . En todas las preparaciones de muestra, se empleó como disolvente una disolución acuosa al 40% de acetonitrilo. Se inyectaron  $2 \mu\text{L}$  de cada patrón de P y S por triplicado. La relación de áreas obtenida para las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$  y  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$  medidas en el ICPQQQ se representó finalmente frente a la relación molar P/S inyectada.

### C.2.3.3. Cuantificación del grado de fosforilación global de la $\beta$ -caseína

Para determinar el grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína, una disolución de la misma en fase A, a una concentración de aproximadamente 2 ppm de S, se inyectó empleando cap-RP-HPLC-ICPQQQ y los parámetros cromatográficos recogidos en la Tabla 5. La relación de áreas para las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$  y  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$  de la  $\beta$ -caseína se relacionó finalmente, mediante el calibrado de la relación molar de P/S descrito anteriormente, con su grado de fosforilación absoluto.

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas para la cuantificación del grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína.

<b>Fase móvil A</b>	H <sub>2</sub> O milliQ – Ácido fórmico 0.1%
<b>Fase móvil B</b>	Acetonitrilo – Ácido fórmico 0.1%
<b>Gradiente</b>	0-2 min isocrático a 2 %B, 2-15 min lineal de 2 a 60 %B, 15-18 min lineal de 60 a 80 %B, 18-21 min isocrático a 80 %B, 21-23 min lineal de 80 a 2 %B
<b>Flujo capHPLC</b>	$3.5 \mu\text{L min}^{-1}$
<b>Composición post-columna</b>	40% de acetonitrilo (w/w)
<b>Flujo bomba de jeringa</b>	$6.0 \mu\text{L min}^{-1}$

### C.2.4. Cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido trípico de $\beta$ -caseína empleando capHPLC-ICPQQ

#### C.2.4.1. Digestión trípica de $\beta$ -caseína

Se disolvieron 3 mg de  $\beta$ -caseína en 1 mL de una disolución reguladora de acetato amónico 100 mM (pH=8). Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de  $\beta$ -caseína a 300  $\mu\text{L}$  de la disolución reguladora y se calentaron a 90 °C durante 20 min para desnaturalizar la proteína. Por otra parte, 20  $\mu\text{g}$  de tripsina se reconstituyeron con 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético 50 mM. De esta disolución, 25  $\mu\text{L}$  se añadieron a la disolución de proteína desnaturalizada, previamente enfriada, manteniéndola posteriormente a 37 °C durante 12 h para que se produjera la digestión. Finalmente, la reacción se

paró (pH < 5) empleando 5  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial. El digerido se dividió y congeló en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ .

#### C.2.4.2. Cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido trípico de $\beta$ -caseína

A una alícuota del digerido de 50  $\mu\text{L}$  se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de fase A. Se mezclaron 40  $\mu\text{L}$  de dicha disolución y el volumen necesario de disoluciones de BNPP y BAX (empleados como patrones internos de cuantificación) para obtener una concentración en torno a 1 ppm de P y S, respectivamente. Esta disolución se inyectó empleando cap-RP-HPLC con las condiciones cromatográficas recogidas en la Tabla 6, registrando en el ICPQQQ las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$  y  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$ .

**Tabla 6.** Condiciones cromatográficas para la cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido de  $\beta$ -caseína.

<b>Fase móvil A</b>	H <sub>2</sub> O-milliQ – Ácido fórmico 0.1%
<b>Fase móvil B</b>	Acetonitrilo – Ácido fórmico 0.1%
<b>Gradiente</b>	0-6.5 min isocrático a 2 %B, 6.5- 38 min lineal de 2 a 45 %B, 38-48 min lineal de 45 a 95 %B, 48-50 min isocrático a 95 %B, 50-52 min lineal de 95 a 2%B
<b>Flujo capHPLC</b>	3.5 $\mu\text{L min}^{-1}$
<b>Composición post-columna</b>	40% de acetonitrilo (w/w)
<b>Flujo bomba de jeringa</b>	6.0 $\mu\text{L min}^{-1}$

#### C.2.5. Identificación de los péptidos y fosfopéptidos mediante MS molecular

Los diferentes péptidos y fosfopéptidos tratados según el procedimiento C.2.4. se identificaron empleando RP-UPLC-ESI-MS. Se inyectó, a 30 °C, el digerido de  $\beta$ -caseína al que se añadió BNPP y BAX y se realizó un scan de m/z 200 a 2000. A partir de la suma total de iones se extrajeron los espectros de masas que contienen las masas conocidas de los iones generados para cada péptido.

# **D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

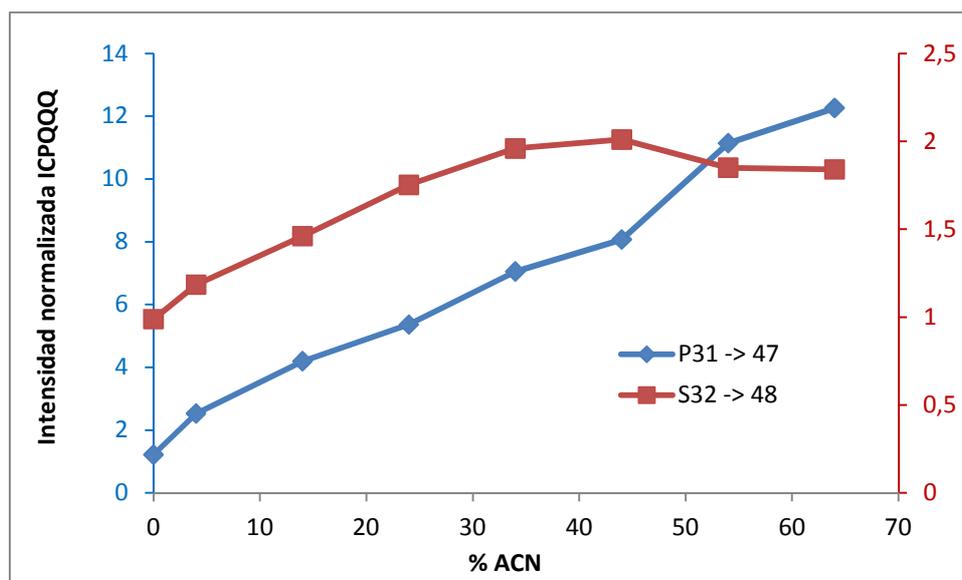
### D.1. CORRECCIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA SENSIBILIDAD

El cambio en la sensibilidad de P y S durante el gradiente de modificador orgánico empleado en fase reversa supone una importante limitación para el desarrollo de metodologías de cuantificación absoluta, tal como se explicó en el apartado A.3.3.2. Se ha demostrado que la adición de un flujo post-columna con una cantidad constante de acetonitrilo logra corregir la variación de la sensibilidad al menos durante la parte del gradiente en la que eluyen los péptidos.

Es necesario estudiar la mezcla de flujos óptimos del sistema capHPLC y del post-columna y el porcentaje de acetonitrilo adecuado de este último. Teniendo en cuenta que, en referencias previas,<sup>65,66</sup> un flujo post-columna de acetonitrilo al 40% fijando un flujo de  $5.5 \mu\text{L min}^{-1}$  en la bomba de jeringa combinado con un flujo proveniente del HPLC de  $3.5 \mu\text{L min}^{-1}$  lograba corregir la variación de la sensibilidad de P, se ensayaron diferentes combinaciones de ambos flujos, empleando un post-columna al 35 ó al 40% de acetonitrilo.

Debe tenerse en cuenta, además, el límite de solubilización de la disolución acetonitrilo/agua en el flujo portador de Ar, para seguir trabajando en condiciones de completa nebulización. En trabajos anteriores,<sup>66</sup> se estableció un flujo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  como el máximo global de la suma de las combinaciones de flujos del sistema de capHPLC y de la bomba de jeringa.

Se registró, en primer lugar, la variación de la intensidad normalizada para las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$  y  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$  frente al porcentaje de acetonitrilo alcanzado en el gradiente (de 0 a 80% en intervalos del 10%) sin emplear flujo post-columna (Figura 10). El gradiente empleado (Tabla 2), podría ser un típico gradiente empleado en RP-HPLC.



**Figura 10.** Cambio en la sensibilidad de P y S durante el gradiente sin empleo de flujo post-columna.

En la Figura 10 se observa que, con el gradiente empleado, se produce una gran variación de la sensibilidad. Esta variación es especialmente acusada para el P, cuya señal llega a aumentar más de 10 veces a lo largo del gradiente. Debe tenerse en cuenta que el gradiente realizado es relativamente rápido y es probable que el porcentaje de acetonitrilo representado no se haya estabilizado totalmente en el plasma antes de un nuevo cambio en el cromatograma. Estudios anteriores, realizados en condiciones de equilibrio, mostraban un aumento de la sensibilidad hasta obtener un máximo al 40% de acetonitrilo, valor a partir del cual comenzaba a disminuir la señal.<sup>66</sup> En cambio, el gradiente aquí aplicado muestra la tendencia en las señales de P y S que se observaría en un cromatograma rápido habitualmente empleado.

A continuación, la Figura 11 recoge la intensidad normalizada para las transiciones  $^{31}\text{P}^+ \rightarrow ^{47}\text{PO}^+$  y  $^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{48}\text{SO}^+$  frente al porcentaje de acetonitrilo alcanzado en el gradiente, corrigiendo el *delay time* -el cálculo de este parámetro se describe en el apartado D.2.1.- para cada combinación de flujos ensayados y porcentajes de acetonitrilo en el post-columna.

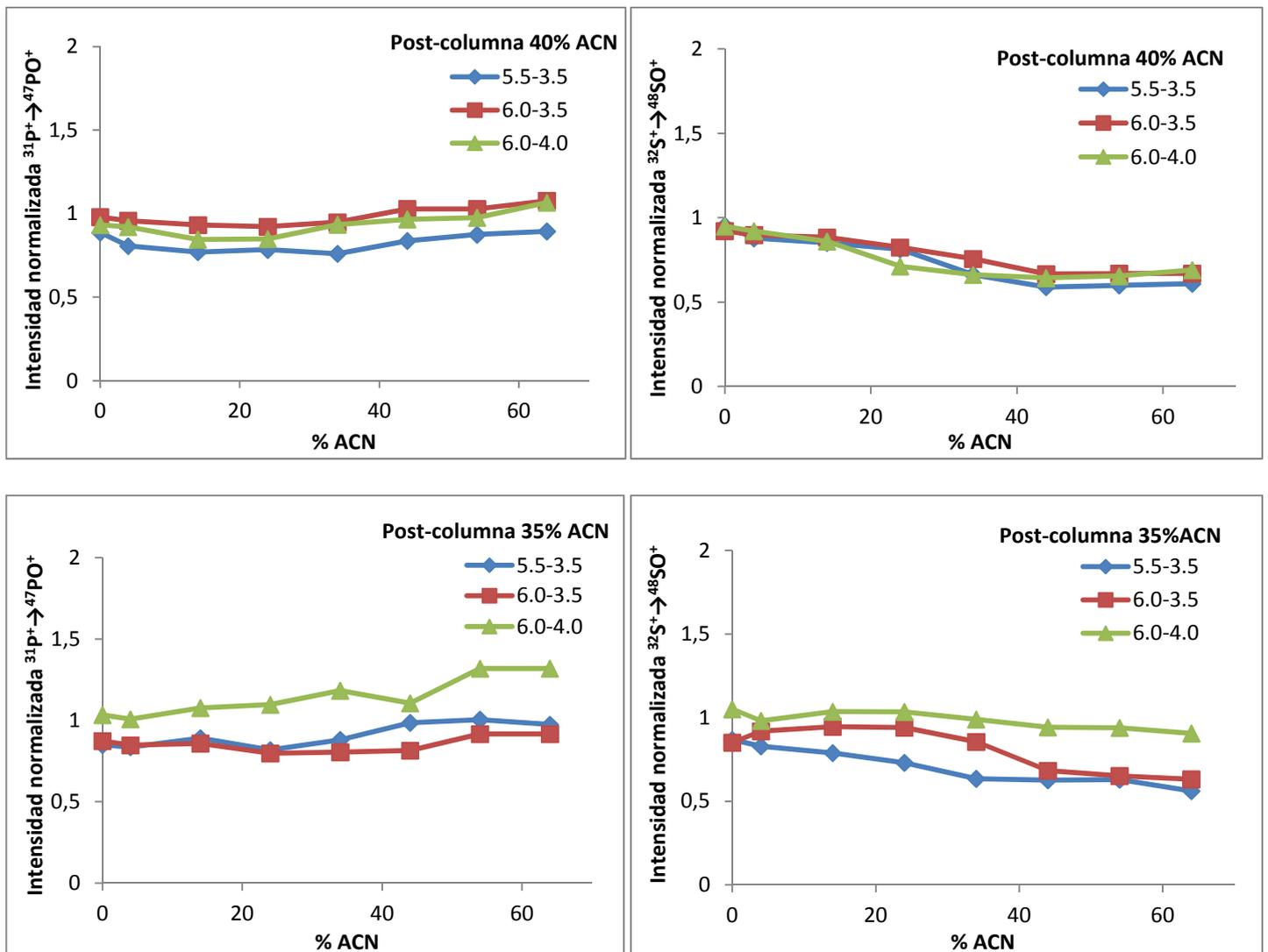


Figura 11. Cambio en la sensibilidad de P y S durante el gradiente con empleo de post-columna.

Los puntos representados en la Figura 11 han sido calculados a partir del cromatograma obtenido para cada caso. Se calculó el tiempo al que eluyen determinados porcentajes de acetonitrilo en intervalos del 10% y la media de las intensidades normalizadas para 20 puntos en torno a dicho tiempo.

Como se observa en la Figura 11, un flujo post-columna al 40% de acetonitrilo corrige mejor los cambios de sensibilidad que el flujo al 35% de acetonitrilo. Esto es lógico y concuerda con las referencias anteriores.<sup>65,66</sup>

Para escoger la combinación de flujos adecuada empleando un post-columna al 40% de acetonitrilo, debe considerarse especialmente aquella que proporcione una señal más estable para el P ya que este elemento, al ser monoisotópico, no podría corregirse empleando dilución isotópica. En cambio, si con el flujo seleccionado el S aún presentara una variación significativa en la sensibilidad a lo largo del gradiente, ésta podría corregirse añadiendo al flujo post-columna <sup>34</sup>S.

Para el P, la sensibilidad permanece más estable empleando  $6.0 \mu\text{L min}^{-1}$  en la bomba de jeringa con un flujo proveniente del HPLC de  $3.5 \mu\text{L min}^{-1}$ . De hecho, la desviación estándar relativa (RSD) calculada para los puntos de P en el intervalo de acetonitrilo considerado es únicamente un 5%.

Por tanto, en los siguientes experimentos se empleó un flujo post-columna al 40% de acetonitrilo a  $6.0 \mu\text{L min}^{-1}$  en combinación con un flujo de capHPLC de  $3.5 \mu\text{L min}^{-1}$ .

### **D.2. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN GLOBAL DE $\beta$ -CASEÍNA**

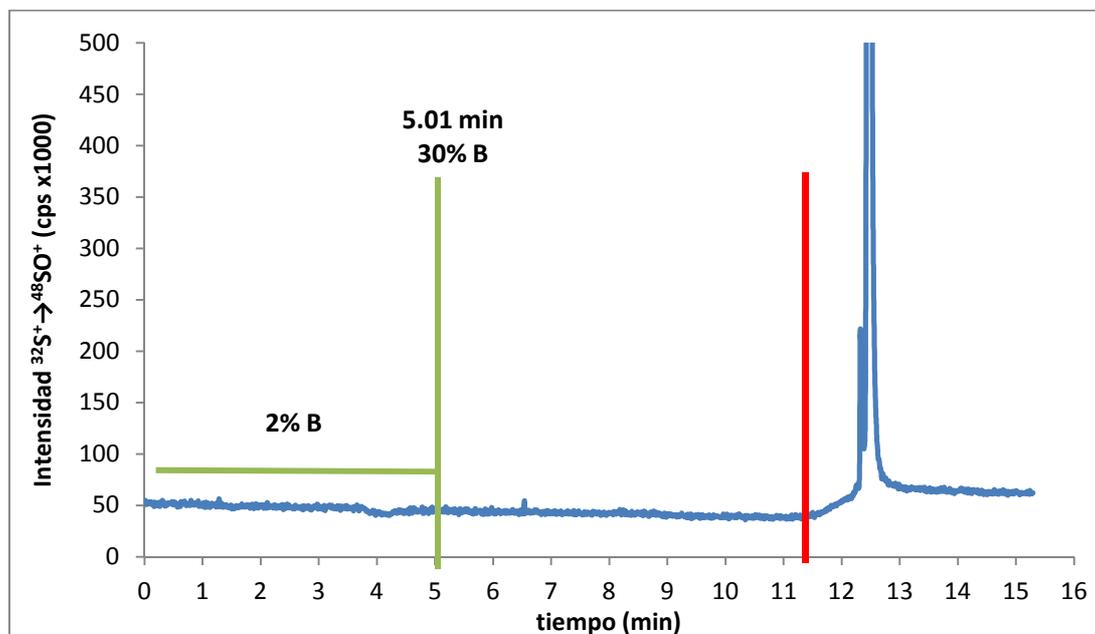
Para determinar el grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína intacta se realizó un calibrado de la relación de áreas P/S frente a su relación molar. Este calibrado permitió calcular, una vez conocida la relación de áreas P/S de la  $\beta$ -caseína en iguales condiciones, la relación molar P/S en la misma. A partir de este valor, teniendo en cuenta el número de átomos de S que contiene la  $\beta$ -caseína, se determinó el grado de fosforilación global.

Debido a la ya discutida dependencia de la sensibilidad de P y S con el porcentaje de acetonitrilo, dicho calibrado debe realizarse necesariamente empleando como disolvente una disolución acuosa preparada con el mismo porcentaje de acetonitrilo al que eluye la  $\beta$ -caseína. Éste debe ser determinado experimentalmente, lo que requiere, a su vez, conocer el tiempo que transcurre desde que se fija un determinado porcentaje de acetonitrilo en el gradiente del HPLC hasta que dicho porcentaje llega realmente a la columna (*delay time*) y al ICPQQQ.

### D.2.1. Cálculo del *delay time* y porcentaje de acetonitrilo de elución de la $\beta$ -caseína

Para calcular el *delay time* se inyectó NAc-Met empleando capHPLC, ya que sabe que este compuesto eluye al 30% de acetonitrilo. Un cambio en el gradiente del 2 al 30% de acetonitrilo en un corto intervalo de tiempo (0.01 min) permite calcular el *delay time*. Este parámetro se determina gracias a la diferencia entre el tiempo de retención del NAc-Met (al que la columna está realmente al 30% de acetonitrilo) respecto al tiempo al que se fijó el cambio al 30% de acetonitrilo en el gradiente de capHPLC.

La Figura 12 muestra el cromatograma obtenido para el NAc-Met. Como se observa en la figura, el cambio del 2 al 30% de acetonitrilo se produce a los 11.3 min, momento en el cual se observa un cambio de pendiente en la señal de S. Puesto que se fija el 30% de acetonitrilo a los 5.01 min, el *delay time* en las condiciones empleadas es 6.29 min.



**Figura 12.** Cromatograma de NAc-Met para cálculo del *delay time*.

Se inyectó posteriormente la  $\beta$ -caseína. Ésta presentó un tiempo de retención de 17 min de modo que, tras restar el *delay time*, se obtiene un tiempo de 10.7 min. Teniendo en cuenta el gradiente aplicado, se concluyó que la  $\beta$ -caseína eluye al 40% de acetonitrilo.

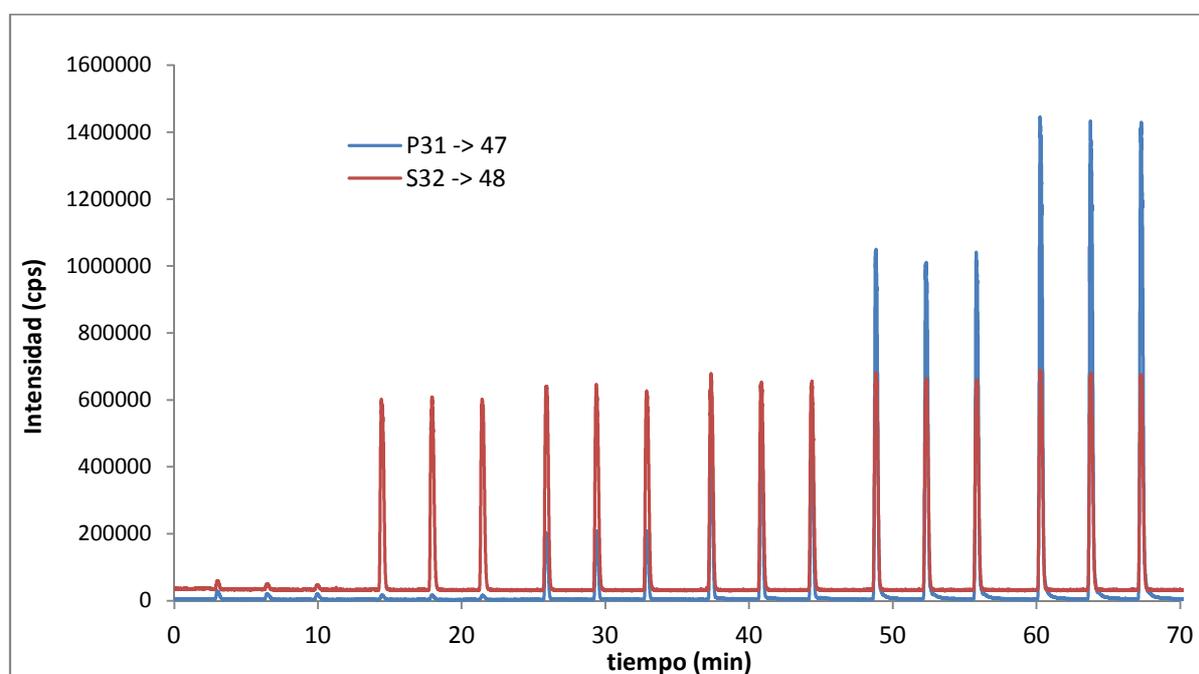
### D.2.2. Calibrado de la relación molar P/S

Una vez sabido que la  $\beta$ -caseína eluye al 40% de acetonitrilo, se realizó un calibrado de la relación molar P/S mediante capFIA a dicho porcentaje, empleando además un flujo post-columna y patrones preparados también al 40% de acetonitrilo.

Al contrario de lo que ocurre para un nebulizador convencional, puesto que el nebulizador empleado es un nebulizador de consumo total y, por tanto, su eficiencia de nebulización es del 100% independientemente del compuesto, podría emplearse cualquier patrón de P y S sin necesidad de que estos tengan eficiencias de nebulización similares.

Inicialmente, se emplearon patrones de ICP certificados de P y S para realizar el calibrado. Sin embargo, si bien los picos de P obtenidos eran gaussianos, los picos de S presentaban colas, impidiendo que la señal de S llegara a la línea de base antes de realizar una nueva inyección. Esto podría deberse a una incompatibilidad entre el empleo de un disolvente orgánico (acetonitrilo) con el patrón inorgánico de S.

Por este motivo, se realizó el capFIA en las mismas condiciones empleando como patrón de P un patrón certificado de ICP y como patrón de azufre metionina, previamente certificado mediante un calibrado externo en agua. El capFIA obtenido se muestra en la Figura 13.



**Figura 13.** capFIA empleando patrón de P de ICP y Met como patrón de S.

Como se observa en la figura, empleando como patrón de S Metionina, los picos obtenidos son gaussianos. Se integraron las áreas de P y S para cada punto y, teniendo en cuenta las concentraciones exactas de P y S de cada patrón ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ), se calcularon los  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de P y S. Finalmente, se realizó un calibrado representando la relación  $\mu\text{mol P}/\mu\text{mol S}$  frente a la relación área neta P/área neta S (corregidas con el blanco). El calibrado obtenido se muestra en la Figura 14.

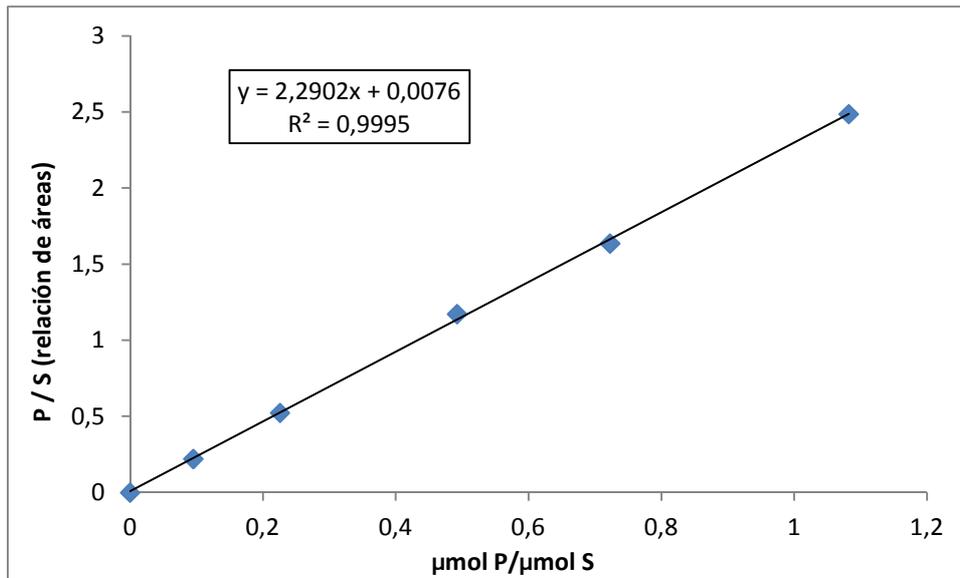


Figura 14. Calibrado de la relación molar P/S frente a la relación de áreas.

### D.2.3. Determinación cuantitativa del grado de fosforilación global de la $\beta$ -caseína

Una vez realizado el calibrado, se inyectó la  $\beta$ -caseína. El cromatograma obtenido a temperatura ambiente se muestra en la Figura 15.

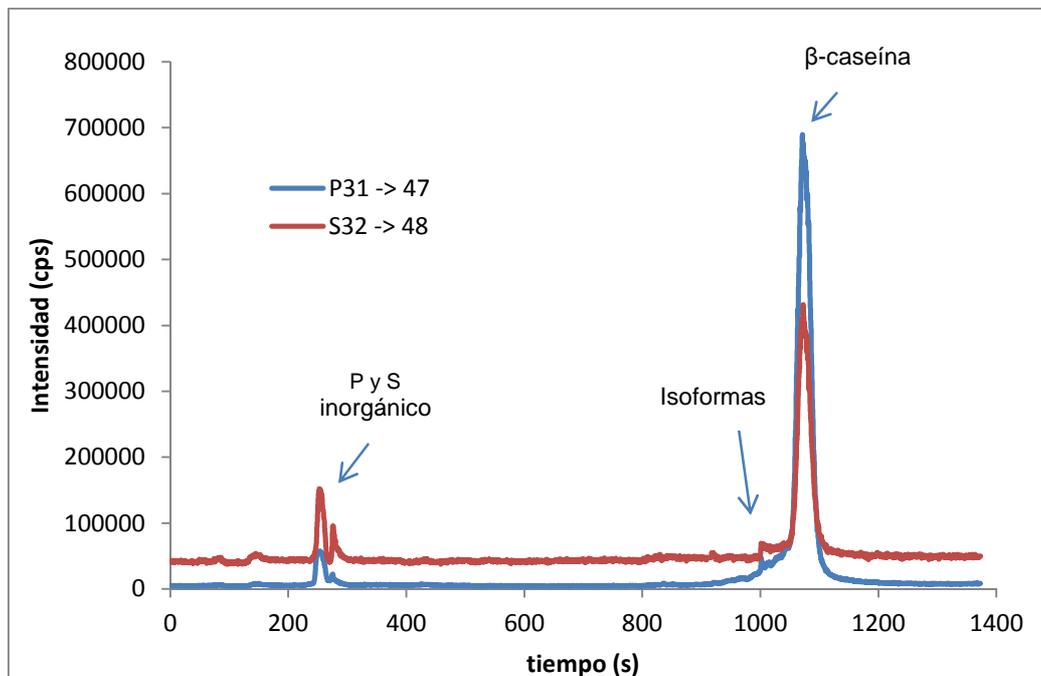


Figura 15. Cromatograma de  $\beta$ -caseína a temperatura ambiente.

En el cromatograma se distingue un pequeño pico antes del de la  $\beta$ -caseína, que podría deberse a distintas isoformas de la  $\beta$ -caseína, correspondientes a la  $\alpha$ s1 y  $\alpha$ s2,<sup>66</sup> presentes como impurezas en el reactivo comercial.

Es conocido que un aumento de la temperatura puede lograr mejorar las condiciones de análisis ya que algunos parámetros relevantes en HPLC (viscosidad, polaridad de la fase móvil o difusión) dependen fuertemente de la temperatura, tal como predice la ecuación de Van Deemter.<sup>69</sup>

Por este motivo, se inyectó de nuevo la  $\beta$ -caseína calentando la columna a 60 °C y 80 °C. Empleando una temperatura de 60 °C se observaba una mayor resolución en la señal de P correspondiente a las posibles isoformas. Sin embargo, la señal de fondo de S impedía observar el pico de S correspondiente a las isoformas. A 80 °C la separación de las isoformas empeoraba.

Para cada cromatograma obtenido se determinó la relación de áreas del pico íntegro y, de ser posible, la relación de áreas para el pico correspondiente únicamente a la  $\beta$ -caseína y a las posibles isoformas. A partir de la recta de calibrado representado en la Figura 14, se obtuvo la relación molar ( $\mu\text{mol P}/\mu\text{mol S}$ ) para la  $\beta$ -caseína. Teniendo en cuenta que la proteína tiene 6 átomos de S -la secuencia se recoge en el Apéndice 1- se pueden calcular los átomos de P por molécula de  $\beta$ -caseína, esto es, el grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Cuantificación absoluta del grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína.

<b>Fosforilación total</b> (átomos P/ molécula)	<b>Fosforilación <math>\beta</math>-caseína</b> (átomos P/ molécula)	<b>Fosforilación isoformas</b> (átomos P/ molécula)
<b>4.76 ± 0.04 (n=6)</b>	<b>4.61 ± 0.05 (n=4)</b>	<b>6.99 ± 0.09 (n=4)</b>

El proveedor indica que la  $\beta$ -caseína suministrada contiene entre 4 y 5 átomos de P por molécula de proteína. Empleando la metodología descrita en el apartado A.3.3.3., teniendo en cuenta la suma del grado de fosforilación específico de los fosfopéptidos del digerido de  $\beta$ -caseína, se obtuvo un grado de fosforilación global de  $4.57 \pm 0.05$  átomos de P por molécula de proteína.<sup>66</sup> Por otra parte, empleando la metodología descrita en el apartado A.3.3.4., mediante SEC, se obtuvo un grado de fosforilación global de  $4.97 \pm 0.05$  átomos de P por molécula de proteína.

Debe reseñarse que empleando SEC la resolución es menor que con RP, ya que en SEC la separación de los compuestos se realiza según su tamaño molecular. Por este motivo, la  $\beta$ -caseína y sus isoformas coeluyen, lo que impide realizar una cuantificación separada de la  $\beta$ -caseína teniendo en cuenta el pico total, el pico de  $\beta$ -caseína y el pico de las isoformas. Por tanto, el dato para SEC incluye en el cómputo total las isoformas de la  $\beta$ -caseína presentes como impurezas, lo que explica el valor más alto obtenido.

Los resultados aquí obtenidos mediante RP-capHPLC-ICPQQQ muestran una ligera separación de la  $\beta$ -caseína y las posibles isoformas de la misma. Se obtiene un grado de fosforilación mayor para estas últimas ( $6.99 \pm 0.09$  átomos de P por molécula de proteína) respecto al obtenido para la  $\beta$ -caseína únicamente ( $4.61 \pm 0.05$  átomos de P por molécula de proteína). Este resultado es coherente con la presencia de las isoformas  $\alpha s1$  y  $\alpha s2$ , de las que se estima que tienen hasta 13 átomos de P por molécula de proteína (según la base de datos SwissProt).

Por otra parte, el límite de detección absoluto empleando RP mejora ligeramente el obtenido mediante SEC (0.7 pmol frente a 1.3 pmol, respectivamente).

En resumen, se ha podido determinar el grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína, teniendo en cuenta además las isoformas presentes como impurezas. El grado de fosforilación obtenido concuerda con resultados experimentales previos y con los datos del proveedor.

### **D.3. CUANTIFICACIÓN DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN ESPECÍFICO DE UN DIGERIDO TRÍPTICO DE $\beta$ -CASEÍNA**

El empleo de patrones genéricos de P y S adecuados posibilitaría la cuantificación absoluta del grado de fosforilación específico de los fosfopéptidos del digerido trípico de la proteína mediante capHPLC-ICPQQQ.

Según su secuencia, se espera que la  $\beta$ -caseína contenga dos péptidos trípticos fosforilados (uno monofosforilado y otro tetrafosforilado) y cinco péptidos de S. La secuencia completa de la  $\beta$ -caseína y sus péptidos trípticos se muestran en el Apéndice 1. Debe tenerse en cuenta que los péptidos esperados no siempre se corresponden con los encontrados experimentalmente. En ocasiones, la tripsina no corta la proteína en todos los residuos de arginina (R) y lisina (K) de la secuencia. Uno de los errores más comunes, denominado *miscleavage*, consiste precisamente en no cortar uno de dichos residuos, incorporándolo al siguiente péptido trípico.

#### **D.3.1. Elección de patrones internos genéricos**

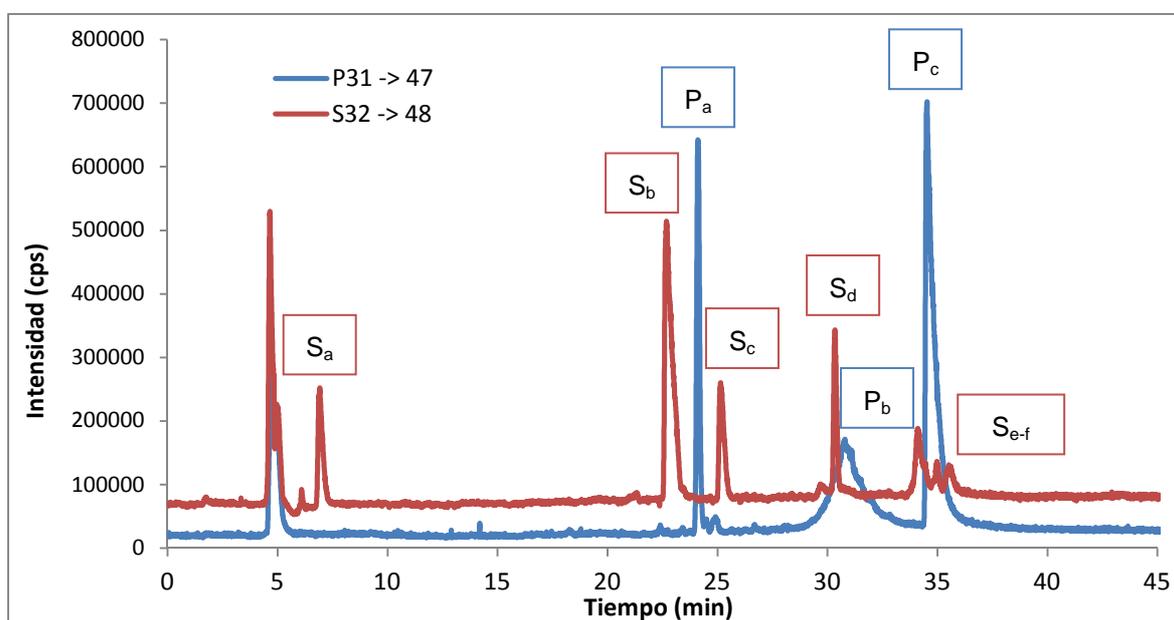
Un requisito fundamental para el empleo de patrones genéricos de P y S para la cuantificación de los fosfopéptidos del digerido es que éstos no coeluyan con ninguna otra especie de P o S. Además, cuanto más cerca eluyan los patrones de los péptidos más exacta será la cuantificación ya que la respuesta del ICPMS será muy parecida (ver Figura 11). Por tanto, se requiere emplear como patrones compuestos de P y S con un componente orgánico para que estos se retengan parcialmente en la columna de fase reversa.

Se estudiaron como posibles patrones de S el péptido VPMLK (BAX) y las metioninas modificadas NAc-Met y BOC-Met. Como patrón de P se dispone del BNPP, ya empleado anteriormente para la cuantificación de fosfopéptidos en la metodología descrita en el apartado

A.3.3.3. Una mezcla de los cuatro patrones se inyectó en iguales condiciones que el digerido trípico de la  $\beta$ -caseína. Mientras que el NAc-Met eluía demasiado cercano al tiempo muerto y el BOC-Met se retenía en exceso, el BAX presentaba un tiempo de retención intermedio entre el primer y el segundo péptido trípico de S. Por tanto, se escogió el BAX como patrón de S y el BNPP como patrón de P.

### D.3.2. Determinación cuantitativa del grado de fosforilación específico del digerido trípico de $\beta$ -caseína

La Figura 16 muestra el cromatograma de capHPLC-ICPQQQ del digerido y los patrones BAX y BNPP.



**Figura 16.** Cromatograma del digerido trípico de  $\beta$ -caseína con BAX y BNPP.

El cromatograma obtenido concuerda con los péptidos tríplicos de P y S esperados. Por una parte se observan tres péptidos de S (nombrados  $S_a$ ,  $S_c$  y  $S_d$  en la Figura 16) y una serie de picos de S no resueltos entorno a 35 min ( $S_{e-f}$ ). Se esperaría que los tres péptidos totalmente resueltos se correspondieran con los de secuencia más corta, que presentan un solo átomo de S (EAMAPK, EMPFPK y DMPIQAFLLYQEPVLGPV) y los picos no resueltos a los dos péptidos de S restantes que, por su gran longitud, pueden digerirse de forma distinta a lo esperado. Se confirma además que el BAX eluye entre los dos primeros péptidos de S ( $S_b$ ), asegurando que la sensibilidad del ICP se mantiene en las condiciones experimentales.

Por otra parte, se observa un péptido fosforilado a unos 25 min y otro entorno a 30 min (péptidos  $P_a$  y  $P_b$  respectivamente). Es lógico que el fosfopéptido  $P_a$  se corresponda con el monofosforilado y el  $P_b$  con el tetrafosforilado. Este último presenta una forma menos gaussiana puesto que, por una parte, el proveedor establece que la  $\beta$ -caseína presenta entre 4 y 5 átomos de P

por molécula de proteína y por consiguiente el pico pudiera corresponder a una mezcla entre el péptido tetrafosforilado y trifosforilado. Además es conocido que existe un *miscleavage* para este péptido (incorporando K) por lo que podrían coexistir también el péptido con y sin *miscleavage*.<sup>65</sup> En definitiva, el pico observado a 30 min sería en realidad una mezcla de fosfopéptidos. En todo caso, la identificación de los péptidos se confirmó posteriormente mediante MS molecular y será discutida en el apartado D.4. Igualmente, se observa el BNPP (pico  $P_c$ ) no coeluye con ninguno de los fosfopéptidos.

Para la cuantificación del grado de fosforilación específico podría emplearse cualquiera de los tres péptidos de S ( $S_a$ ,  $S_c$  ó  $S_d$ ) siendo más adecuados los péptidos  $S_c$  y  $S_d$  por su cercanía al BAX. El factor de sensibilidad del BAX, es decir, su área de pico por  $\mu\text{g g}^{-1}$  de S, se usa para cuantificar los  $\mu\text{g g}^{-1}$  de S de los péptidos de S. Por otra parte, el factor de sensibilidad del BNPP se usa para cuantificar los  $\mu\text{g g}^{-1}$  de P de los dos fosfopéptidos. La concentración en  $\mu\text{g g}^{-1}$  puede ser expresada a su vez como  $\text{mol g}^{-1}$  de P ó S, pudiendo así relacionar mol P/mol S para los fosfopéptidos. La cuantificación absoluta de los péptidos  $S_a$ ,  $S_c$ ,  $S_d$ ,  $P_a$  y  $P_b$  se recoge en la Tabla 8. El grado de fosforilación para los fosfopéptidos, teniendo en cuenta la media de las relaciones empleando los tres péptidos de S, se recoge en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Cuantificación absoluta de los péptidos de interés del digerido tróptico de  $\beta$ -caseína.

Péptido	Cuantificación absoluta $\mu\text{mol (S ó P) g}^{-1}$
$S_a$	0,0112
$S_c$	0,0113
$S_d$	0,0105
$P_a$	0,0099
$P_b$	0,0299

**Tabla 9.** Cuantificación absoluta del grado de fosforilación específico del digerido tróptico de  $\beta$ -caseína.

Fosforilación péptido $P_a$ <i>monofosforilado</i> (mol P/ mol S)	Fosforilación péptido $P_b$ <i>tetrafosforilado</i> (mol P/ mol S)	Relación <i>péptido <math>P_b</math>/péptido <math>P_a</math></i> (mol P/ mol P)
<b>0.90 ± 0.04</b>	<b>2.7 ± 0.1</b>	<b>3.03</b>

Según la secuencia de la  $\beta$ -caseína, la relación entre el péptido  $P_a$  (monofosforilado) y los péptidos de S debería ser 1:1 si estuviera completamente fosforilado, puesto que contienen cada uno,

respectivamente, un átomo de P y un átomo de S. Se obtiene un resultado coherente pero ligeramente inferior a lo esperado.

Además, teniendo en cuenta tanto la secuencia de la  $\beta$ -caseína como el grado de fosforilación global obtenido en el apartado anterior ( $4.61 \pm 0.05$  átomos de P por molécula de proteína), se esperaría una relación entre el péptido tetrafosforilado y los péptidos de S de 3.61 mol P/mol S. El resultado obtenido es significativamente inferior.

Es necesario tener en cuenta que en la bibliografía se ha señalado que algunos fosfopéptidos de las digestiones tríplicas de las muestras de caseína quedan permanentemente retenidos en la columna de fase reversa.<sup>70</sup> Cabe resaltar que en la metodología desarrollada en el apartado D.2. para la cuantificación global de la  $\beta$ -caseína no era necesario considerar la recuperación de la proteína de la columna de fase reversa al relacionar los moles de P y S del mismo pico. Si la  $\beta$ -caseína no eluye completamente de la columna, que de hecho no lo hace, esto no afecta a la relación de áreas P/S medida en su pico cromatográfico. Sin embargo, la recuperación de la columna sí debe ser evaluada para la cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido, ya que ésta puede variar para los diferentes péptidos y fosfopéptidos analizados. De hecho, el grado de fosforilación se obtiene en este caso de la relación entre las cantidades absolutas obtenidas para los diferentes péptidos y fosfopéptidos.

La recuperación de P de la columna de fase reversa calculada anteriormente para la  $\beta$ -caseína era del  $91 \pm 5\%$ .<sup>65</sup> Este dato podría explicar el valor del grado de fosforilación ligeramente inferior obtenido para el mono pero no para el tetrafosforilado. Los resultados obtenidos parecen indicar que la recuperación para este tetrafosfopéptido es aún menor que la estimada y debe corregirse. De hecho, la forma de pico obtenido es mucho menos gaussiana que la obtenida anteriormente,<sup>65</sup> lo que indica que se está quedando más pegado a la columna.

En definitiva, si bien los resultados obtenidos resultan prometedores, la cromatografía del digerido debe ser optimizada en trabajos futuros para obtener una cuantificación del grado de fosforilación específico más exacta.

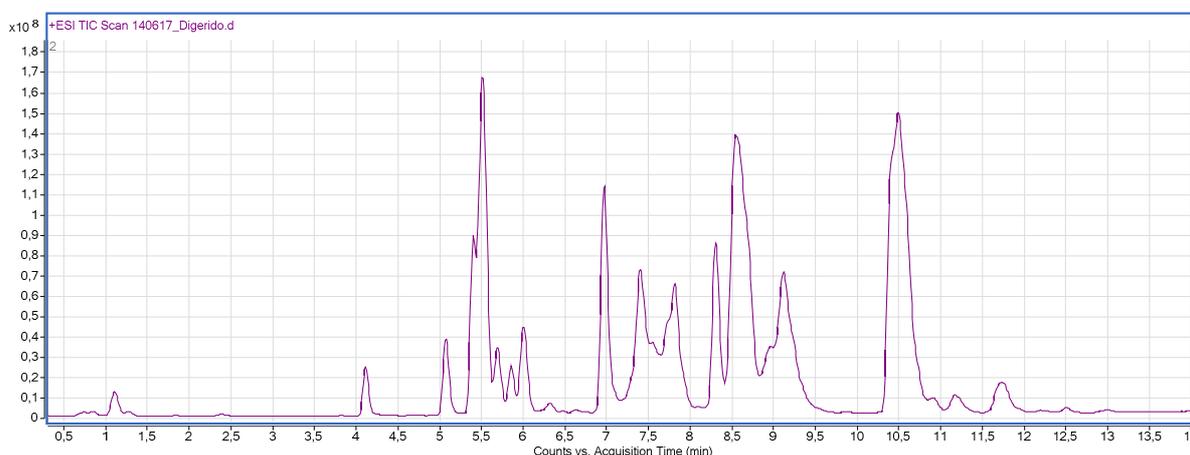
### **D.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS Y FOSFOPÉPTIDOS MEDIANTE MS MOLECULAR**

La identificación de los péptidos y fosfopéptidos del digerido tríplico de  $\beta$ -caseína se realizó mediante RP-UPLC-ESIMS. Las columnas de fase reversa empleadas en capHPLC y en UPLC tienen diferentes longitudes y tamaños de partícula. Sin embargo, ambas están constituidas por la misma fase estacionaria y, por tanto, el orden de elución entre los péptidos de S y los fosfopéptidos se debería mantener.

Teniendo en cuenta la secuencia de la  $\beta$ -caseína y sabiendo que la tripsina rompe la proteína en R y K es posible predecir los péptidos tripticos que se forman. Conocida la secuencia de aminoácidos esperada para cada péptido triptico, se puede calcular su masa molecular y, por consiguiente, la relación  $m/z$  de los iones  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+3H]^{3+}$  (siendo M la masa molecular del péptido) que podrían detectarse tras la ionización mediante ESI.

La secuencia de la  $\beta$ -caseína, los péptidos tripticos y las relaciones  $m/z$  de los iones esperados en ESIMS para cada uno de los péptidos de S o fosforilados se recogen en el Apéndice 2. Se ha incluido en el cálculo el péptido tetrafosforilado y el trifosforilado, ambos con y sin *miscleavage*.

La Figura 17 muestra la suma total de iones (*total ion count*, TIC) del cromatograma ESIMS obtenido. Obviamente, este cromatograma es mucho más complejo que el perfil obtenido en ICPQQQ. Este hecho resalta la capacidad del acoplamiento capHPLC-ICPQQQ para un rápido "screening" específico de los posibles fosfopéptidos presentes en la muestra.



**Figura 17.** TIC del digerido triptico mediante ESIMS.

Se describe a continuación, a modo de ejemplo, la identificación del péptido monofosforilado de secuencia FQpSEEQQTEDELQDK y masa molecular 2061.98 g mol<sup>-1</sup>.

Para el péptido monofosforilado, se espera las  $m/z$  2062.98, correspondiente al  $[M+H]^+$ , 1031.99, correspondiente al  $[M+2H]^{2+}$  y 688.33, correspondiente al  $[M+3H]^{3+}$ . A continuación, a partir del TIC obtenido, se puede extraer el espectro de masas para un tiempo dado (EIC) en el que localizan dichas masas. Para el péptido monofosforilado, las masas del  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+3H]^{3+}$  se encuentran a un tiempo de retención de 5.682 min. El espectro de masas obtenido a este tiempo se muestra en la Figura 18.

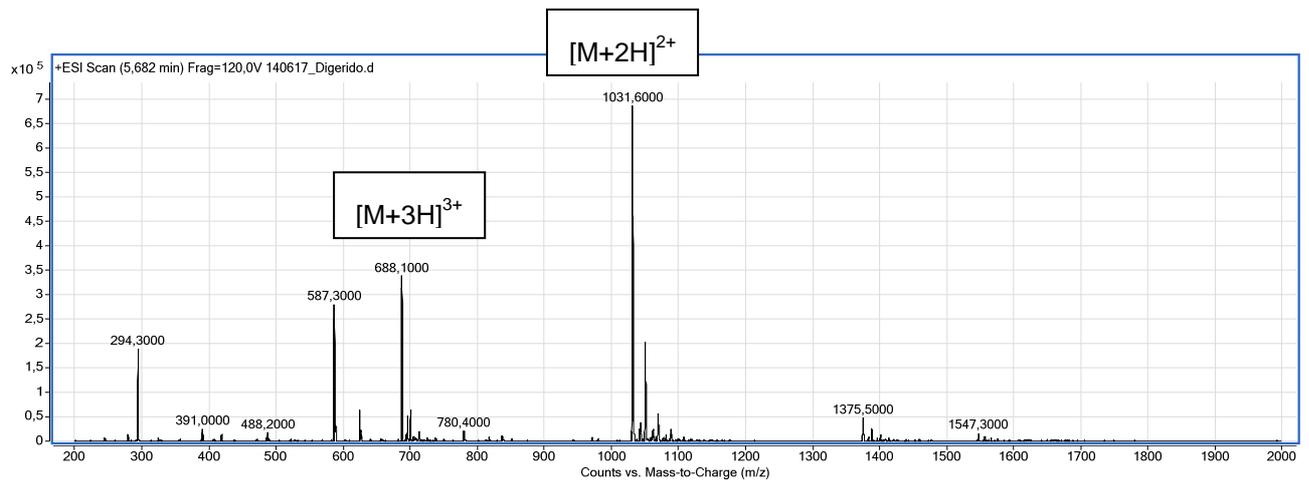


Figura 18. Espectro de masas del péptido monofosforilado.

Por tanto, el péptido monofosforilado, que en efecto presenta la secuencia predicha, ya que las  $m/z$  calculadas coinciden con las encontradas experimentalmente, eluye a un tiempo de retención de 5.682 min.

La misma identificación se realizó según lo comentado para todos los péptidos de S y P, pudiendo discernir la secuencia y tiempo de retención de cada uno de ellos. Las relaciones  $m/z$  de los iones encontrados para cada uno de los péptidos de S ó de P se recogen en el Apéndice 2.

En la Figura 19 se muestran superpuestos los cromatogramas extraídos del TIC para cada uno de los péptidos de interés. En las tablas 10 y 11 se especifica la identidad de cada uno. En ambos casos, se ha mantenido la nomenclatura de los péptidos de la Figura 16 (cromatograma del digerido mediante cap-RP-HPLC-ICPQQQ).

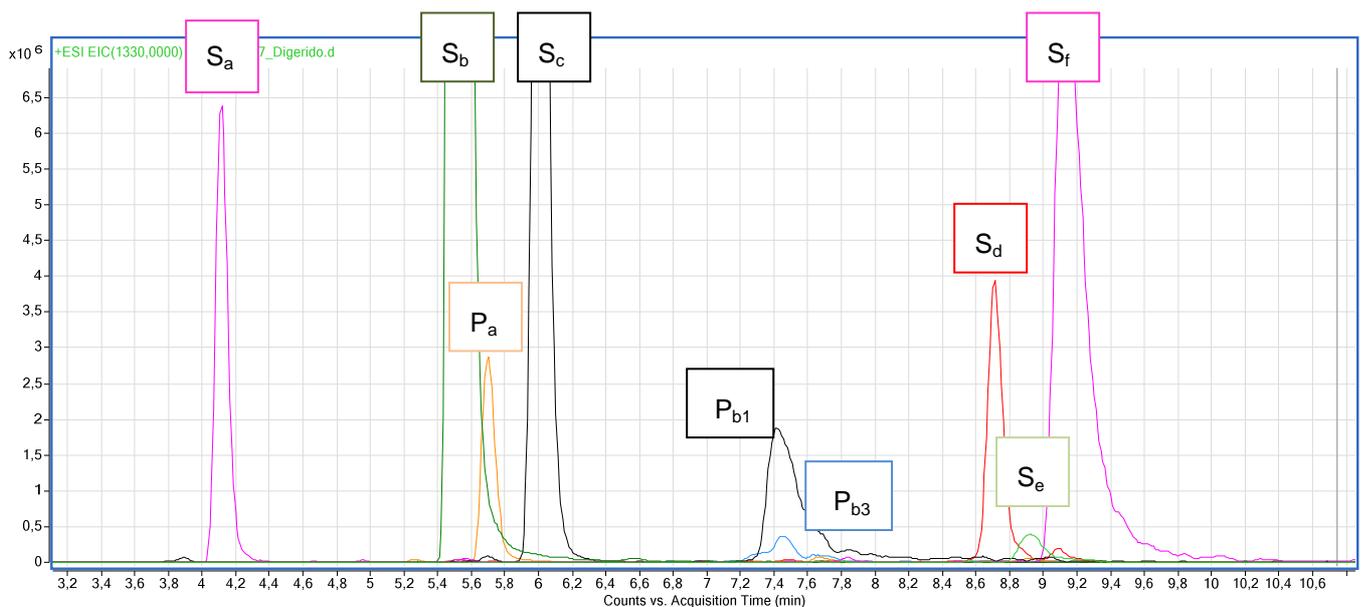


Figura 19. Cromatogramas extraídos del TIC para los péptidos trípticos de interés.

Como se comentó anteriormente, el orden de elución entre los péptidos de S y entre los fosfopéptidos es el mismo empleando RP-UPLC-ESIQ y cap-RP-HPLC-ICPQQQ. Esto nos permite asignar inequívocamente la secuencia a los péptidos de S y P que eluyen en el cromatograma del digerido tríptico.

La Tabla 10 recoge la secuencia de los péptidos que contienen S y su tiempo de retención en UPLC-ESIQ y capHPLC-ICPQQQ.

**Tabla 10.** Secuencia y tiempo de retención en UPLC-ESIQ y capHPLC-ICPQQQ para los péptidos de S.

Pico	Secuencia	Tº de retención en UPLC-ESIQ (min)	Tº de retención en capHPLC-ICPQQQ (min)
S <sub>a</sub>	EAMAPK	4.118	16.797
S <sub>b</sub>	VPLMK (BAX)	5.502	20.483
S <sub>c</sub>	EMPFPK	5.983	22.435
S <sub>d</sub>	DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	8.701	28.079
S <sub>e</sub>	IHPFAQTQSLVYPPGPIPNLPLQNIPP LTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	8.922	34-37
S <sub>f</sub>	YPVEPFTESSQLTLTDVENLHPLPLLQS WMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	9.123	

Se confirma así que los péptidos S<sub>a</sub>, S<sub>c</sub> y S<sub>d</sub> son péptidos con un átomo de S y que el BAX (S<sub>b</sub>) eluye entre los dos primeros.

De igual modo, la Tabla 11 recoge la secuencia de los fosfopéptidos y su tiempo de retención en UPLC-ESIQ y capHPLC-ICPQQQ. Se confirma que los fosfopéptidos P<sub>a</sub> y P<sub>b</sub> se corresponden con los péptidos monofosforilado y tri/tetrafosforilado, respectivamente.

Además, se ha comprobado mediante MS molecular que coexisten en el digerido las formas tetra y trifosforiladas para el péptido de secuencia RELEELNVPGEIVESLSSSEESITR (P<sub>b2</sub> y P<sub>b3</sub>), incluyendo un *miscleavage* (con R). No se ha podido confirmar mediante ESIMS la presencia de los péptidos sin el *miscleavage*. Esto podría deberse a que su abundancia es muy baja y quizá no se ionizan en ESI en estas condiciones.

**Tabla 11.** Secuencia y tiempo de retención en UPLC-ESI<sup>Q</sup> y capHPLC-ICPQQQ para los fosfopéptidos.

Pico	Secuencia	T° de retención en UPLC-ESI <sup>Q</sup> (min)	T° de retención en capHPLC-ICPQQQ (min)
P <sub>a</sub>	FQ <sub>p</sub> SEEQQQTEDELQDK	5.682	20.825
P <sub>b1</sub>	RELEELNVPGEIVE <sub>p</sub> SL <sub>p</sub> SpSpSEESITR	7.438	29.997
P <sub>b2</sub>	ELEELNVPGEIVE <sub>p</sub> SL <sub>p</sub> SpSpSEESITR	no se detecta	
P <sub>b3</sub>	RELEELNVPGEIVESL <sub>p</sub> SpSpSEESITR	7.458	
P <sub>b4</sub>	ELEELNVPGEIVESL <sub>p</sub> SpSpSEESITR	no se detecta	

## **E. CONCLUSIONES**

Del trabajo aquí expuesto se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado que la adición de un flujo post-columna al 40% de acetonitrilo logra compensar mayoritariamente los cambios de sensibilidad de P y S en el gradiente de fase reversa. Esto posibilita el desarrollo de metodologías de cuantificación absoluta por acoplamiento de capHPLC a ICPQQQ usando patrones genéricos.
2. Se ha desarrollado una metodología para la cuantificación absoluta del grado de fosforilación global en proteína intacta mediante capHPLC-ICPQQQ empleando patrones genéricos de P y S. El grado de fosforilación global de la  $\beta$ -caseína obtenido concuerda con los datos del proveedor y con resultados experimentales anteriormente obtenidos en el Grupo de Investigación.
3. El desarrollo de una metodología para la cuantificación absoluta del grado de fosforilación específico se ha visto truncado por la baja recuperación de los péptidos de la columna de fase reversa. Sin embargo, los resultados obtenidos se aproximan a lo previsto, por lo que se espera que una optimización de la cromatografía para lograr una recuperación cuantitativa (probablemente empleando temperaturas mayores durante la separación cromatográfica) pueda proporcionar resultados satisfactorios.
4. Se han identificado mediante ESIMS los péptidos trípticos que contienen S y los péptidos fosforilados de un digerido tríptico de  $\beta$ -caseína. Se ha confirmado además que los diferentes péptidos empleados para la cuantificación del grado de fosforilación específico del digerido tríptico y los patrones genéricos empleados no coeluyen, requisito fundamental para la cuantificación empleando ICPMS.

# BIBLIOGRAFÍA

1. J.C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, et al, *The sequence of the human genome*, Science, 291 (2001), 1304-1351.
2. A. Pandey, M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*, Nature, 405 (2000), 837-846.
3. S. D. Patterson, R. H. Aebersold, *Proteomics, the first decade and beyond*, Nat. Genet., 33 (2003), 311-323.
4. M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, et al, *From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis*, Nat. Biotechnol., 14 (1996), 61-65.
5. M. Mann, O. N. Jensen, *Proteomic analysis of post-translational modifications*, Nat. Biotechnol., 21 (2003), 255-261.
6. O. N. Jensen, *Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry*, Curr. Opin. Chem. Biol., 8 (2004), 33-41.
7. T. Hunter, *Signalling-2000 and beyond*, Cell, 100 (2000), 113-127.
8. B. Macek, M. Mann, J. V. Olsen, *Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: Principles and applications*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 49 (2009), 199–221.
9. M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, *Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome*, Trends Biotechnol., 20 (2002), 261-268.
10. J. Rush, A. Moritzm, K. A. Lee, A. Guo, et al, *Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells*, Nat. Biotechnol., 23 (2005), 94-101.
11. L. Ma, Z. B. Chen, H. Erdjument-Bromage, et al, *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*, Cell, 121 (2005), 179-193.
12. J. Hao, F. Li, W. Liu, W. Liu, et al, *Phosphorylation of PRAS40-Thr246 Involved in Renal Lipid Accumulation of Diabetes*, J. Cell. Physiol., 229 (2014), 1069-1077.
13. Y. Chom S. Challa, D. Moquin, et al, *Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation*, Cell, 137 (2009), 1112-1123.
14. X. Ai, J. W. Curran, T. R. Shannon, et al, *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure*, Circ. Res., 97 (2005), 1314-1322.
15. M. J. Hendzel, Y. Wei, M. A. Mancini, *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*, Chromosoma, 106 (1997), 348-360.
16. J. C. Trinidad, C. G. Trinidad, C. G. Specht, et al, Trinidad, *Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations*, Mol. Cell. Proteomics, 5 (2006), 914-922.
17. Z. L. Zhou, E. J. Hong, S. Cohen, *Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation*, Neuron, 52 (2006), 255-269.

18. A. Nita-Lazar, H. Saito-Benz, F.M. White, *Quantitative phosphoproteomics by mass spectrometry: Past, present, and future*, *Proteomics*, 8 (2008), 4433-4443.
19. S-E. Ong, M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*, *Nat. Chem. Biol.*, 1 (2005), 252-262.
20. T. Rabilloud, *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains*, *Proteomics*, 2 (2002), 3-10.
21. J. X. Yan, N. H. Packer, A. A. Gooley, K. L. Williams, *Protein phosphorylation: technologies for the identification of phosphoamino acids*, *J. Chromatogr. A*, 808 (1998), 23-41.
22. H. Kaufmann, J. E. Bailey, M. Fussenegger, *Use of antibodies for detection of phosphorylated proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis*, *Proteomics*, 1 (2001), 194–199.
23. D. M. Olive, *Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development*, *Expert Rev. Proteomics*, 1 (2004), 327-341.
24. P. A. Grimsrud, D. L. Swaneya, C. D. Wengera et al, *Phosphoproteomics for the masses*, *ACS Chem. Biol.*, 5 (2010), 105–119.
25. T. S. Nuhse, S. C. Peck, *Peptide-based phosphoproteomics with immobilized metal ion chromatography*, *Methods Mol. Biol.*, 323 (2006), 431-436.
26. L. Anderson, J. Porath, *Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography*, *Anal. Chem.*, 254 (1986), 250-254.
27. S. B. Ficarro, G. Adelmant, M. N. Tomar, et al., *Magnetic bead processor for rapid evaluation and optimization of parameters for phosphopeptide enrichment*, *Anal. Chem.*, 81 (2009), 4566-4575.
28. J. Ye, X. Zhang, C. Young, X. Zhao, et al., *Optimized IMAC–IMAC Protocol for Phosphopeptide Recovery from Complex Biological Samples*, *J. Proteome Res.*, 9 (2010), 3561-3573.
29. Y. Ikeguchi, H. Nakamura, *Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration of titania*, *Anal. Sci.*, 13 (1997), 479-485.
30. M. Gates, L. Tomer, *Comparison of metal and metal oxide media for phosphopeptide enrichment prior to mass spectrometric analyses*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21 (2010), 1649-1659.
31. C. L. Nilson, *Advances in Quantitative Phosphoproteomics*, *Anal. Chem.*, 84 (2012), 735-746.
32. A. Gruhler, J. V. Olsen, S. Mohammed, et al, *Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signalling pathway*, *Mol. Cell Proteomics*, 4 (2005), 310-327.
33. J. V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, et al, *Global, in vivo and site-specific phosphorylation dynamics in signalling networks*, *Cell*, 127 (2006), 635-648.
34. J. Villen, S. A. Beausoleil, S. A. Gerber, et al, *Large scale phosphorylation analysis of mouse liver*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007), 1488-1493.
35. D. E. McNutly, R. S. Annan, *Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection*, *Mol. Cell Proteomics*, 7 (2008), 971-980.
36. J. Rush, A. Moritz, K. A. Lee, et al, *Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells*, *Nat. Biotechnol.*, 23 (2005), 94-101.

37. A. J. Alpert, *Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides*, *Anal. Chem.*, 80 (2008), 62-76.
38. P. Singh, C. S. Gan, T. Guo, et al, *Investigation of POPX2 phosphatase functions by comparative phosphoproteomic analysis*, *Proteomics*, 11 (2011), 2891-2900.
39. M. Gronborg, T. Z. Kristiansen, A. Stensballe, et al, *Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of Vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000), 179-184.
40. S. E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *Properties of <sup>13</sup>C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*, *J. Proteome Res.*, 2 (2003), 173-181.
41. S. E. Ong, et al, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*, *Mol. Cell. Proteomics*, 1 (2002), 376-386.
42. M. Hilger, T. Bonaldi, F. Gnad, et al, *Systems-wide analysis of a phosphatase knock-down by quantitative proteomics and phosphoproteomics*, *Mol. Cell. Proteomics*, 8 (2009), 1908-1920.
43. S. P. Gygi, et al, *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*, *Nat. Biotechnol.*, 17 (1999), 994-999.
44. M. B. Goshe, T. D. Veenstra, E. A. Panisko, et al, *Phosphoprotein Isotope-Coded Affinity Tags: Application to the Enrichment and Identification of Low-Abundance Phosphoproteins*, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 607-616.
45. M. D. Platt, A. M. Salicioni, D. F. Hunt, P. E. Visconti, *Use of differential isotopic labeling and mass spectrometry to analyze capacitation-associated changes in the phosphorylation status of mouse*, *J. Proteome Res.*, 8 (2009), 1431-1440.
46. S. Y. Huang, M. L. Tsai, C. J. Wu, et al, *Quantitation of protein phosphorylation in pregnant rat uteri using stable isotope dimethyl labeling coupled with IMAC*, *Proteomics*, 6 (2006), 1722-1734.
47. S. J. Ding, Y. Wang, J. M. Jacobs, et al, *Quantitative phosphoproteome analysis of lysophosphatidic acid induced chemotaxis applying dualstep (<sup>18</sup>O) labeling coupled with immobilized metal-ion affinity chromatography*, *J. Proteome Res.*, 7 (2008), 4215-4224.
48. P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, et al, *Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces Cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents*, *Mol. Cell. Proteomics*, 3 (2004), 1154-1169.
49. S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, et al, *Absolute quantification of protein and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100 (2003), 6940-6945.
50. R. J. Beynon, M. K. Doherty, J. M. Pratt, S. J. Gaskell, *Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides*, *Nat. Methods*, 2 (2005), 587-589.
51. A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. R. F. Campa, J. R. Encinar, J. Bettmer, *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008), 3-16.
52. M. Wang, W. Feng, Y. Zhao, et al, *ICP-MS-Based strategies for protein quantification*, *Mass Spectrom. Rev.*, 29 (2010), 326-348.

53. A. P. Navaza, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, *Quantitative protein phosphorylation analysis: the role of ICP-MS*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007), 1223-1237.
54. M. Wind, A. Wegener, A. Eisenmenger, et al, *Sulfur as the Key Element for Quantitative Protein Analysis by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42 (2003), 3425-3427.
55. M. Wind, H. Wesch, W. D. Lehmann, *Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, 73 (2001), 3006-3010.
56. J. M. Marchante-Gayón, *Double-focusing ICP-MS for the analysis of biological materials*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004), 335-337.
57. D. R. Bandura, V. I. Baranov, S. D. Tanner, *Detection of ultratrace phosphorus and sulfur by quadrupole ICPMS with dynamic reaction cell*, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 1497-1502.
58. D. Pröfrock, P. Leonhard, W. Ruck, A. Prange, *Development and characterization of a new interface for coupling capillary LC with collision-cell ICP-MS and its application for phosphorylation profiling of tryptic protein digests*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005), 194-204.
59. R. Krüger, D. Kübler, R. Pallissé, et al, *Protein and proteome phosphorylation stoichiometry analysis by element mass spectrometry*, *Anal. Chem.*, 78 (2006), 1987-1994.
60. A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. L. F. Sánchez, *Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003), 236-247.
61. J. R. Yates, *Mass spectrometry and the age of the proteome*, *J. Mass Spectrom.*, 33 (1998), 1-19.
62. J. E. Carr, K. Kwok, G. K. Webster, J. W. Carnahan, *Effects of liquid chromatography mobile phases and buffer salts on phosphorus inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometries utilizing ultrasonic nebulisation and membrane desolvation*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006), 42-50.
63. D. Schaumlöffel, J. R. Encinar, R. Lobinski, *Development of a sheathless interface between reversed-phase capillary HPLC and ICPMS via a microflow total consumption nebulizer for selenopeptide mapping*, *Anal. Chem.*, 75 (2003), 6837-6842.
64. P. Giusti, D. Schaumlöffel, J. R. Encinar, J. Szpunar, *Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005), 1101-1107.
65. A. P. Navaza, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, *Absolute and Accurate Quantification of Protein Phosphorylation by Using an Elemental Phosphorus Standard and Element Mass Spectrometry*, *Angew. Chem.*, 46 (2007), 569-571.
66. A. P. Navaza, J. R. Encinar, M. Carrascal, J. Abián, A. Sanz-Medel, *Absolute and Site-Specific Quantification of Protein Phosphorylation Using Integrated Elemental and Molecular Mass Spectrometry: Its Potential To Assess Phosphopeptide Enrichment Procedures*, *Anal. Chem.*, 80 (2008), 1777-1787.

67. A. P. Navaza, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, *Element mass spectrometry as a tool for high-resolution temporal dynamics investigations of peptide phosphorylation*, Chem. Commun., (2008), 6230-6232.
68. S. D. Fernández, N. Sugishama, J. R. Encinar, A. Sanz-Medel, *Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics*, Anal. Chem., 84 (2012), 5851-5857.
69. D. Guillarme, S. Heinisch, J. L. Rocca, *Effect of temperature in reverse phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1052 (2004), 39-51.
70. M. Wind, M. Edler, N. Jakubowski, et al, *Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to elemental mass spectrometry*, Anal. Chem., 73 (2001), 29-35.

# APÉNDICES

## APÉNDICE 1

### Secuencia de la $\beta$ -caseína y péptidos trípticos

La secuencia de la  $\beta$ -caseína, según la base de datos Swiss-Prot, se muestra a continuación. Se ha señalado en rojo el péptido señal, en verde las Ser que presentan fosforilación y en amarillo las Met.

MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVE S LSSSEESITR INKKIEKFS EEQQQTEDEL

70                    80                    90                    100                    110                    120

QDKIHPFAQT QSLVYPPFGP IPNSLPQNIP PLTQTPVVVP PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK

130                    140                    150                    160                    170                    180

HKEMPFPKYP VEPFTESQSL TLTVDENLHL PLPLLQSWMH QPHQPLPPTV MFPPQSVLSL

190                    200                    210                    220

SQSKVLPVPQ KAVPYPQDM PIQAFLLYQE PVLGPVGRPF PIIV

Puesto que la tripsina rompe la proteína en los aminoácidos lisina (K) y arginina (R), los péptidos esperados son:

- 1) R
- 2) ELEELNVPGEIVE S LSSSEESITR
- 3) INK
- 4) K
- 5) IEK
- 6) FQ S EEQQQTEDELQDK
- 7) IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK
- 8) VK
- 9) EAMAPK
- 10) HK
- 11) EMPFK
- 12) YPVEPFTESQSLTLTVDENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK
- 13) VLPVPQK
- 14) AVPYPQR
- 15) DMPIQAFLLYQEPVLPVGR
- 16) GPFPIIV

En definitiva, se espera que exista un péptido tetrafosforilado (péptido 2), un monofosforilado (6) y 5 péptidos con S (7, 9, 11, 12 y 15).

**APÉNDICE 2**

## Secuenciación del digerido tríptico mediante ESIMS

Las Tablas A, B y C muestran, respectivamente, la relación  $m/z$  de los iones  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+3H]^{3+}$  teóricos y encontrados mediante ESIMS para los péptidos de P y S de interés del digerido tríptico de  $\beta$ -caseína.

**Tabla A.**  $m/z$  de los  $[M+H]^+$  teóricos y encontrados mediante ESIMS para los péptidos de P y S.

Péptido	$m/z$ $[M+H]^+$ teórico	$m/z$ $[M+H]^+$ encontrado
EAMAPK	645.8	646.3
VPMLK (BAX)	587.8	587.3
FQpSEEQQQTEDELQDK	2063.0	*
EMPFPK	748.9	748.4
RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	3128.8	*
ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	2967.8	*
RELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	3044.0	*
ELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	2887.8	*
DMPIQAFLLYQEPVLPVPR	2187.6	*

\* El rango de  $m/z$  medido en UPLC-ESIMS fue de 200 a 2000.

**Tabla B.**  $m/z$  de los  $[M+2H]^{2+}$  teóricos y encontrados mediante ESIMS para los péptidos de P y S.

Péptido	$m/z$ $[M+2H]^{2+}$ teórico	$m/z$ $[M+2H]^{2+}$ encontrado
EAMAPK	323.4	323.7
VPMLK (BAX)	294.4	294.3
FQpSEEQQQTEDELQDK	1032.0	1031.6
EMPFPK	374.95	374.8
RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	1562.4	1562.4
ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	1484.4	No se detecta
RELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	1522.5	1522.9
ELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	1444.4	No se detecta
DMPIQAFLLYQEPVLPVPR	1094.3	1093.9

**Tabla C.** *m/z* de los  $[M+3H]^{3+}$  teóricos y encontrados mediante ESIMS para los péptidos de P y S.

Péptido	<i>m/z</i> $[M+3H]^{3+}$ teórico	<i>m/z</i> $[M+3H]^{3+}$ encontrado
EAMAPK	216.3	No se detecta
VPMLK (BAX)	294.4	No se detecta
FQpSEEQQQTEDELQDK	688.33	688.1
EMPFPK	250.3	No se detecta
RELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	1042.0	1041.8
ELEELNVPGEIVEpSLpSpSpSEESITR	963.26	No se detecta
RELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	1015.3	1015.5
ELEELNVPGEIVESLpSpSpSEESITR	963.3	No se detecta
DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	730.2	729.8