



MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

“El uso de distintas matrices de MALDI-MS para el análisis de proteínas intactas y su comparación con ESI-MS”

Francisco Javier Alonso García

Mayo 2014, Oviedo



Departamento de Química Física y Analítica

JÖRG BETTMER, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado *“El uso de distintas matrices de MALDI-MS para el análisis de proteínas intactas y su comparación con ESI-MS”* ha sido realizado por el Licenciado **Francisco Javier Alonso García** 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, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Mayo 2014

Fdo. Jörg Bettmer

1. Índice.

| | |
|---|----|
| 1. Índice | 3 |
| 2. Introducción | 6 |
| 2.1. Introducción a las proteínas | 7 |
| 2.2. La espectrometría de masas para el análisis de proteínas | 11 |
| 2.2.1. MALDI-MS | 11 |
| 2.2.2. ESI-MS | 14 |
| 2.3. Proteínas empleadas | 17 |
| 3. Objetivos | 17 |
| 4. Experimental | 19 |
| 4.1. Instrumentación | 20 |
| 4.1.1. MALDI-TOF | 20 |
| 4.1.2. ESI-q-TOF..... | 20 |
| 4.2. Materiales y reactivos | 22 |
| 4.3. Preparación de las muestras | 23 |
| 4.4. Parámetros de los equipos | 26 |
| 5. Resultados y discusión | 28 |
| 5.1. Detección de proteínas con espectrometría de masas molecular | 29 |
| 5.1.1. Superóxido Dismutasa | 29 |
| 5.1.1.1. SOD con MALDI | 29 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| 5.1.1.2. SOD con ESI | 34 |
| 5.1.2. Insulina | 35 |
| 5.1.2.1. Insulina con MALDI | 35 |
| 5.1.2.2. Insulina con ESI | 37 |
| 5.1.3 Citocromo C | 38 |
| 5.1.3.1. Citocromo C con MALDI..... | 38 |
| 5.1.3.2. Citocromo C con ESI..... | 42 |
| 5.1.4. Hemoglobina | 43 |
| 5.1.4.1. Hemoglobina con MALDI | 43 |
| 5.1.4.2. Hemoglobina con ESI. | 45 |
| | |
| 6. Conclusiones | 48 |
| | |
| 7. Bibliografía | 50 |

2. Introducción

2.1) Introducción a las proteínas.

Las proteínas son sustancias orgánicas nitrogenadas complejas que se hallan en las células de animales y vegetales. Son compuestos poliméricos en los que las unidades monoméricas se denominan aminoácidos. En el código genético existen 22 aminoácidos que forman codones que forman parte de las proteínas. De estos 22 aminoácidos, 7 son aminoácidos esenciales (Valina, Leucina, Treonina, Lisina, Triptófano, Histidina, Fenilalanina, Isoleucina, Arginina y Metionina). Que un aminoácido sea esencial quiere decir que han de ser captados por los seres vivos a través de la dieta. La carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo de los organismos. Las proteínas se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que proporcionan las diferentes funciones que pueden tener. Algunas proteínas se unen al DNA y regulan la expresión de los genes; otras participan en procesos de replicación, de transcripción y traducción de la información genética; otras están relacionadas con el sistema inmunitario; con la contracción muscular; con el transporte de sustancias en el torrente sanguíneo y la respiración celular.

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en las células (comprenden más del 50% del peso seco de la célula. Además de los elementos comunes a todas ellas (C, H, O, N) pueden contener otros elementos químicos como S, P, Fe, Zn o Cu. [1]

Las proteínas son componentes esenciales de todas las células vivas. Su misión en el organismo se puede clasificar en dos grandes grupos:

- Tipo estructural: formando parte del propio organismo.
- Tipo funcional.

Las características generales para todas las proteínas son:

- El peso molecular de casi todas las proteínas varía entre 5000 Da y varios millones de Da.
- Los aminoácidos que constituyen las proteínas son 20, que se unen entre sí por medio de enlaces peptídicos. En la figura 1, se observa una representación esquemática de la reacción de formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos.

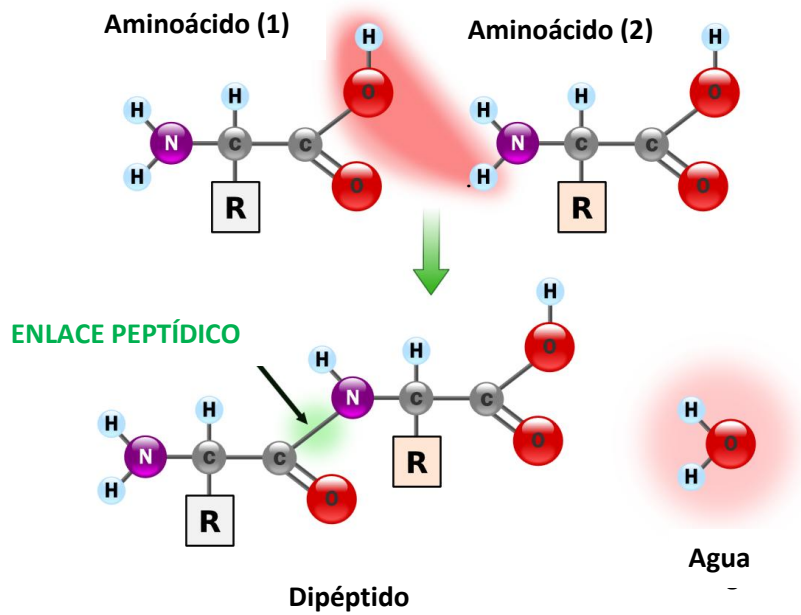


Figura 1. Reacción de formación del enlace peptídico.

- La conformación de las proteínas se mantiene por fuerzas débiles (tipo puentes disulfuro, enlaces por puentes de hidrógeno...); por ello, se altera fácilmente por ligeros cambios de pH, de temperatura o por diferentes disolventes.
- La hidrólisis parcial de una proteína, realizada mediante ácidos, bases o enzimas conduce a la obtención de moléculas más pequeñas (péptidos). En caso de que se produzca la hidrólisis total se obtienen los aminoácidos que la componen.[3]

Las proteínas presentan, en su gran mayoría, cuatro niveles diferentes de organización tridimensional.

- Estructura primaria: es la consecuencia de la secuencia y ordenamiento de los aminoácidos.
- Estructura secundaria: se refiere a la estructura que adopta espacialmente una parte de la proteína. Es consecuencia de las interacciones por puentes de hidrógeno. Esta estructura hace que las proteínas adquieran estabilidad. Los dos tipos de estructuras más frecuentes son:

- 1) Hélice α : la cadena adopta una conformación helicoidal con los grupos R de los aminoácidos orientados hacia afuera. En la formación de esta estructura se une el grupo

carboxilo del aminoácido "n" con el grupo amino del aminoácido "n+4". Se produce un número máximo de interacciones lo que hace que sea una estructura muy estable.

- 2) Hojas plegadas β : en este caso, la cadena queda estirada y la estructura se dispone en zig - zag espacialmente, formando las láminas. Puede darse esta conformación de forma paralela o antiparalela. Los grupos R se disponen hacia adentro o hacia afuera de forma alternada. Esta conformación se estabiliza por puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo del aminoácido "n" y el grupo amino del aminoácido "n+3".

Las regiones de las proteínas que tienen una estructura secundaria definida se llaman dominios.

- Estructura terciaria: es la forma en que la cadena polipeptídica se curva o se pliega para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las proteínas globulares. La estructura terciaria define las interacciones entre los diferentes dominios que forman la proteína. La estructura terciaria es específica de cada proteína y determina su función. En función de su estructura terciaria, las proteínas se pueden clasificar como:

- Proteínas fibrosas: las proteínas fibrosas se hallan constituidas por cadenas polipeptídicas ordenadas de modo paralelo a lo largo de un eje, formando fibras o láminas largas. Algunos ejemplos de este tipo son colágeno, α -queratina o la elastina.

- Proteínas globulares: están constituidas por cadenas polipeptídicas plegadas estrechamente de modo que adoptan formas esféricas o globulares compactas. Algunos ejemplos son: ferritina o albúmina. [4]

Es importante tener en cuenta que la pérdida de la estructura terciaria implica la pérdida de la función de la proteína. Este proceso se denomina desnaturalización [5].

- Estructura cuaternaria: la estructura cuaternaria solo la tienen las proteínas que poseen más de una cadena polipeptídica, es decir, las proteínas oligoméricas. La estructura cuaternaria debe considerarse:

1) El número y la naturaleza de las distintas subunidades y monómeros que integran el oligómero.

2) La forma en que se asocian los monómeros en el espacio.

Un ejemplo de proteína con estructura cuaternaria es la hemoglobina [6].

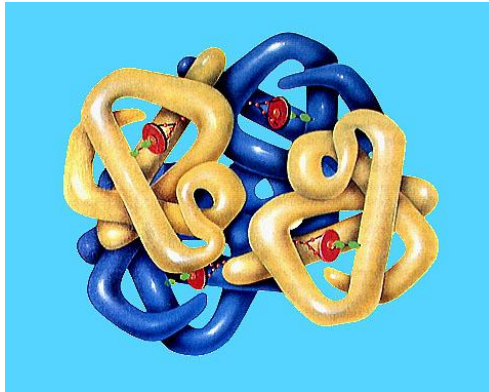


Figura 2. Hemoglobina.

En la figura 2 se puede observar la estructura cuaternaria de la hemoglobina. En ella se distinguen las dos cadenas α (amarillo) y las dos cadenas β (azul), así como los grupos hemo asociados a cada cadena donde se encuentran los átomos de Fe que tiene dicha proteína.

En párrafos anteriores se dijo que la estructura terciaria es la que determina la función de las proteínas. Las funciones más importantes que llevan a cabo éstas en los organismos vivos son:

- **Función defensiva:** son las encargadas de crear los anticuerpos y regulan factores contra agentes extraños e infecciones.
- **Función reguladora:** algunas proteínas sirven para regular la división celular y otras regulan la expresión de ciertos genes.
- **Función enzimática:** actúan como biocatalizadores acelerando las reacciones químicas del metabolismo.
- **Función amortiguadora:** mantienen el pH y el equilibrio osmótico en diversos medios. Se conoce también como función homeostática de las proteínas.
- **Función contráctil:** es la responsable de la contracción de los músculos.

- **Función estructural:** es de gran importancia. Las proteínas forman tejidos de sostén y relleno que confieren elasticidad y resistencia a órganos y tejidos. Son las proteínas que forman la estructura del organismo.
- **Función energética:** algunas proteínas tienen una función de reserva energética.
- **Función de transporte:** Normalmente, suelen transportar oxígeno, electrones o lipoproteínas [7].

2.2) La espectrometría de masas para el análisis de proteínas.

La multitud de funciones que desarrollan y en las que participan las proteínas hacen que sean unas biomoléculas muy importantes para la vida. Por lo tanto, son unos compuestos ampliamente estudiados en el mundo científico. Tanto para la química analítica como para la bioquímica y la biología son muy importantes las técnicas de espectrometría de masas molecular. Las dos técnicas más importantes de espectrometría de masas molecular en el estudio de las proteínas son MALDI-MS y ESI-MS:

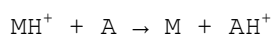
2.2.1) MALDI-MS.

Las espectrometría de masas MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization) es una técnica ampliamente empleada para transferir moléculas grandes o no volátiles a fase gas como iones observables en espectrometría de masas. Esta fuente de ionización suave puede usarse acoplada a analizadores de iones como el TOF (tiempo de vuelo) o analizadores de trampa de iones. La técnica es muy empleada en la caracterización de biomoléculas, polímeros, productos naturales y moléculas orgánicas e inorgánicas [8]. En las medidas por MALDI, la muestra se debe mezclar con una matriz adecuada y, conjuntamente, la mezcla se dejará secar y cristalizar antes de comenzar con las medidas. Las funciones principales de las matrices del MALDI son la de absorber parte de la radiación que proviene de la fuente láser y ayudar al analito a adquirir la carga correspondiente para poder ser

medido en el analizador de masas. Las características más generales que tiene que cumplir cualquier matriz de MALDI son:

1. Las matrices de MALDI deben ser capaces de absorber radiación a las longitudes de onda de la fuente láser con la que se trabaja.
2. Debe de ser soluble en las condiciones en las que se trabaja.
3. Debería de producir pocas reacciones secundarias con la muestra y, si las produce, que sean conocidas (formación de aductos).
4. Tienen que ser sustancias que no sublimen cuando están sometidas al alto vacío de la cámara láser.
5. Deben tener las propiedades químicas adecuadas para ayudar al analito a ionizarse correctamente, es muy importante que sean sustancias con grupos ácidos para cargar los analitos positivamente.
6. Debe de ser una sustancia que se fragmente poco en contacto con la radiación del láser. Esto es necesario para evitar reacciones secundarias o formación de aductos con el analito [9].

Una vez hecha la mezcla entre el analito y la matriz en las proporciones adecuadas y, sobre todo, en los disolventes adecuados, se coloca la cantidad necesaria de la mezcla sobre el soporte adecuado y se deja cocristalizar. Esta mezcla es sometida a pulsos cortos de radiación láser a alto vacío produciéndose la volatilización de la misma al producirse la absorción de la energía. Esta energía que ha sido absorbida por la mezcla se convierte en energía de excitación y facilita la transferencia de protones desde la matriz al analito produciéndose la ionización:



Esta área que irradia el láser se calienta haciendo que se produzca la desorción y la sublimación de los iones. Los iones en fase gas se transfieren al analizador de masas, donde son separados en función de su relación m/z antes de llegar al detector. El analizador de masas que más se utiliza junto con la ionización por MALDI es el TOF (analizador de masas por tiempo de vuelo) [9]. Esto se debe a que la fuente de iones (el láser) es una fuente pulsada por lo que, es necesario acoplar como analizador de masas una que sea capaz de

detectar los pulsos correctamente y que los iones entre un pulso y otro no se mezclen entre sí produciendo errores en la medida.

Las características más importantes que tienen los equipos de ionización por MALDI son:

1. Es una técnica de medida muy robusta.
2. Son equipos con una sencillez de manejo muy importante.
3. Permiten hacer medidas en un amplio rango de masas.
4. Tienen capacidad de automatización del trabajo.
5. Se pueden acoplar a otros analizadores de masas con el objetivo de aumentar la sensibilidad y la resolución de las medidas (IT, FTICR, instrumentación MS/MS) [10], [11].

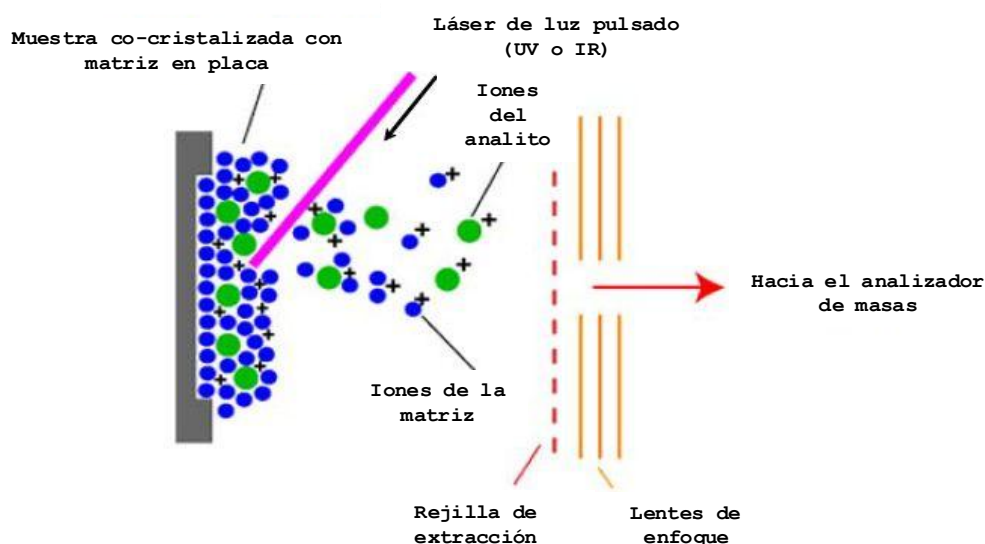


Figura 3. Esquema de la desorción e ionización por MALDI.

El mecanismo de ionización del MALDI es una de las mayores incógnitas que presenta la técnica ya que no se conoce el mecanismo por completo pero, si que se sabe que, la matriz tiene tres funciones muy importantes:

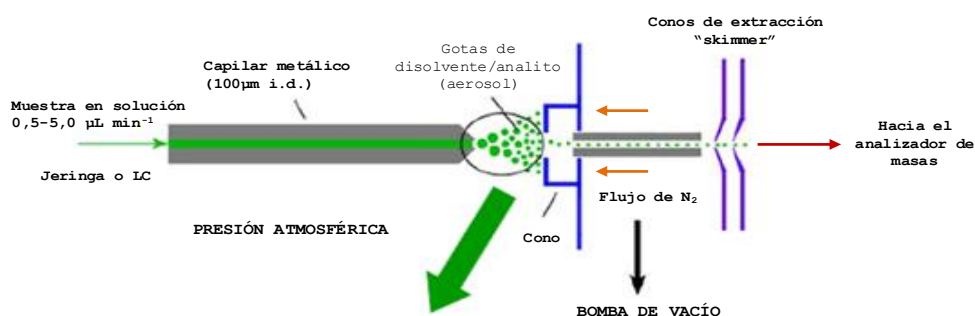
- 1) El exceso de matriz sirve para aislar el analito con el objetivo de que las interacciones intramoleculares sean mínimas.
- 2) La absorción de la radiación procedente del láser genera el transporte del analito y la matriz a la fase gaseosa.

3) La matriz es esencial para que se produzca la ionización de las moléculas de analito. La formación de iones es un proceso altamente exotérmico. En las medidas en modo positivo, las cargas positivas de los analitos provienen de cationes que son cedidos por la matriz en el momento de formación de la "pluma" donde se mezcla matriz y analitos. A pesar de no estar muy claro el mecanismo de ionización, este es el más aceptado [12] y [13].

2.2.2) ESI-MS

La espectrometría de masas por ionización por electro spray (ESI-MS) es una técnica que es capaz de analizar moléculas de amplio rango de masas moleculares con una sensibilidad por debajo de los picomoles y con una buena exactitud de masas (en el rango del 0.01 - 0.02%).

Esta técnica es muy utilizada para analizar péptidos, proteínas, carbohidratos, oligonucleótidos, biopolímeros y muestras de origen biológico. ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica: la muestra debería estar disuelta en un disolvente adecuado para introducirla al equipo mediante una bomba de cromatografía de líquidos o la de jeringa mediante un tubo capilar de acero inoxidable.



INCREMENTO DE LA DENSIDAD DE CARGA



Figura 4. Esquema de la ionización por ESI.

La punta de este capilar se somete a un alto potencial (2-6 kV) con respecto a un contraelectrodo cilíndrico que rodea la entrada al analizador de masas justo antes del primer cono de extracción de iones (skimmer). Debido a esta diferencia de potencial se produce un fino aerosol en forma de cono a presión atmosférica que se compone de pequeñas gotas del analito fuertemente cargado, esto es lo que se denomina cono de Taylor [14]. Para ayudar a la nebulización del analito y a la evaporación del disolvente se suele usar un gas inerte (típicamente N₂). Durante el transporte desde la región a presión atmosférica hacia el analizador de masas a alto vacío las gotas del aerosol van disminuyendo de tamaño debido a la alta tensión electrostática que se genera en el interior de la gota. Este proceso se denomina explosión de Coulomb. Dicho proceso se repite hasta que las gotas adquieren un tamaño en el rango de los micrómetros y estén ausentes de disolvente. En el siguiente paso, los iones completamente desolvatados y cargados con una o múltiples cargas se aceleran por campos eléctricos hasta que entran al analizador de masas. Existen dos teorías para la formación de los iones en el electrospray pero el mecanismo real es aún desconocido [15]-[18].

En los análisis por ESI, las muestras se diluyen en una proporción 1:1 en un disolvente orgánico (típicamente, acetonitrilo o metanol) con una proporción menor del 1% de un ácido (ácido fórmico o ácido trifluoroacético) en el caso de querer hacer medidas en modo positivo o en una base diluida en el caso de trabajar en modo negativo (Hidróxido de amonio).

Es muy importante tener en cuenta que altas concentraciones de sales, de reactivos que formen pares iónicos, disoluciones reguladoras, agentes reductores o detergentes pueden hacer que la detección de los analitos se suprima. Por lo tanto, es muy importante que a las muestras que se desean analizar mediante esta técnica se les haga un pretratamiento de limpieza que asegure que todos estos agentes se eliminen en una proporción importante [19].

Los equipos de ESI trabajan a unos flujos entre 2 - 20 µL/min, tanto en infusión directa como acoplados a equipos de cromatografía de líquidos.

Según la teoría de las multicargas descrita por Fenn [15], las moléculas orgánicas pueden adquirir tantas cargas como hidrógenos ácidos posea. Por este motivo, las proteínas con pesos moleculares entre 10 - 100 kDa pueden generar iones con valores de m/z por debajo

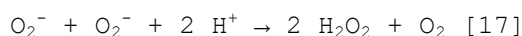
de 4000 Da y, por ello, se puede utilizar el ESI con un cuadrupolo (rango de masas por debajo de m/z 4000 Da) como herramienta para el estudio de este tipo de compuestos. Al igual que en el caso de la técnica descrita con anterioridad, el ESI puede acoplarse a diferentes analizadores de masas como la trampa iónica (IT), el tiempo de vuelo (TOF) o como un espectrómetro ciclotrónico de iones con transformada de Fourier (FTICR).

Se ha dicho antes que el ESI es una fuente de ionización suave y a presión atmosférica por lo que permite analizar y caracterizar complejos biomoleculares con interacciones débiles sin carácter covalente [20].

2.3) Proteínas empleadas.

En este trabajo Fin de Máster se trabajó con 4 compuestos diferentes:

- i. Superóxido dismutasa: es una enzima con un peso molecular en torno a 32 kDa que está implicada en la defensa de los organismos frente a la toxicidad potencial de O_2 . La reacción que cataliza es:



- ii. Insulina: es una enzima de 51 aminoácidos con dos cadenas con un peso molecular de ~ 6 kDa que actúa como una hormona encargada de la regulación de la captación y el almacenamiento de la glucosa [17]. Las dos cadenas de la insulina se denominan cadena α y cadena β y se unen entre sí por puentes disulfuro [21], [22].
- iii. Citocromo C: es una proteína de pequeño tamaño (~ 12.5 kDa) involucrada en el transporte electrónico mitocondrial. Es una proteína monomérica que tiene como grupo prostético un grupo hemo C con un átomo de hierro coordinado [23].
- iv. Hemoglobina: es una hemoproteína de los glóbulos rojos de mamíferos y otros animales que es responsable del transporte y almacenamiento de oxígeno. Es una proteína tetramérica con dos cadenas α y dos cadenas β que tiene una masa molecular aproximada de 63 kDa y un peso en cada cadena de 15 kDa.

3. Objetivos.

[Objetivos]

Por todo lo expuesto anteriormente es muy importante que las técnicas de detección y/o cuantificación de proteínas estén muy optimizadas. En este trabajo Fin de Máster se trabajó con las dos técnicas de espectrometría de masas más empleadas en el análisis de proteínas (MALDI y ESI). El trabajo llevado a cabo se dividió, a su vez, en dos objetivos parciales principales:

- 1) Evaluación de la novedosa matriz de MALDI, 2-nitrofluoroglucinol (NPG) y comparación de los resultados obtenidos con esta nueva matriz y las matrices más típicamente utilizadas en espectrometría de MALDI.

- 2) Comparativa de los resultados obtenidos con las dos técnicas de espectrometría de masas molecular más empleadas en proteómica (MALDI y ESI).

4. Experimental.

4.1 Instrumentación

4.1.1 MALDI - TOF.

El equipo de espectrometría de masas que se utilizó fue el modelo Voyager - DE™ STR Biospectrometry™ Workstation de Applied Biosystems (Langen, Alemania).

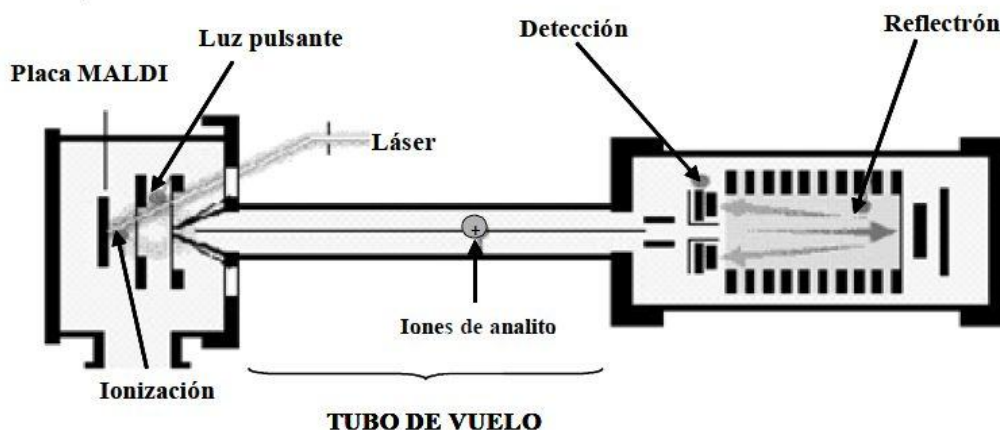


Figura 5. Representación esquemática del equipo MALDI - TOF.

Este equipo de MALDI viene provisto de un láser pulsado de N_2 (337 nm). Una característica muy importante que presenta es el sistema de extracción retardada de los iones. Esto hace que los iones se concentren todos a la entrada del TOF y en el momento en que se aplique el potencial de aceleración todos los iones lo reciban en el mismo momento y adquieran la misma energía cinética. Con esto se consiguen unos espectros de masas con señales más estrechas y una mejor resolución de masas. Como se observa en la figura 5, el equipo tiene como analizador de masas un tubo de vuelo. Este equipo puede trabajar en modo lineal o en modo reflectrón ya que dispone de dos detectores diferentes.

4.1.2 ESI - q - TOF.

El equipo de electrospray utilizado en este trabajo Fin de Máster es el modelo QStar XL® de Applied Biosystems (Langen, Alemania). Este instrumento utiliza N_2 como gas de nebulización y tiene una celda de

colisión de alta presión. En la figura 6 se muestra un esquema del equipo de ESI utilizado:

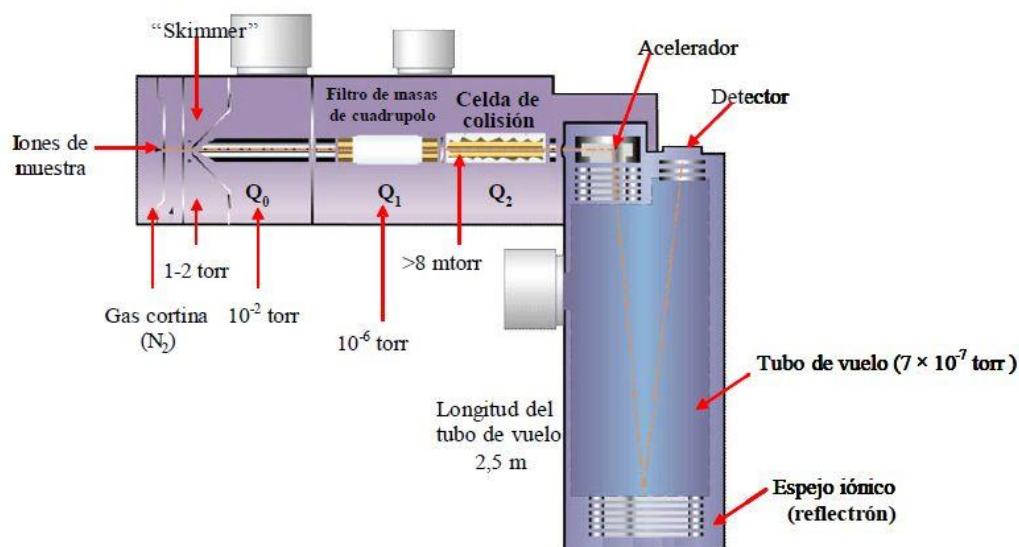


Figura 6. Representación esquemática del equipo ESI - q - TOF.

En este trabajo Fin de Máster se introdujo la muestra en el modo de infusión directa. Por ello, se introdujeron flujos muy bajos de muestra (entre 0.5 - 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) empleando el dispositivo con bomba de jeringa que tiene el equipo. Posteriormente, se aplica un flujo elevado de gas de nebulización (N_2) y una diferencia de potencial que va entre 3 - 3.5 kV. Los iones después de ser generados pasan a la interfase de vacío que es la encargada de separar la fuente de electrospray (a presión atmosférica) de la cámara de alto vacío. Su función es que se produzca una transferencia de iones al espectrómetro de masas de manera que se evite la entrada del resto de la muestra, del disolvente y de moléculas de aire. Con este motivo, se utiliza una "cortina de gas" N_2 . La cámara de vacío se divide en dos zonas diferentes, la primera de ellas a una presión de 1×10^{-2} torr que es donde está el primer cuadrupolo (Q_0) que actúa como guía de iones. La segunda zona de alto vacío (1×10^{-6} torr) contiene el segundo cuadrupolo que funciona como lente de iones o como filtro de masas cuadrupolar (Q_1) y por último tiene un tercer cuadrupolo (Q_2) que actúa como celda de colisión de alta presión. Después de esta zona, se encuentra el TOF (tiempo de vuelo) con una presión de 7×10^{-7} torr. La última parte del equipo es un detector de iones tipo Channel Electron Multiplier (CEM).

4.2 Materiales y reactivos.

- Disoluciones patrón de los compuestos utilizados en el trabajo Fin de Máster (insulina humana, superóxido dismutasa de eritrocitos humanos, Citocromo C y hemoglobina humana) de Sigma. Todas los analitos de este trabajo Fin de Máster están en una concentración de 1 mg/ml (1000 ppm).
- ZipTip Pipette tips for simple preparation C₁₈ (Millipore, Bredford, MA, USA), utilizados para la limpieza de las sales de las disoluciones de patrones de proteínas.
- Ácido nítrico ultrapuro obtenido mediante destilación lenta "sub-boiling" de ácido nítrico concentrado al 65 % (p/v) de calidad pro-análisis de Merck (Darmstadt, Alemania). Este ácido se utilizó en la limpieza del material de plástico y de vidrio.
- Acetonitrilo de calidad HPLC de Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA).
- Ácido fórmico (grado analítico ≥98%) de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Disolución de renina de Applied Biosystems (Langen, Alemania) con una concentración de 10 pmol/μL para la calibración externa del analizador de tiempo de vuelo del ESI - q - TOF - MS.
- 2 - nitrophenylglycine, 98% de Alpha Aesar (Karlsruhe, Germany) como matriz de MALDI novedosa.
- Ácido sinapínico Ultra Pure, matrix substance for MALDI - MS, >99.5% de Sigma (St Louis, USA) para las moléculas con un peso molecular superior a 10 kDa.
- Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico adecuado para MALDI-TOF MS de Sigma (St Louis, USA), para los compuestos de menos de 10 kDa.
- Ácido trifluoroacético de pureza 99% de Sigma (St Louis, USA) para acidificar las disoluciones de matrices de MALDI.

4.3 Preparación de las muestras.

En la primera parte se habla de las medidas que se realizaron con el equipo de espectrometría de masas MALDI - TOF. Lo primero que hay que tener en cuenta al empezar con el trabajo es que en la preparación de muestras para el MALDI, la mezcla de la disolución de analito con las matrices ha de cumplir la siguiente relación:

$$10 \text{ nmoles matriz}/0.1 \text{ pmol analito}$$

Las disoluciones de patrones de proteínas tienen que estar en una concentración entre 0.1 - 10 pmol/ μ L. En el caso de todas las proteínas que se utilizaron para las medidas con el MALDI-TOF, se disolvieron en una concentración de 1 mg/mL. Para ello, se pesó 1 mg dentro de un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se les añadió 1 mL de agua ultrapura. Con esta concentración inicial, una vez realizada la mezcla con la disolución de matriz en una proporción 1:1, se cumple la relación mostrada con anterioridad. Para facilitar la disolución homogénea del patrón de proteína se introduce durante 5 min en el baño de ultrasonidos.

En el caso de las matrices, cada una de ellas lleva un tratamiento diferente ya que la solubilidad no es igual en los tres casos:

- Ácido sinapínico (SA).

El ácido sinapínico (Figura 7) o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico es el compuesto más utilizado como matriz para las medidas con proteínas con un peso molecular superior a los 10 kDa. Es un compuesto orgánico con un peso molecular de 224.21 g/mol.

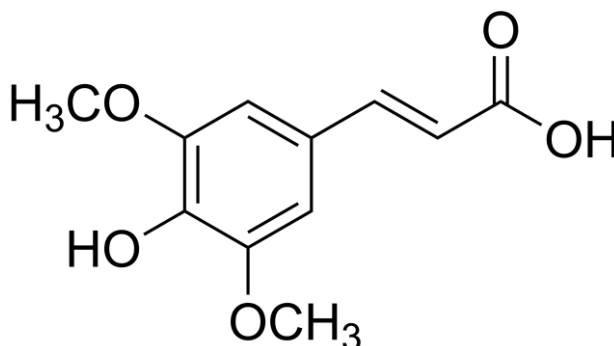


Figura 7. Estructura del ácido sinapínico.

El ácido sinapínico es una molécula orgánica con un carácter ácido debido al grupo carboxilo terminal. La presencia de grupos que puedan

ser cargados positivamente es una de las características principales y común a todas ellas de las matrices utilizadas en el MALDI.

La disolución saturada de la matriz de ácido sinapínico se preparó pesando 5 mg de ácido sinapínico y disolviéndolo en 1 mL de una mezcla de ACN:H₂O en una proporción 30:70 con un 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA).

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA).

Este compuesto tiene un peso molecular de 189.17 g/mol (Figura 8) y que se utiliza como la matriz adecuada para el análisis de compuestos con un peso molecular por debajo de 10 kDa.

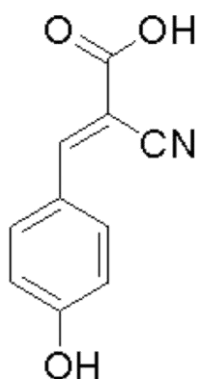


Figura 8. Estructura del CHCA

Para la preparación de esta matriz se pesó 5 mg de la matriz en un tubo de microcentrifuga y se añadió una mezcla ACN:H₂O en una proporción 50:50 con un 0.1 % de TFA.

- 2-nitrophenol (NPG).

El NPG es la matriz novedosa que se estudió en este trabajo Fin de Máster. Tiene un peso molecular de 171.11 g/mol. A diferencia de las matrices típicas, esta es capaz de producir iones con más de una o de dos cargas [24].

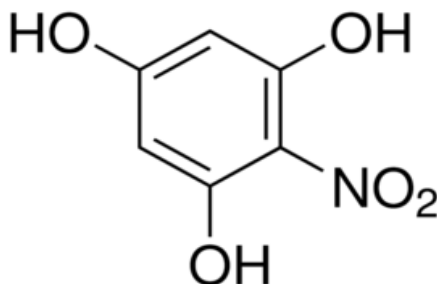


Figura 9. Estructura del NPG.

Se puede observar en la figura 9 que, a diferencia de las otras dos matrices utilizadas y representadas, el NPG no tiene un ácido carboxílico en su estructura y sí tres grupos hidroxilo. Esta es una de las características que lo diferencia del resto de matrices comunes utilizadas en MALDI.

Para la preparación de esta matriz, se pesan en un tubo de microcentrifuga 5 mg de la matriz y se le añade una mezcla ACN:H₂O en una proporción 50:50 con un 0.1% de TFA.

Una vez realizadas las dos disoluciones necesarias para las medidas del MALDI, se mezclan ambas en la proporción adecuada (1:1). La mezcla de la disolución de proteína y de la matriz se homogeneiza bien con ayuda del vortex y se coloca en el soporte adecuado para el equipo MALDI-TOF.

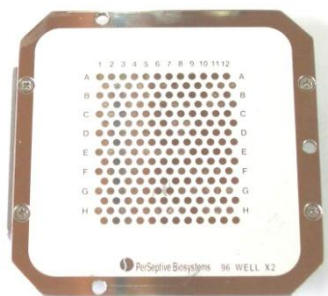


Figura 10. Placa portamuestras de MALDI.

En cada uno de los pocillos para colocar las muestras se puede poner entre 1 - 2 μ L de la mezcla de matriz:proteína. Cada vez que se preparó la placa con muestras se puso cada una de las mezclas en tres pocillos diferentes ya que, el depositado de la gota y las condiciones de cristalización son parámetros básicos que influyen en la obtención de buenos resultados.

Para colocar las muestras en los pocillos de la placa se utiliza una micropipeta con un rango de volúmenes entre 0.5 y 10 μ L. Es muy importante que no se toque con la punta de la micropipeta en la placa ya que dejarían un rastro y la cristalización no sería homogénea.

Es importante que antes de comenzar las medidas, la mezcla esté perfectamente cristalizada sobre la superficie de la placa portamuestras. Si no es así, se podría contaminar y ensuciar la cámara del láser del MALDI provocando un peor funcionamiento del equipo.

En la preparación de los analitos para el ESI, siempre se trabajó del mismo modo para todos ellos. Se hacen disoluciones de 1 mg/mL de las

proteínas en ACN:H₂O en una proporción 50:50 con un 0.1% de ácido fórmico.

Debido a las complicaciones que presenta el ESI con la formación de sales en los capilares, estas muestras antes de ser llevadas al equipo para realizarles las medidas se les hace un tratamiento con ZipTip para eliminarles la mayor cantidad de las sales que tengan.

El protocolo de trabajo con los ZipTip es el siguiente:

- i. Se homogeneiza el tip con una disolución 100% de ACN previamente filtrada con filtros de 0.22 µm.
- ii. Se pasa por el tip unas gotas de una disolución de agua con un 0.1% de TFA. Con esto se consigue equilibrar el cartucho de C₁₈.
- iii. A la muestra se le añade la cantidad necesaria de TFA para tener un 0.1%.
- iv. Se aspira el volumen de muestra 10 veces con una micropipeta.
- v. Se limpia el C₁₈ con una mezcla que tenga un 5% de metanol y un 0.1% TFA en agua. Con esto se eliminan de forma más eficiente las sales.
- vi. Se aspira 5 veces 1 µL de ACN con 0.1% FA y se recoge lo que se deja salir del tip en un tubo de microcentrifuga.

Debido al cuadrupolo que presenta el equipo, el rango de masas con el que se puede trabajar está entre 100 - 4000 Da. Por ello, para obtener los espectros de masas de las proteínas completas se realiza una deconvolución matemática con el propio "software" del equipo.

En todas las medidas con electrospray se realizó la calibración de masas del TOF con renina.

4.4 Parámetros de los equipos.

En el caso de las medidas del MALDI, los parámetros están puestos delante de cada una de las medidas ya que son factores muy importantes que hay que variar dependiendo de la matriz con la que estemos trabajando o de la proteína.

A diferencia del MALDI, en ESI los parámetros permanecen más fijados por los que los más importantes se recogen en la tabla 1:

[Experimental]

Tabla 1. Condiciones generales del ESI.

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Rango de Masas | 100 - 2000 Da |
| Modo de trabajo | TOF-MS |
| Polaridad | Positiva |
| Gas nebulización | 20 l/min |
| Gas cortina | 10 l/min |
| Voltaje | 4000 V |

5. Resultados y discusión.

5.1 Detección de proteínas con espectrometría de masas molecular.

5.1.1) Superóxido Dismutasa (SOD).

5.1.1.1) SOD con MALDI.

Como se ha comentado en el apartado "introducción", la superóxido dismutasa es una enzima que está involucrada en mecanismos de estrés oxidativo de las células. En este trabajo Fin de Máster se utilizó superóxido dismutasa procedente de eritrocitos humanos (P00441) que tiene un peso molecular de 31872 Da.

Debido al peso molecular superior a 10 kDa, la SOD se estudió con SA y con NPG.

Las condiciones de trabajo en el equipo de MALDI para la SOD con SA se recogen en la tabla 2:

Tabla 2. Condiciones de medida del MALDI para SOD con SA.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2500 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 4000 - 35000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

En la figura 11 se puede ver el espectro obtenido de la SOD con SA como matriz.

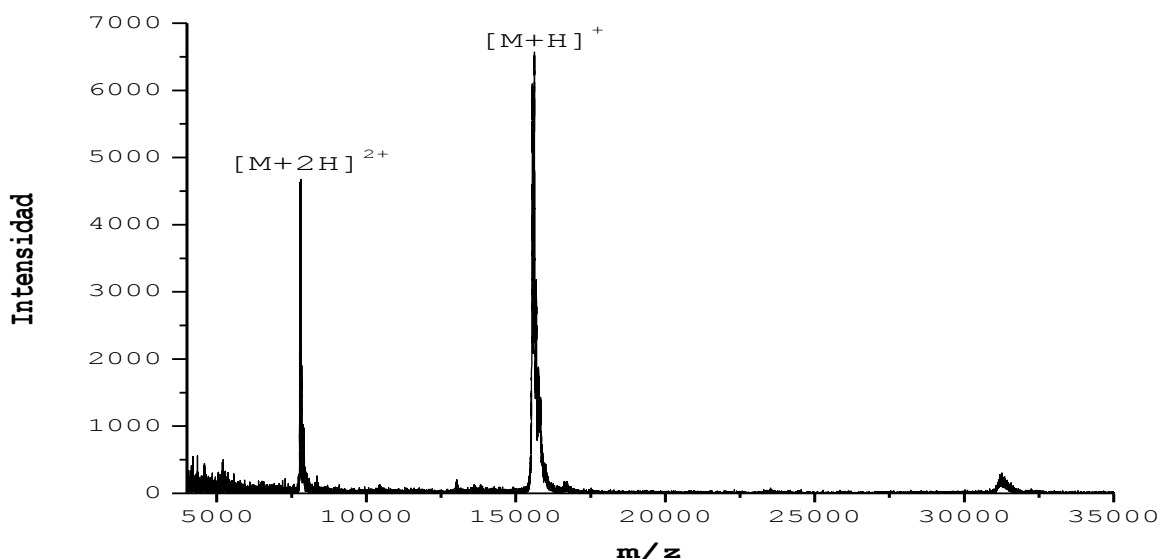


Figura 11. Espectro de MALDI para SOD con SA

La superóxido dismutasa es una proteína con dos subunidades idénticas. Por eso, a una m/z de 31253.72 Da se observa señal correspondiente a la molécula de proteína intacta $[M+H]^+$. En este caso, en los estudios de MALDI de la SOD el pico de mayor intensidad se corresponde con los monómeros con una carga +1. En general, y como se dijo con anterioridad, en MALDI lo más común es que se produzcan únicamente iones $[M+H]^+$ o que éstos sean los más intensos en el espectro de masas. Se observa también un pico con una buena intensidad para la especie $[M+2H]^{2+}$ pero, a partir de ahí, ya no se observan mas cargas para esta especie.

Si se amplían las dos zonas de interés correspondientes a las especies $[M+H]^+$ (figura 12) y $[M+2H]^{2+}$ (figura 13), se observa lo siguiente

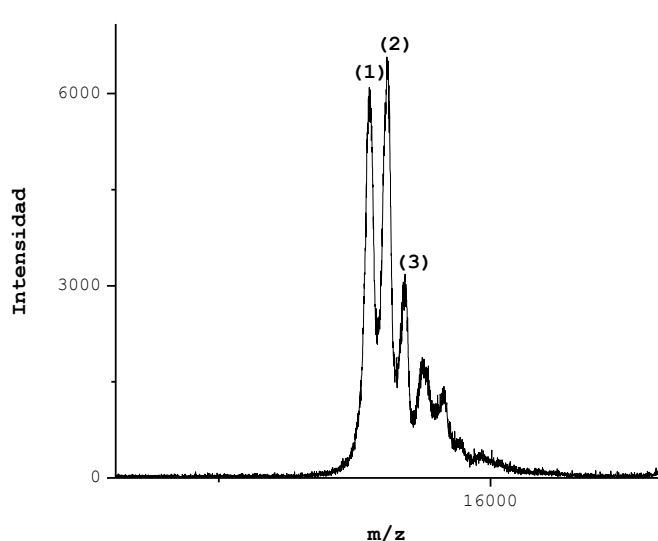


Figura 12. $[M+H]^+$ de SOD con SA

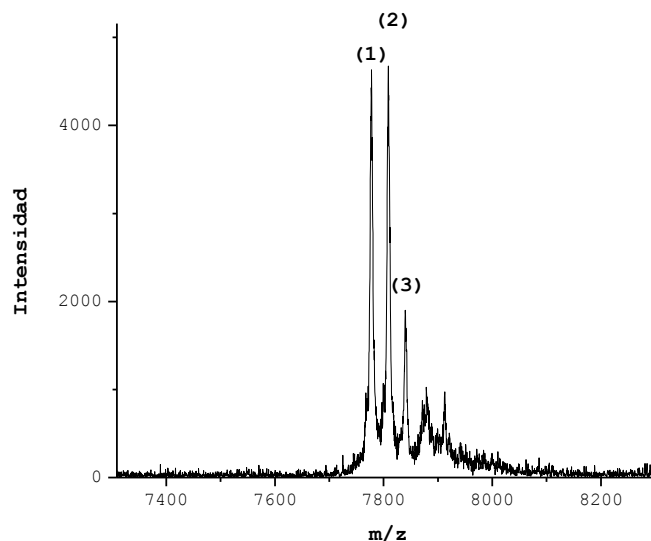


Figura 13. $[M+2H]^{2+}$ de SOD con SA

Los resultados obtenidos en forma de m/z se representan en la tabla 3:

Tabla 3. Resultados de las medidas de MALDI para SOD con SA.

| SOD (SA) | | |
|----------|------------------|------------------|
| Pico | m/z [Da] (z=1) | m/z [Da] (z=2) |
| 1 | 15554.56 | 7778.09 |
| 2 | 15618.80 | 7808.32 |
| 3 | 15685.10 | 7839.85 |

La SOD humana tiene asociados dos metales diferentes que hacen que la proteína tenga actividad de enzima. En este caso, los metales que tienen asociados son Cu y Zn. En los espectros de masas se puede ver que en cada rango de carga diferente se pueden ver tres picos diferentes para la proteína. En el caso del primer pico se trata de la proteína entera en la que están asociados tanto Cu como Zn. En el caso del segundo pico se corresponde con la proteína solo asociada al

Cu. Esto se sabe haciendo cálculos de diferencias entre ambos picos ($\Delta m = 66.3$ Da corresponde a la pérdida de Zn). El último pico de los tres se corresponde con la proteína en su forma apo (sin metales asociados, $\Delta m = 64.24$ Da corresponde a la pérdida de Cu). Además, se pueden observar dos picos a $m/z = 15751.38$ Da y 15830.57 Da, que corresponden a aductos de la proteína con la matriz.

Se observa como en el caso de $[M+2H]^{2+}$, la resolución de los picos es mayor. Esto es debido a que en el analizador de masas tipo TOF, la resolución de masas es mejor cuanto menor sea la relación m/z . Las diferencias observadas entre los tres picos de la especie $[M+2H]^{2+}$ afirman las observaciones del ion $[M+H]^+$.

Posteriormente se hicieron las medidas de esta misma proteína con la matriz de interés de este trabajo Fin de Máster, el NPG. Las condiciones que se aplicaron al equipo de espectrometría de masas son las que se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Condiciones de medida del MALDI para SOD con NPG.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2300 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 2500 - 35000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

Se puede observar como las condiciones del láser son más suaves en este caso por lo que los analitos no sufren tanto el proceso de desorción e ionización. Los resultados obtenidos en las medidas de la SOD con la matriz NPG se observan en la figura 14:

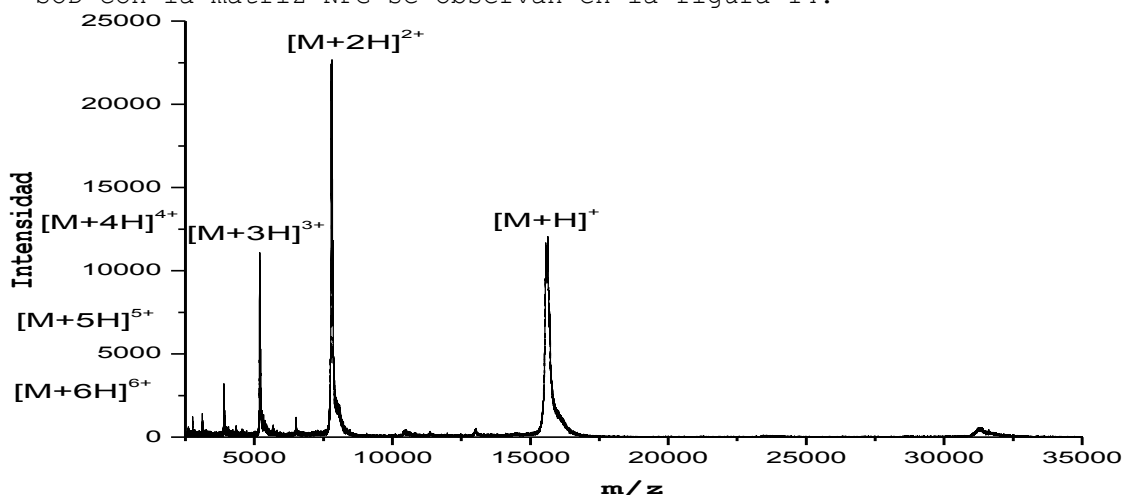


Figura 14. Espectro de MALDI para SOD con NPG

A simple vista en el espectro de masas podemos encontrar dos diferencias fundamentales entre los dos espectros de masas que se están comparando y es que, en el caso de la NPG, la señal correspondiente a la especie $[M+2H]^{2+}$ es más intensa que la señal correspondiente a la especie $[M+H]^+$. Esto es importante ya que, como se explicó con anterioridad en este trabajo, la resolución de los analizadores de masas de tipo tiempo de vuelo aumenta según se disminuye la relación m/z . Si hacemos un zoom a cada una de las señales que se obtienen en el espectro de masas podemos ver lo siguiente:

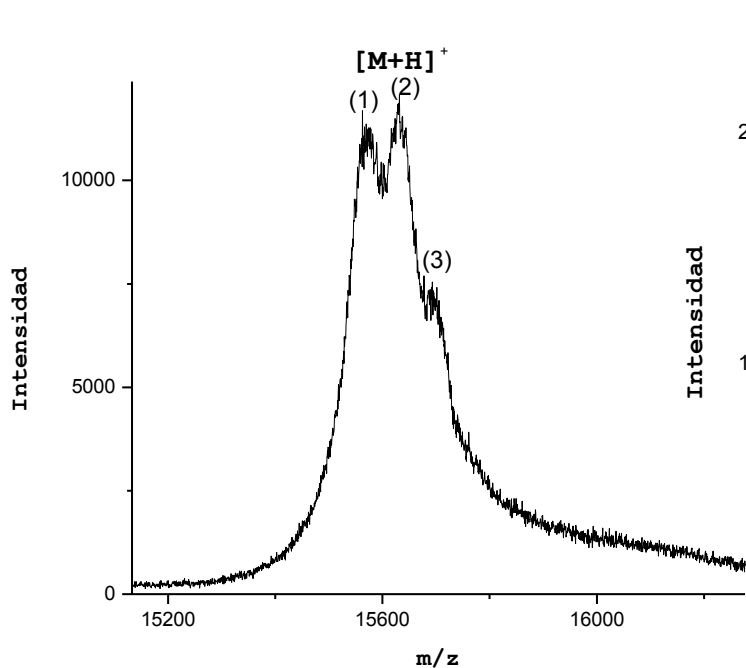


Figura 15. Ampliación de $[M+H]^+$

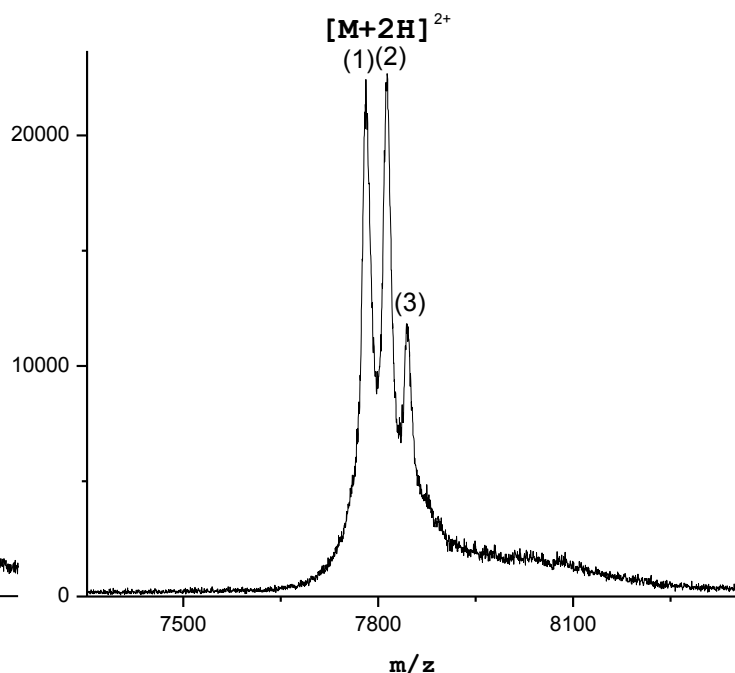


Figura 16. Ampliación de $[M+2H]^{2+}$

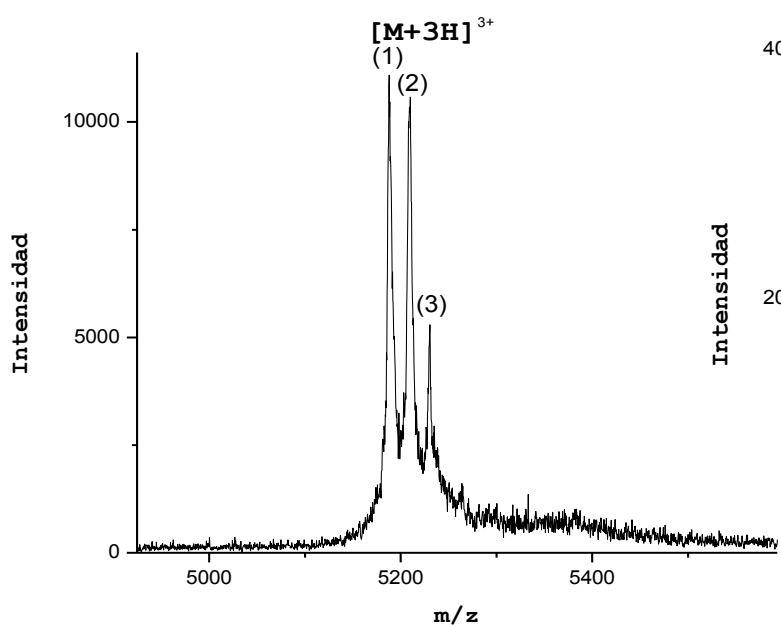


Figura 17. Ampliación de $[M+3H]^{3+}$

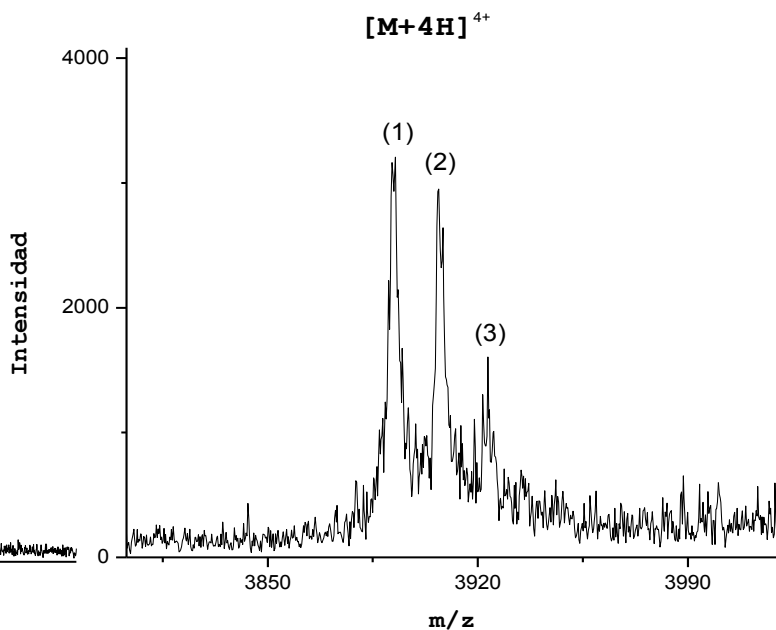


Figura 18. Ampliación de $[M+4H]^{4+}$

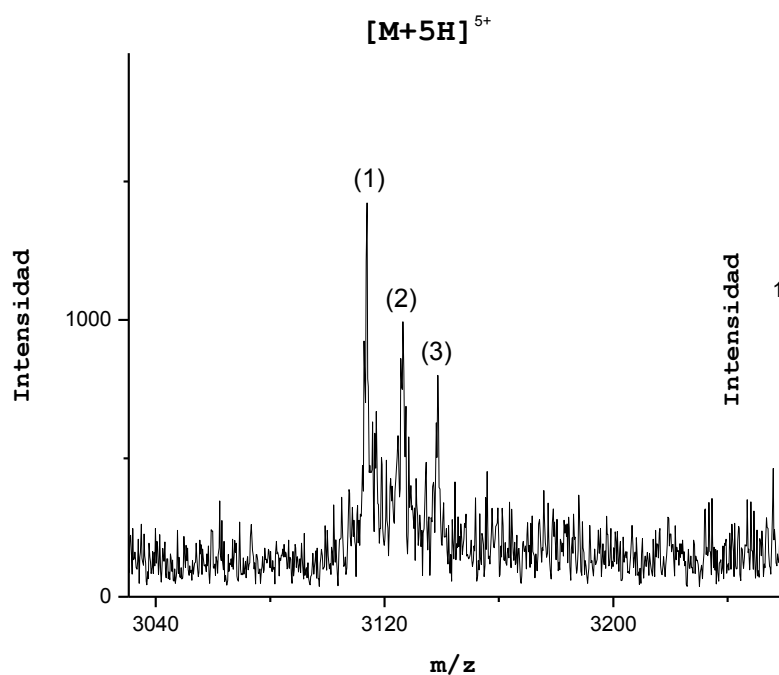


Figura 19. Ampliación de $[M+5H]^{5+}$

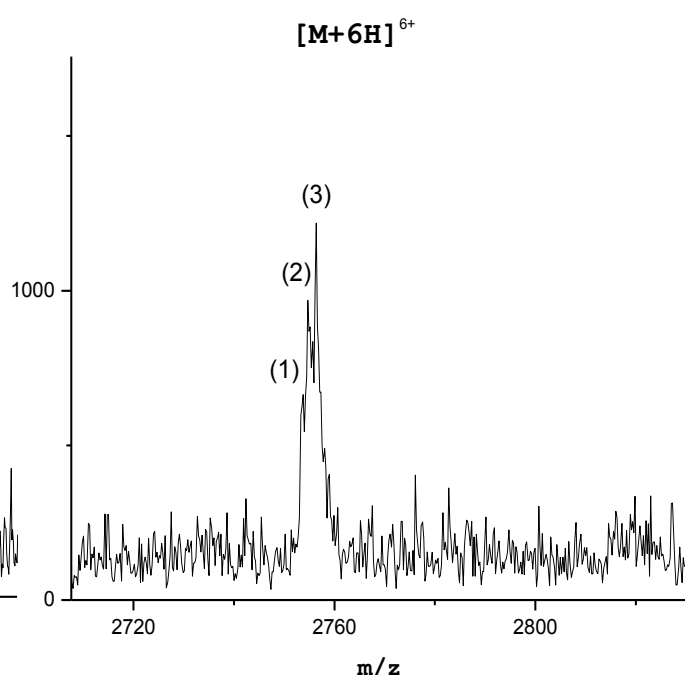


Figura 20. Ampliación de $[M+6H]^{6+}$

En la tabla 5 se observan los valores de m/z en cada uno de las señales obtenidas:

Tabla 5. Resultados de las medidas de MALDI para SOD con NPG.

| SOD (NPG) | | | | | | |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Pico | m/z [Da] z=1 | m/z [Da] z=2 | m/z [Da] z=3 | m/z [Da] z=4 | m/z [Da] z=5 | m/z [Da] z=6 |
| 1 | 15559.68 | 7781.59 | 5187.81 | 3892.77 | 3113.54 | 2753.77 |
| 2 | 15634.78 | 7812.63 | 5210.12 | 3907.22 | 3126.39 | 2754.73 |
| 3 | 15702.69 | 7844.22 | 5230.32 | 3923.63 | 3138.36 | 2756.39 |
| R | - | 389 | 864 | 1074 | 1557 | - |

En la tabla 5, también se observa la resolución en cada carga. Para calcular esto, lo que se hizo fue calcular R con la siguiente fórmula:

$$R = m/\Delta m \text{ donde,}$$

m es la masa del pico y, Δm es la anchura del pico a la semialtura.

Se puede observar el elevado número de cargas que toma el analito con esta matriz. Esto tiene tres ventajas principales:

1. Mayor información analítica en un solo espectro de masas.
2. Mayor facilidad para la realización de experimentos MS/MS, debido a que, las especies con múltiples cargas tienen mayor facilidad de producir fragmentos en las medidas de MS/MS.

3. La señal es más intensa para la especie $[M+2H]^{2+}$ por lo que, como se dijo anteriormente, el TOF tiene mayor resolución. Esto nos facilita el estudio de la pérdida de metales en las metaloproteínas y también facilita la observación de aductos de las proteínas con iones Na^+ y K^+ , que son bastante frecuentes en ambas técnicas de espectrometría de masas molecular.

5.1.1.2) Superóxido Dismutasa con ESI

El espectro de masas obtenido para la SOD se observa en la figura 21:

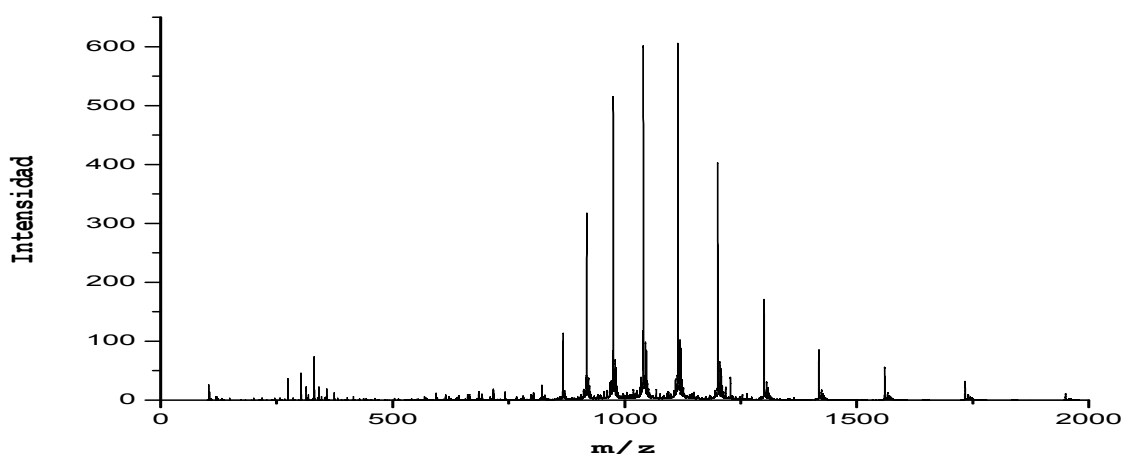


Figura 21. Espectro de masas de ESI para la SOD.

En este caso, no se indican las cargas de las señales del espectro de masas ya que no queda del todo claro si las señales proceden de la proteína intacta o de sus monómeros.

Se realizó la deconvolución de perfiles isotópicos para intentar teorizar el pico de la proteína completa y también la proteína en las dos subunidades que la forman. En las figuras 22 y 23 se observan los resultados obtenidos de las deconvoluciones:

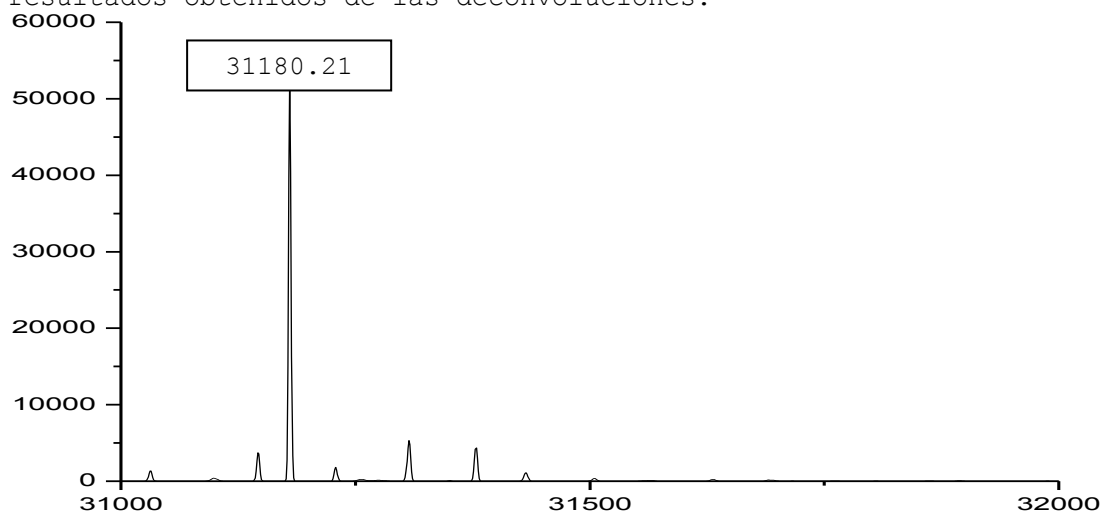


Figura 22. Deconvolución de la proteína intacta.

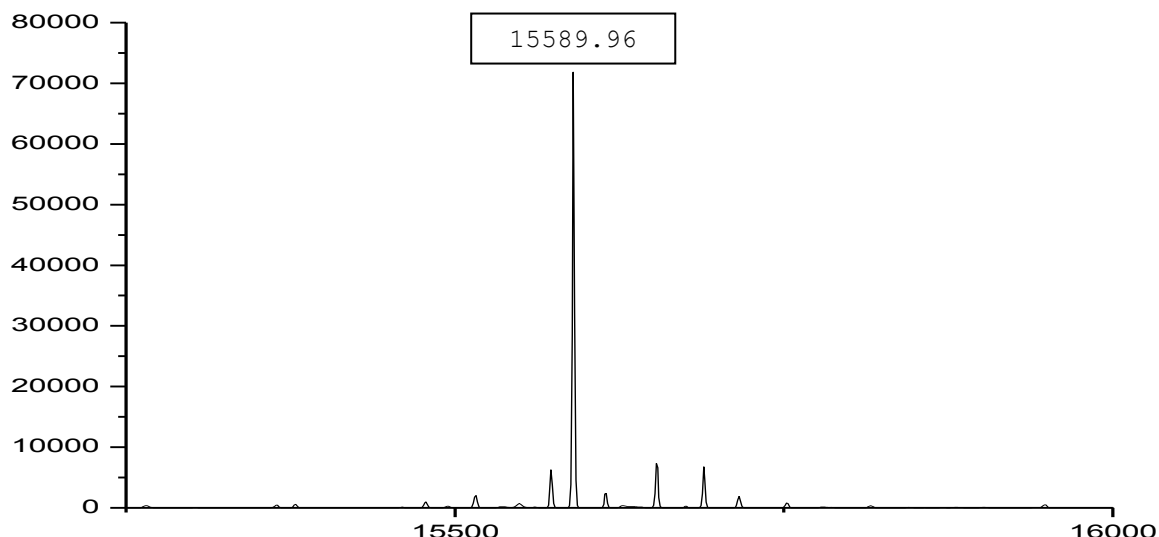


Figura 23. Deconvolución de la proteína en sus dos monómeros.

5.1.2) Insulina

5.1.2.1) Insulina con MALDI.

En el apartado introducción se ha descrito la insulina como una enzima hormonal que está implicada en la regulación de la glucosa en los seres vivos. En este trabajo fin de máster se trabajó con insulina humana (P01308). La insulina humana tiene un peso molecular de 5808 Da. La cadena α tiene un peso molecular de 2383.76 Da y una cadena β con un peso molecular de 3429.90 Da.

Como se ha descrito con anterioridad, en las medidas de compuestos con un peso molecular por debajo de 10 kDa, típicamente se utiliza como matriz de MALDI el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Por lo tanto, en este caso la comparación se realiza entre el CHCA y la matriz de interés NPG.

Las condiciones de trabajo de la insulina con CHCA como matriz se recogen en la tabla 6:

Tabla 6. Condiciones de medida del MALDI para insulina con CHCA

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|---------------|
| Modo | Reflectrón |
| LASER | 2400 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 700 - 6000 Da |
| Voltaje de aceleración | 20000 V |

Los resultados obtenidos para la insulina con CHCA se observan en la figura 24:

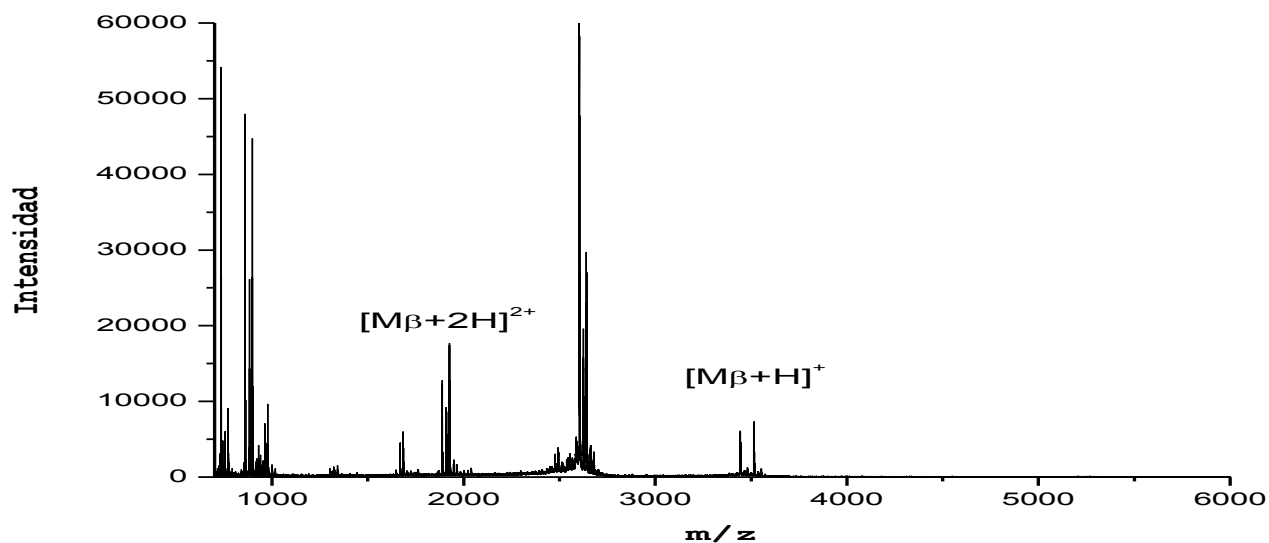


Figura 24. Espectro de MALDI para insulina con CHCA.

Una de las primeras curiosidades que se observan es que a la masa correspondiente al ion $[M+H]^+$ no se ve ninguna señal. Esto es debido a que en el proceso de desorción e ionización, el analito se rompe en las dos cadenas diferentes que tiene. Tampoco se observa señal en torno a 3000 Da que sería la zona en que se vería el ion $[M+2H]^{2+}$. Esto confirma la observación de que la insulina con CHCA como matriz rompe en sus dos cadenas siempre que se mide con MALDI. Lo que si se observa con muy buena intensidad es la cadena β que tiene esta hormona. También se observa la cadena β en forma de doble cargado. El resto de señales no destacadas, se llegó a la conclusión de que son contaminaciones que aparecen en el espectro. Cabe reseñar que no aparece la señal correspondiente a la cadena α .

Las medidas de la insulina con NPG como matriz requirieron de las siguientes condiciones de trabajo, representadas en la tabla 7:

Tabla 7. Condiciones de MALDI para la medida de insulina con NPG

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|----------------|
| Modo | Reflectrón |
| LASER | 2100 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 1000 - 7000 Da |
| Voltaje de aceleración | 20000 V |

Los resultados obtenidos se representan en la figura 25:

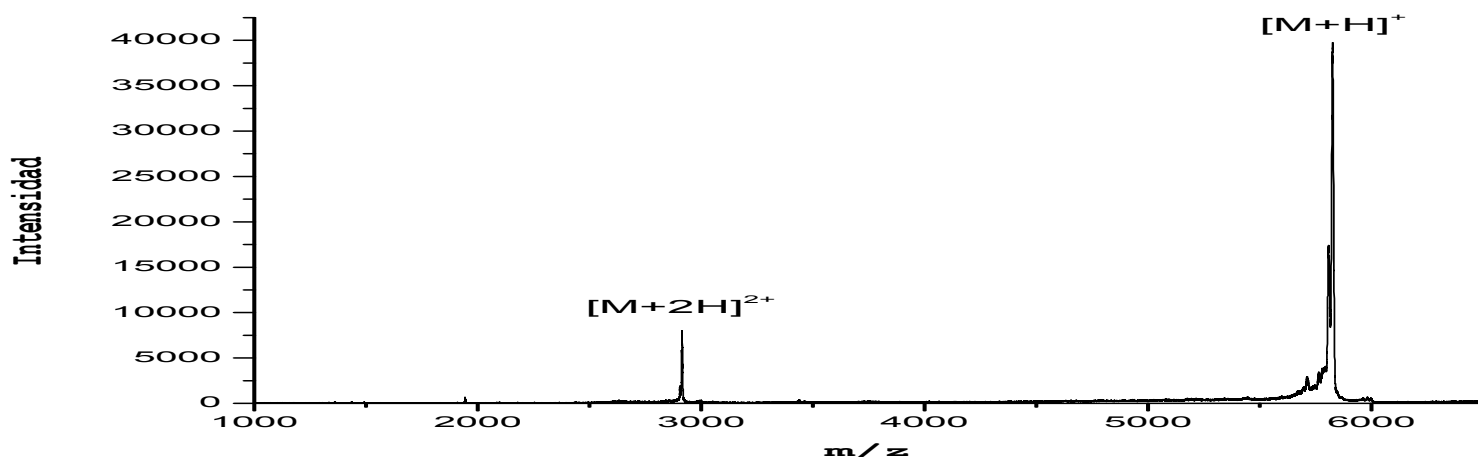


Figura 25. Espectro de MALDI para insulina con NPG

A diferencia del caso del NPG como matriz, se puede ver con claridad la señal de la proteína intacta, tanto como de $[M+H]^+$ como de $[M+2H]^{2+}$. Esto es debido a que, con la matriz NPG, las condiciones del láser son mucho menos energéticas por lo que en el proceso de desorción e ionización no se rompen los enlaces por puentes disulfuro con los que se unen ambas cadenas entre sí. Debido a esto, el espectro de masas de insulina con NPG es mucho más limpio, con menos interferentes por lo que, la identificación de esta proteína con NPG se hace mucho más fácilmente.

5.1.2.2) Insulina con ESI.

El espectro de masas para la insulina se observa en la figura 26:

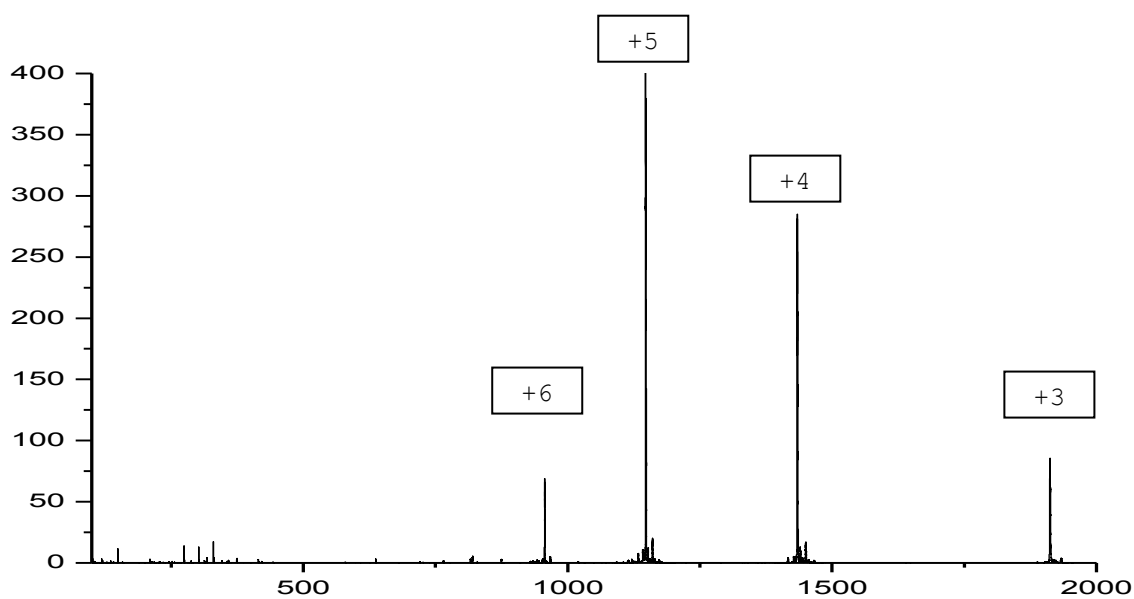


Figura 26. Espectro de masas de ESI para insulina

En todos los casos, la deconvolución se hace con el pico del espectro de masas con más señal. En este caso, la mayor señal se trata del ión $[M+5H]^{5+}$ de la insulina. Tras la deconvolución se obtuvieron los resultados que se observan en la figura 27:

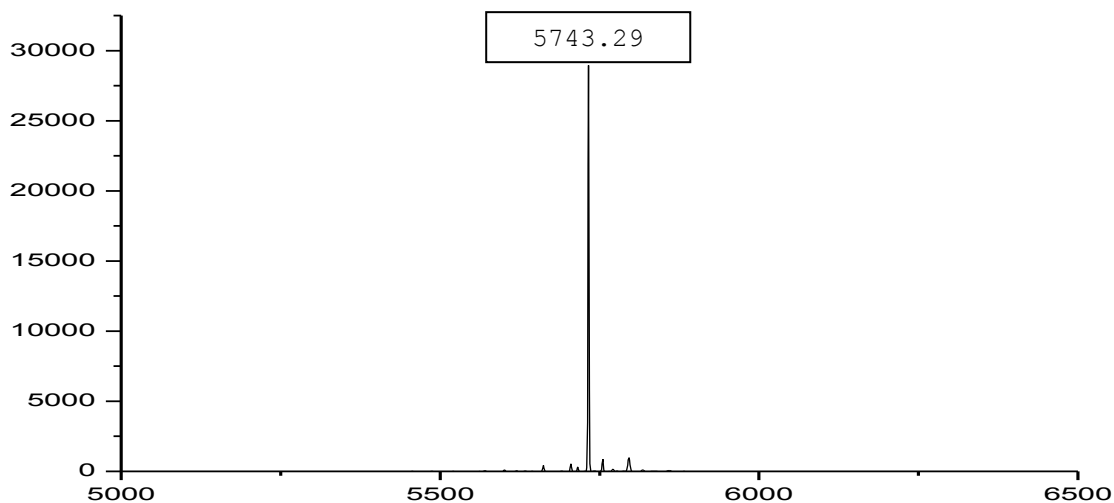


Figura 27. Deconvolución para la insulina.

5.1.3) Citocromo C.

5.1.3.1) Citocromo C con MALDI

El citocromo C (P99999) es una proteína pequeña con un peso molecular de 11749 Da. Por esta característica de proteína pequeña y cercana al límite que se explicó con anterioridad para utilizar CHCA o SA se decidió trabajar con ambas matrices además de utilizar la matriz de interés en este trabajo.

Las condiciones de trabajo con la matriz CHCA en estas medidas están recogidas en la tabla 8:

Tabla 8. Condiciones del MALDI para citocromo C con CHCA.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2400 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 2500 - 15000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

En la figura 28 se exponen los resultados de las medidas hechas con CHCA en las siguientes condiciones:

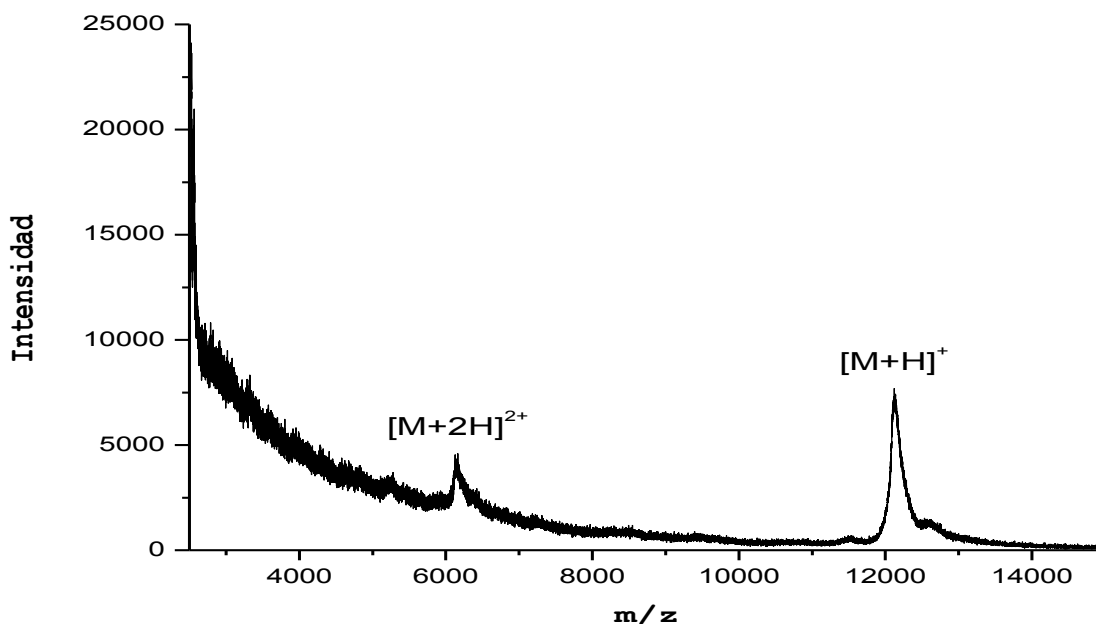


Figura 28. Espectro de MALDI para citocromo C con CHCA.

Cabe destacar que los resultados obtenidos con CHCA para la proteína citocromo C no son nada satisfactorios. Se observa señal para la especie $[M+H]^+$ y la especie $[M+2H]^{2+}$, pero con una señal muy pequeña así como mucho ruido en el espectro de masas. Debido a esto, se utilizó también la matriz SA para la misma proteína.

Para el SA se utilizaron condiciones de medida recogidas en la tabla 9:

Tabla 9. Condiciones del MALDI para citocromo C con SA.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2600 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 4000 - 15000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

Los resultados de las medidas del MALDI del citocromo C con SA se representan la figura 29:

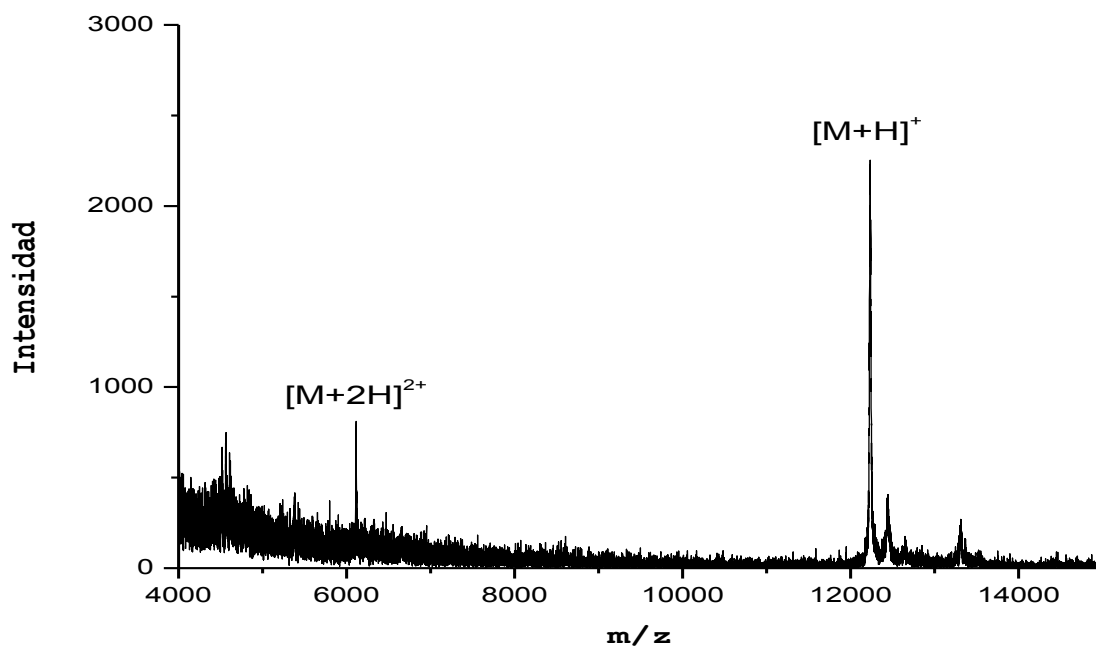


Figura 29. Espectro de MALDI para citocromo C con SA

Cabe destacar de este espectro de masas como se observan los picos correspondientes a $[M+H]^+$ y a $[M+2H]^{2+}$. Las señales y el espectro son más limpios y con una mejor resolución que en el caso del CHCA, por lo que es correcto que esta matriz sea la adecuada en las medidas de MALDI del citocromo C.

El siguiente paso con la proteína citocromo C es el estudio de esta con la matriz de interés en este trabajo, NPG. Las condiciones de medida se recogen en la tabla 10:

Tabla 10. Condiciones del MALDI para citocromo C con NPG.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2100 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 2500 - 15000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

En las condiciones de medida se puede observar, al igual que con el resto de proteínas como las medidas con NPG se realizan en condiciones más suaves, lo que facilita las medidas de proteínas intactas. Los resultados que se obtuvieron para el citocromo C con NPG están representados en la figura 30:

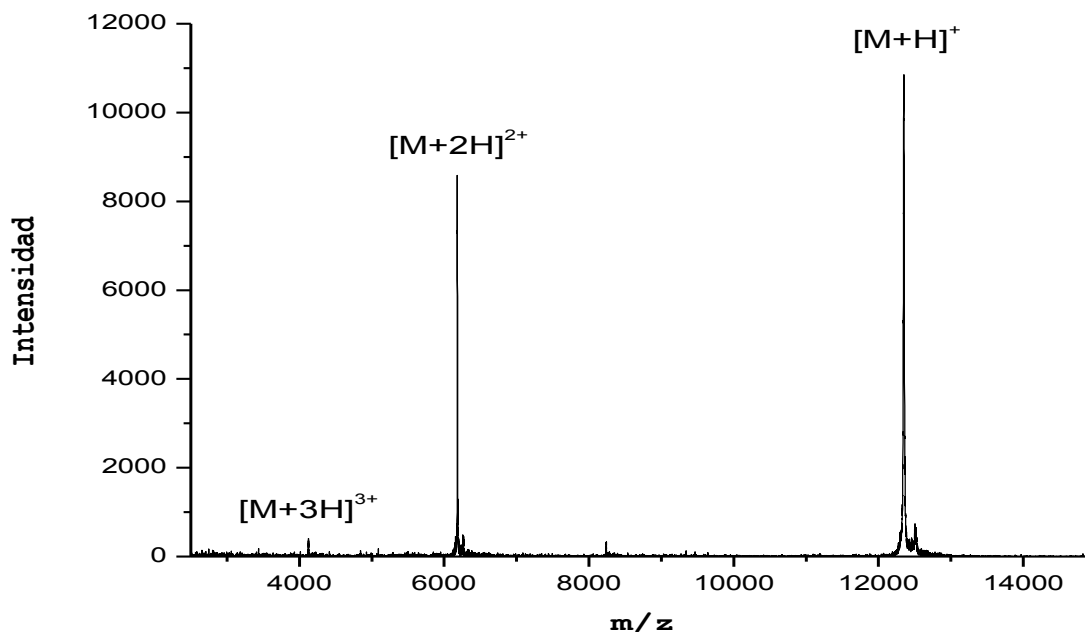


Figura 30. Espectro de masas de citocromo C con NPG.

Como en todos los ejemplos estudiados anteriormente, en este caso, la señal de $[M+2H]^{2+}$ también aumenta mucho. En general, el espectro de masas es mucho más limpio que en los casos anteriores. La interacción del NPG con la proteína es mucho menor que en el caso de las medidas con SA por lo que, se podría decir que el NPG es una matriz más adecuada para las medidas de esta proteína.

En las figuras 31, 32 y 33 se observa la ampliación de las señales para las tres cargas que se detectaron en el espectro de masas:

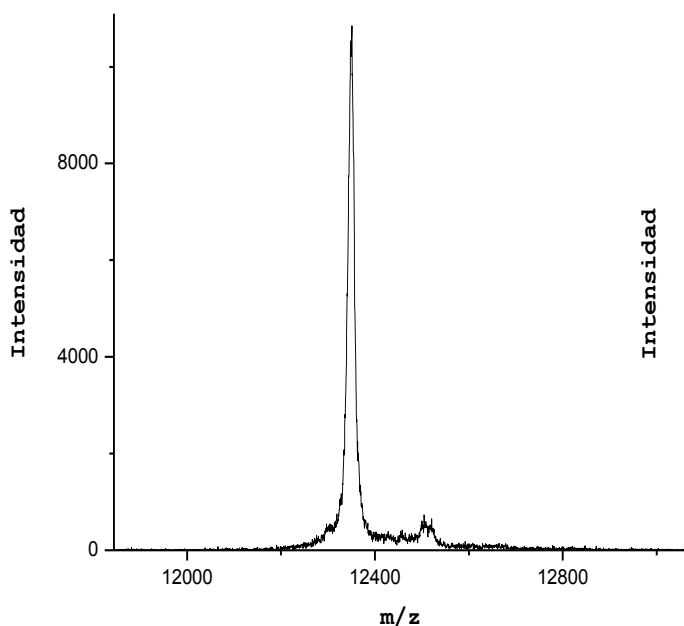


Figura 31. Ampliación de $[M+H]^+$

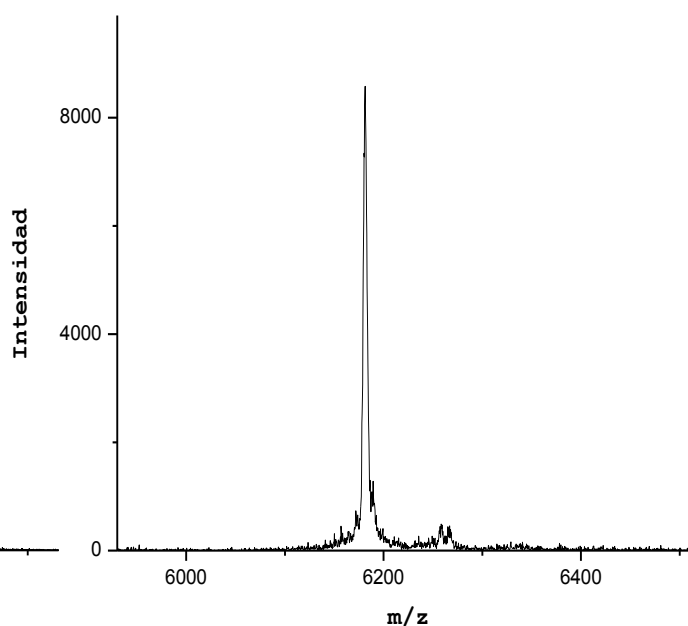


Figura 32. Ampliación de $[M+2H]^{2+}$

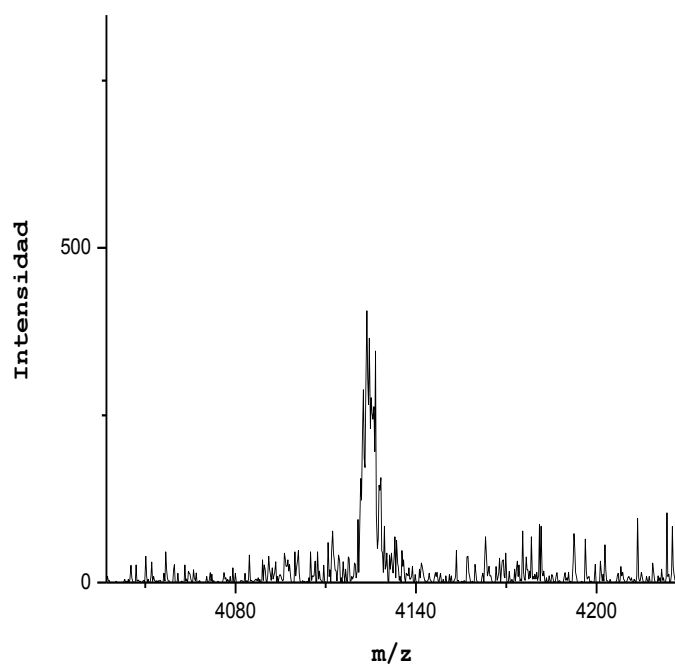


Figura 33. Ampliación de $[M+3H]^{3+}$

En estas ampliaciones de las zonas de interés se puede ver con claridad como la interacción entre matriz y proteína en el caso del NPG es mucho menor que en el estudio con el SA. Es muy destacable, el poco ruido de fondo que se obtiene con el NPG en todos los casos. En el estudio del citocromo C es mucho más importante que en el resto de proteínas esta disminución del ruido de fondo.

5.1.3.2) Citocromo C con ESI.

El espectro de masas para el citocromo C es el que se observa en la figura 34:

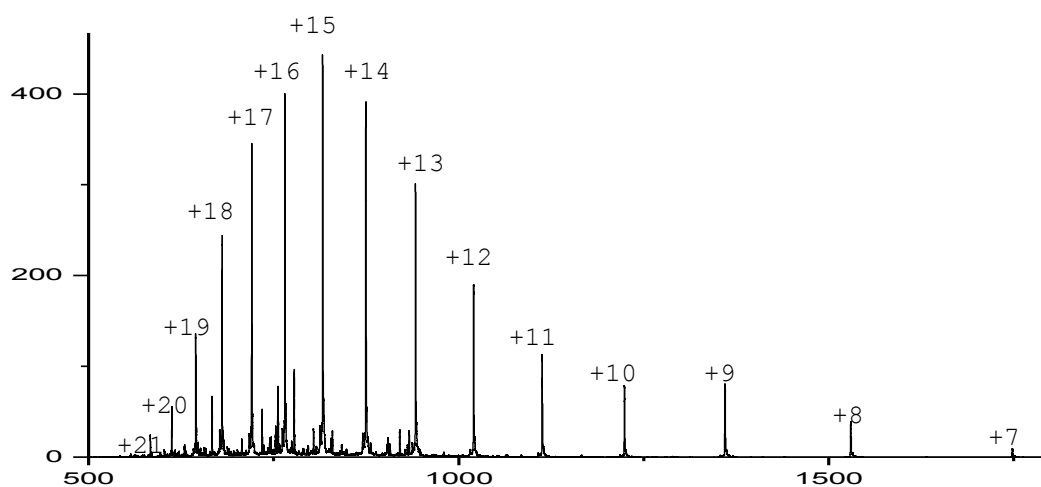


Figura 34. Espectro de masas de citocromo C con ESI

Este es un buen ejemplo en el que se puede observar una de las mayores características de los equipos de electrospray, la gran cantidad de cargas que se producen en los analitos. Como en otros casos, se utiliza el ión de mayor señal para hacer la deconvolución. En este caso es el de carga +15 con una $m/z=815.36$ Da. Los resultados de la deconvolución se observan en la figura 35:

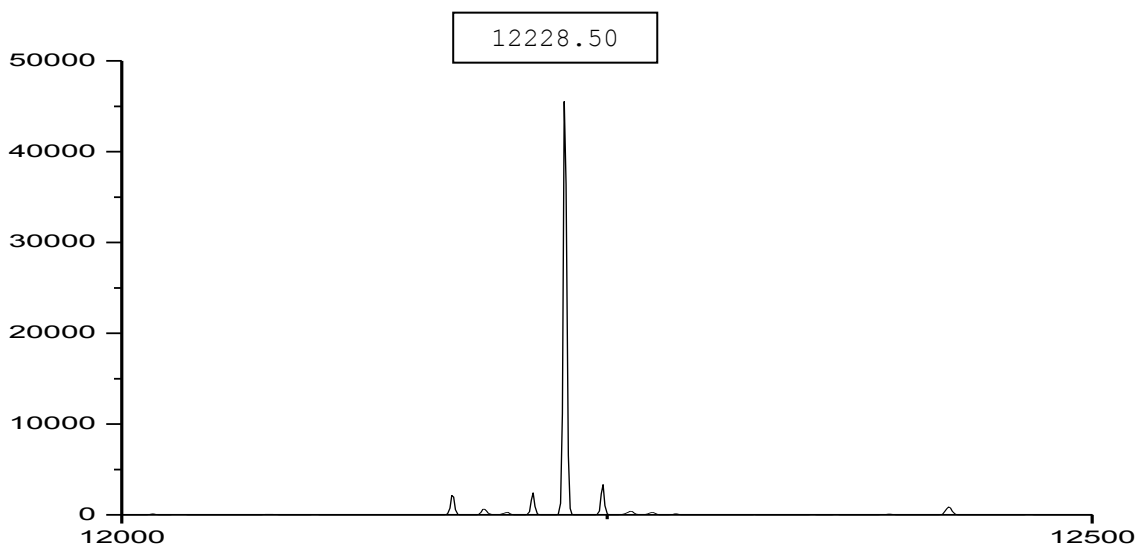


Figura 35. Deconvolución para el citocromo C.

5.1.4) Hemoglobina.

5.1.4.1) Hemoglobina con MALDI

Como se ha descrito en la introducción, la hemoglobina es una proteína multimérica. Tiene dos cadenas α (P69905) con un peso molecular de cada una de 15258 Da y dos cadenas β (P68871) con un peso molecular de cada una de 15998 Da. Su peso molecular total es de 62512 Da. Esta es la proteína mayor que se utilizó en todo este trabajo. Por ello, solo se emplearon SA y NPG como matrices.

Como viene siendo habitual en la organización de este trabajo, primero se muestran los resultados con la matriz SA. Las condiciones de trabajo fueron las recogidas en la tabla 11:

Tabla 11. Condiciones del MALDI para hemoglobina con SA.

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2700 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 5000 - 20000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

Los resultados se observan en la figura 36:

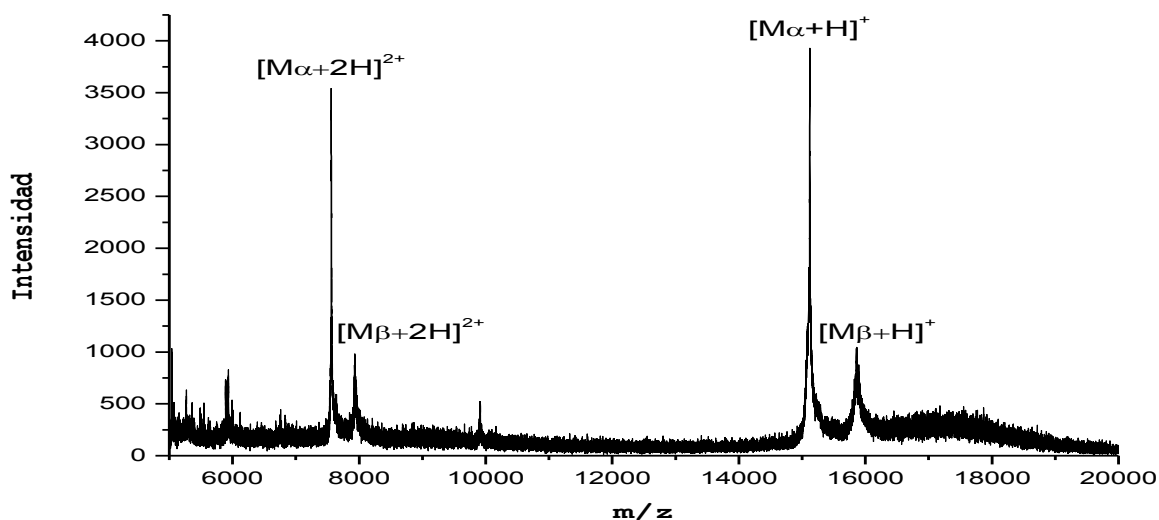


Figura 36. Espectro de MALDI de hemoglobina con SA.

La hemoglobina es una proteína que en MALDI nunca se puede ver entera. Siempre que se hacen estudios de ella, se observan las señales correspondientes a las cadenas [25].

En este caso, la energía de láser es la más alta utilizada en todo el trabajo realizado.

La cadena β es la de mayor peso molecular mientras que, la cadena α es la más pequeña.

Posteriormente, se exponen los resultados obtenidos en el trabajo realizado con la hemoglobina utilizando NPG como matriz. Las condiciones de trabajo se encuentran recogidas en la tabla 12:

Tabla 12. Condiciones del MALDI para hemoglobina con NPG

| Tipo de escaneo | Positivo |
|------------------------|-----------------|
| Modo | Lineal |
| LASER | 2100 V |
| Disparos | 150 |
| Rango de escaneo | 5000 - 20000 Da |
| Voltaje de aceleración | 25000 V |

De la tabla 12, cabe destacar como la diferencia de energía de láser empleada entre el SA y el NPG es muy grande. Es la mayor diferencia de laser de todas las medidas hechas en este trabajo. Los resultados obtenidos con el NPG se observan en la figura 37:

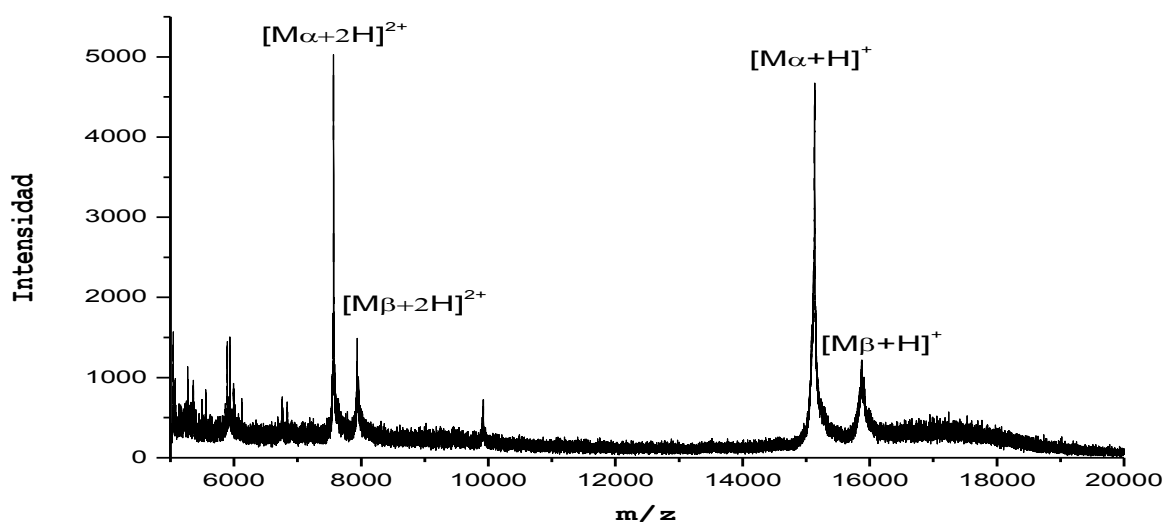


Figura 37. Espectro de MALDI de hemoglobina con NPG.

Es de destacar que, a diferencia del resto de ejemplos, en el caso de la hemoglobina, los resultados no son tan satisfactorios. La única mejora que se puede destacar en este caso es que, la intensidad del láser es mucho menor por lo que, las condiciones de medidas son mucho más suaves. La hemoglobina es una proteína que no presenta buenos resultados, en general, en las medidas por MALDI-TOF-MS.

5.1.4.2) Hemoglobina con ESI.

En la figura 38, se observa el espectro de masas de la hemoglobina en medidas por ESI:

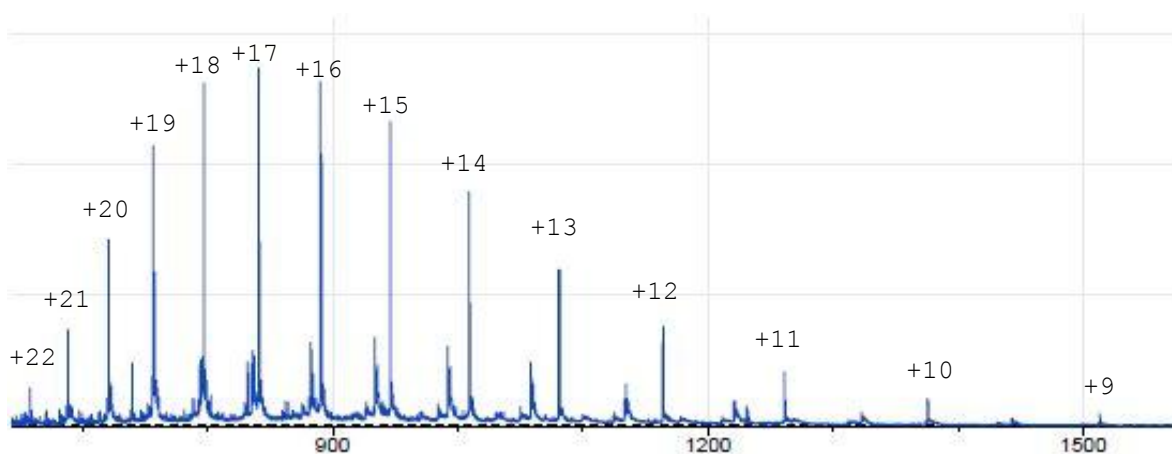


Figura 38. Espectro de masas de hemoglobina con ESI

En este caso, para realizar la deconvolución se utiliza la carga +17 que es la de mayor intensidad. Los resultados se observan en la figura 39:

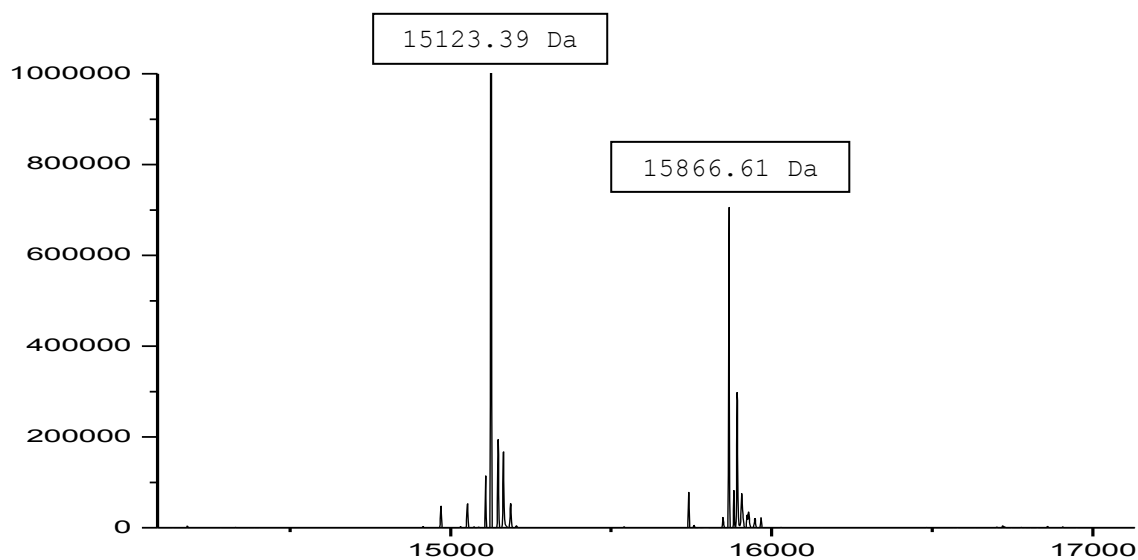


Figura 39. Deconvolución de hemoglobina.

A diferencia del MALDI, con ESI se observan las dos cadenas de la hemoglobina. La hemoglobina intacta no produce ninguna solución al intentar hacer la deconvolución en ese rango de masa.

En este apartado de resultados se trabajaron los resultados obtenidos en las medidas con las dos técnicas de análisis molecular de mayor potencial en el campo de la proteómica. Se utilizó una novedosa matriz de MALDI, observándose buenos resultados con ella, mejorando en muchas ocasiones los resultados que se obtienen con las matrices típicas de

MALDI. La técnica de ESI se utilizó como un complemento a la identificación realizada por MALDI.

6. Conclusiones

Como conclusiones a este trabajo Fin de Máster encaminado a la utilización de una nueva matriz de MALDI (NPG) y la comparación de los resultados obtenidos con esta nueva matriz con los que se obtienen usando las matrices más comunes utilizadas en MALDI para proteínas, se puede decir:

1. La nueva matriz de MALDI proporcionó resultados satisfactorios en todas las proteínas estudiadas, independientemente del peso molecular de estas. En las matrices comúnmente utilizadas, el peso molecular es un parámetro muy importante en el momento de elegir la matriz de MALDI.
2. El uso de la nueva matriz permite utilizar menos energía de radiación láser, lo que permite y/o facilita el estudio de proteínas intactas.

Esta nueva matriz que genera iones con múltiples cargas en proteínas, produce multitud de aplicaciones analíticas. En un futuro, sería de interés realizar experimentos de MS/MS con el equipo de MALDI-TOF-MS y poder comprobar esta presumible capacidad de la matriz NPG.

7. *Bibliografía.*

[Bibliografía]

- [1] web.educastur.princast.es/proyectos/biogeo_pv/2bch/bl_bioquimica/tl15_proteinas/información.html
- [2] laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/enlace_peptidica.html.
- [3] J. M. Teijón Rivera, *Bioquímica estructural. Conceptos y test*, Tebar, Albacete, 2001.
- [4] A. L. Lehninger, *Principios de Bioquímica*, Omega, Barcelona, 2007.
- [5] J. D. Rawn, *Bioquímica*, Mc Graw Hill, EEUU, 1989.
- [6] www.ehu.es/biomoleculas/proteinas/prot44.htm.
- [7] www.proteinas.org.es/funciones-de-las-proteinas.
- [8] M.J. Stump, R.C. Fleming, W.H. Gong, A.J. Jaber, J.J. Jones, C.W. Surber, C.L. Wilkins, *Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry*, *Appl. Spectrosc. Rev.* 2002, 37(3), 275 - 303.
- [9] R. Knochenmuss, *Ion formation mechanism in UV-MALDI*, *Analyst* 2006, 131, 966-986.
- [10] R. Aebersold, M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*, *Nature* 2003, 422, 198-207.
- [11] P.R. Graves, T.A. Haystead, *Molecular biologist's guide to proteomics*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002, 66(1), 39-63.
- [12] M. Karas, R. Krüger, *Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism*, *Chem. Rev.* 2003, 103, 427-439.
- [13] R. Zenobi, R. Knochenmuss, *Ion formation in MALDI mass spectrometry*, *Mass Spectrom. Rev.* 1998, 17, 337-366.
- [14] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, K.F. Ng, M.W.M. Suen, H.L. Tai, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*, *Clin. Biochem. Rev.* 2003, 24(1), 3-12.
- [15] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Electrospray ionization principles and practice*, *Mass Spectrom. Rev.* 1990, 9(1), 37-70.

- [16]W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai, Y. Wang, Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry, *Biochem. J.* 2001, 355, 545-561.
- [17]S.J. Gaskell, *Electrospray: principles and practice*, *J. Mass. Spectrom.* 1997, 32, 677-688.
- [18]R.B. Cole, *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- [19]S.A. Carr, R.S. Annan, *Current protocols in Molecular Biology. Analysis of Proteins. Chapter 10: Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
- [20]S. J. Gaskell, *Electrospray: Principles and Practice*, *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 677-688.
- [21]M. Thevis, A. Thomas, W. Schänzer, *Mass Spectrometric Detection of Insulins and their Degradation Products in Sports Drug Testing*, *Mass Spectrom. Rev.* 2008, 27, 35-50.
- [22]D. J. Kutscher, J. Bettmer, *Absolute and relative protein quantification with the use of isotopically labeled p-hydroxymercuribenzoic acid and complementary MALDI-MS and ICPMS detection*, *Anal. Chem.* 2009, 81, 9172-9177.
- [23]Y.P. Ow, D.R. Green, Z. Hao, T.W. Mak, *Cytochrome c: functions beyond respiration*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008, 9(7), 532-42.
- [24]S. Trimpin, Y. Ren, B. Wang, C. B. Lietz, A. L. Richards, D. D. Marshall, E. D. Marshall, E. D. Inutan, *Extending the Laserspray Ionization Concept to Produce Highly Charged Ions at High Vacuum on a Time of Flight Mass Analyzer*, *Anal. Chem.* 2011, 83, 5469-5475.
- [25]E. del Castillo, M. Montes-Bayon, E. Añon, A. Sanz-Medel, *Quantitative targeted biomarker assay for glycated haemoglobin by multidimensional LC using mass spectrometric detection.*, *J. Proteom.* 2011, 74, 35-43.