

# Detecció de biomarcadors de la transferrina de ratolí pel diagnòstic de l'artritis reumatoide per $\mu$ ZIC-HILIC-MS

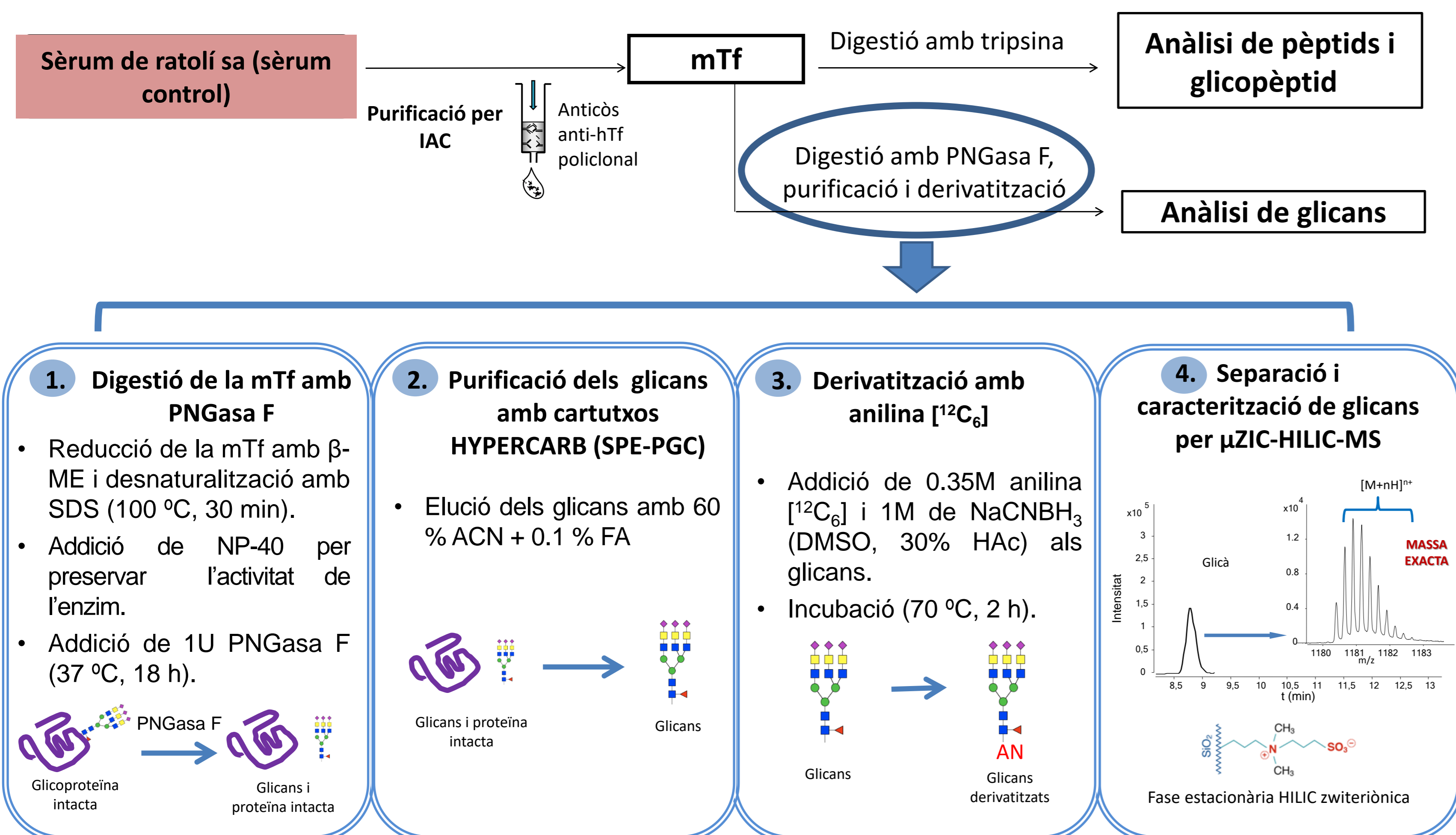
## 1. Introducció

La glicosilació és una modificació co- i post-translacional molt freqüent a les proteïnes.<sup>1</sup> Les estructures dels O- i els N-glicans es poden veure alterades en diverses malalties com són la inflamació crònica i el càncer.<sup>2</sup>

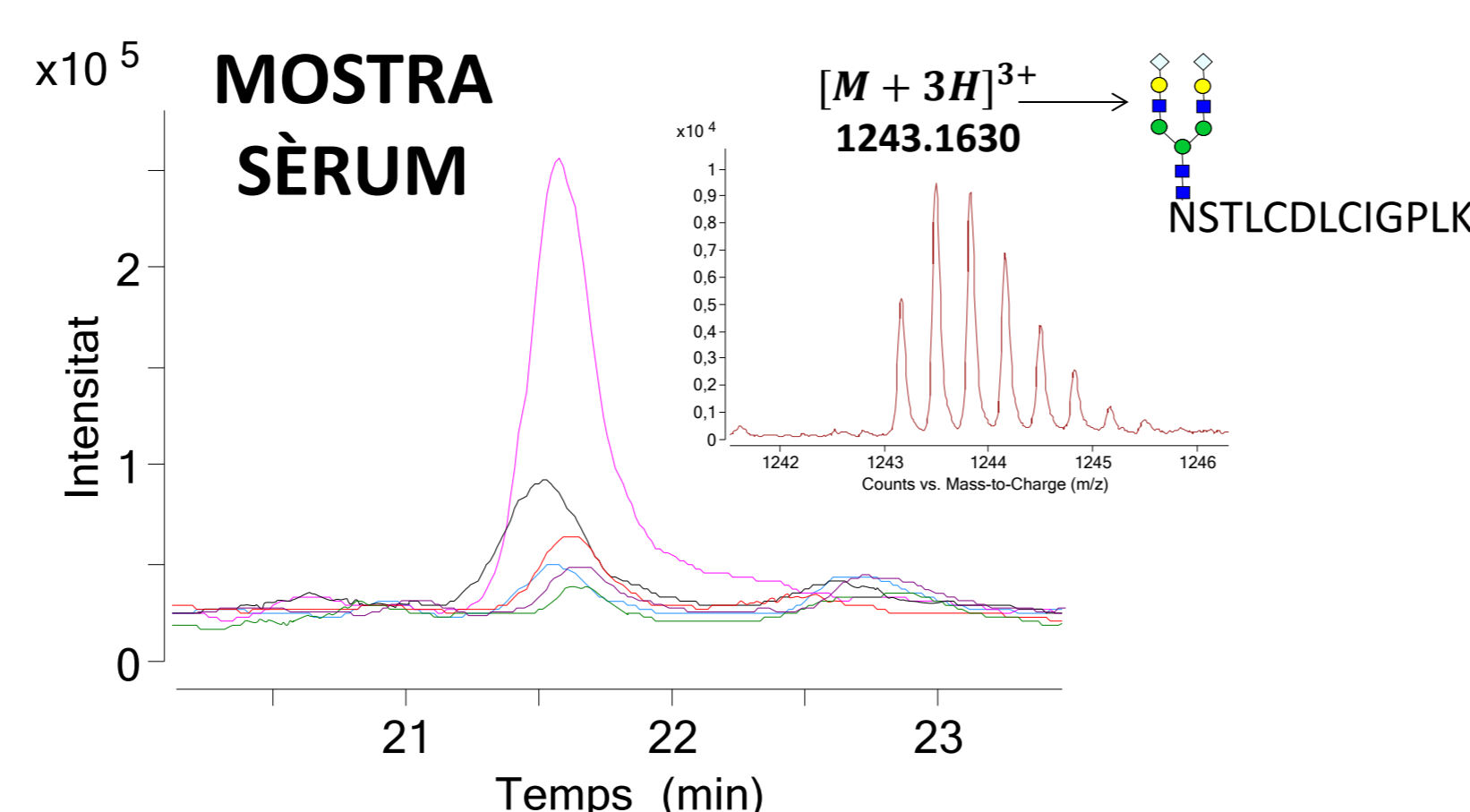
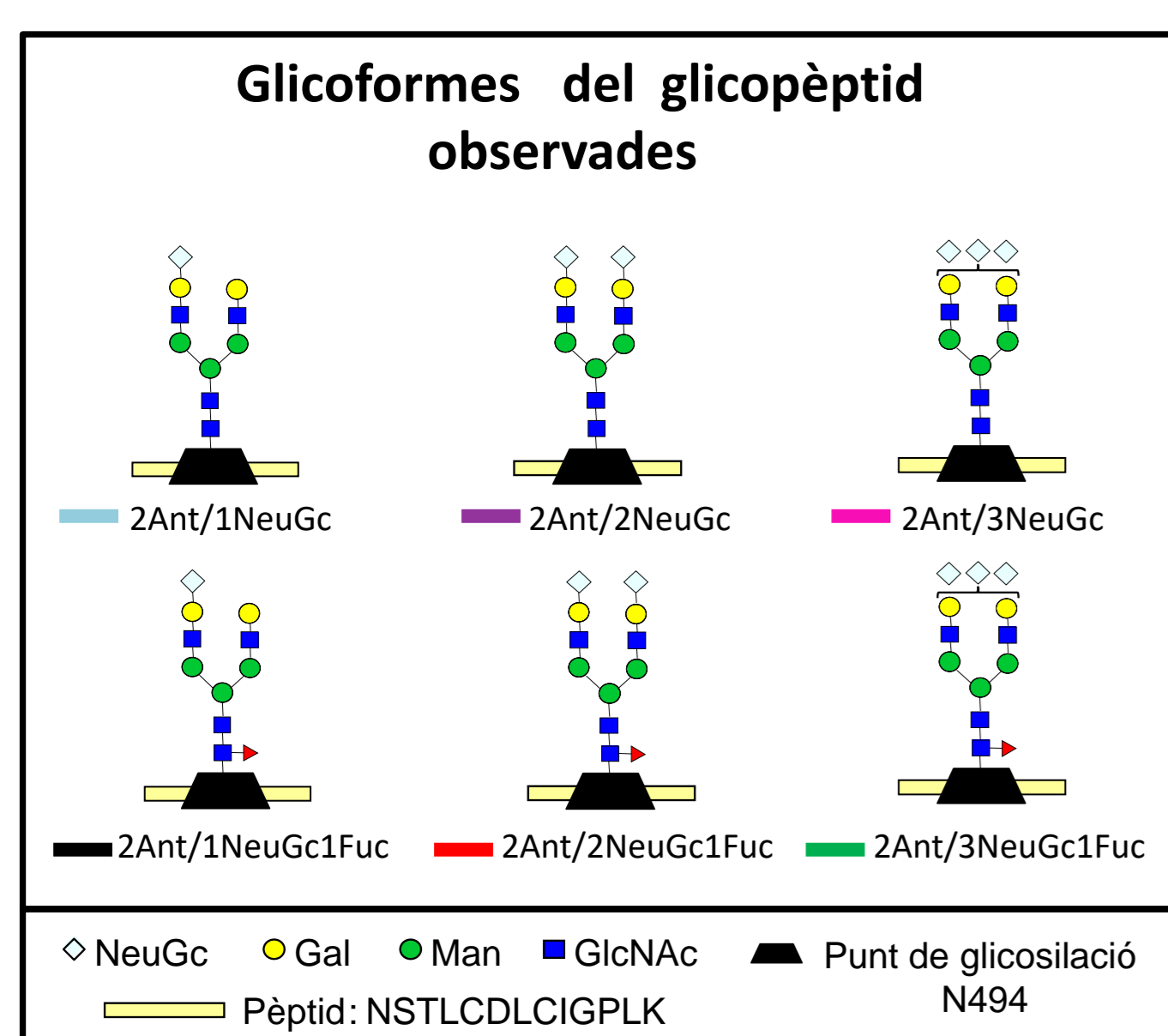
En el present treball, s'ha aplicat una metodologia analítica per separar i identificar els glicans de la transferrina de ratolí (mTf) en mostres patró mitjançant cromatografia de líquids capil·lar d'interacció hidrofílica zwitteriònica acoblada a l'espectrometria de masses ( $\mu$ ZIC-HILIC-MS).<sup>[3,4]</sup> Posteriorment, s'ha purificat la mTf de diverses mostres de sèrum control per cromatografia d'immunoafinitat (IAC), i s'ha caracteritzat la seva glicosilació per  $\mu$ ZIC-HILIC-MS, per tal d'establir un perfil de glicosilació sa, que sigui representatiu i que permeti identificar en un futur possibles alteracions de la mTf causades per una determinada patologia. D'altra banda, amb l'objectiu d'assegurar que la columna de IAC permet aïllar la mTf de mostres de sèrum, s'ha realitzat l'anàlisi per  $\mu$ LC-MS<sup>[5]</sup> dels pèptids i glicopèptid triptics de la mTf en els sèrums control, prèviament purificats per IAC, obtenint una cobertura de la seqüència peptídica del 83%.

L'objectiu final d'aquest treball és analitzar els glicans de la mTf en mostres de sèrum de ratolins sans i amb artritis reumatoïde (RA) i quantificar-los de manera relativa mitjançant l'estratègia GRIL (*Glycan Reductive Isotope Labeling*) amb anilina [<sup>12</sup>C<sub>6</sub>]/ [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>],<sup>[6]</sup> amb la finalitat de detectar possibles alteracions en la glicosilació d'aquesta proteïna en presència de RA i cercar així biomarcadors potencials d'aquesta malaltia inflamatòria.

## 2. Procediment experimental



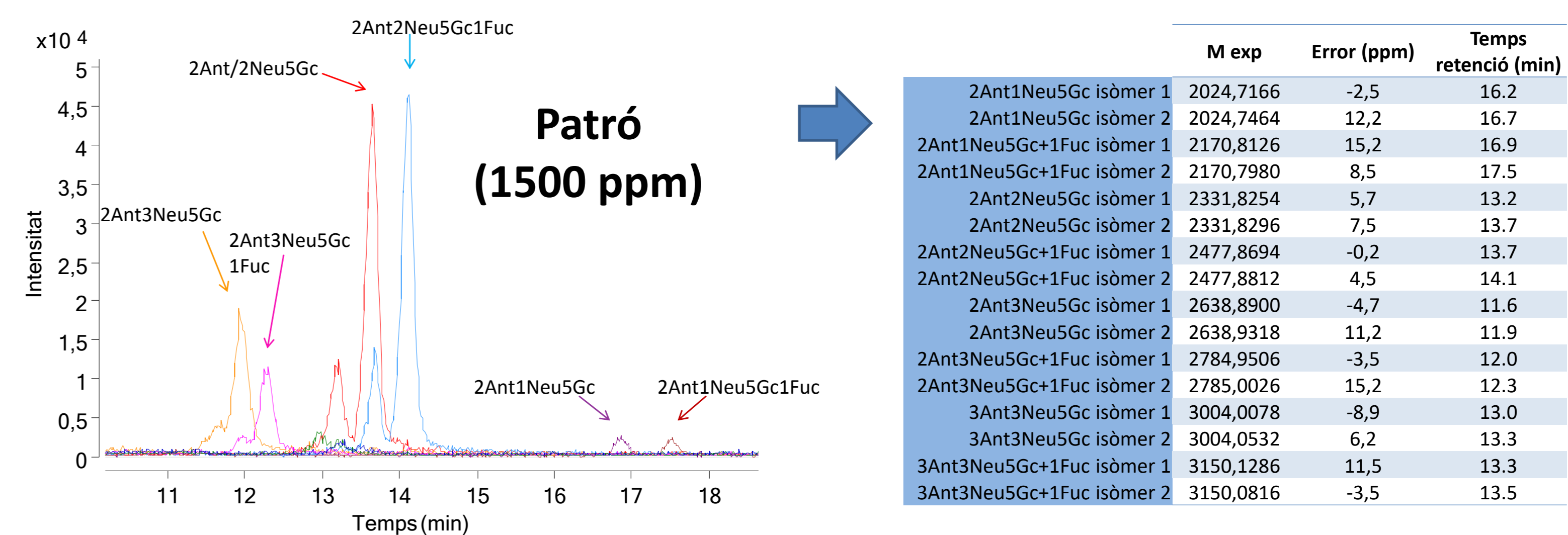
## 3. Anàlisi dels pèptids i el glicopèptid de la mTf



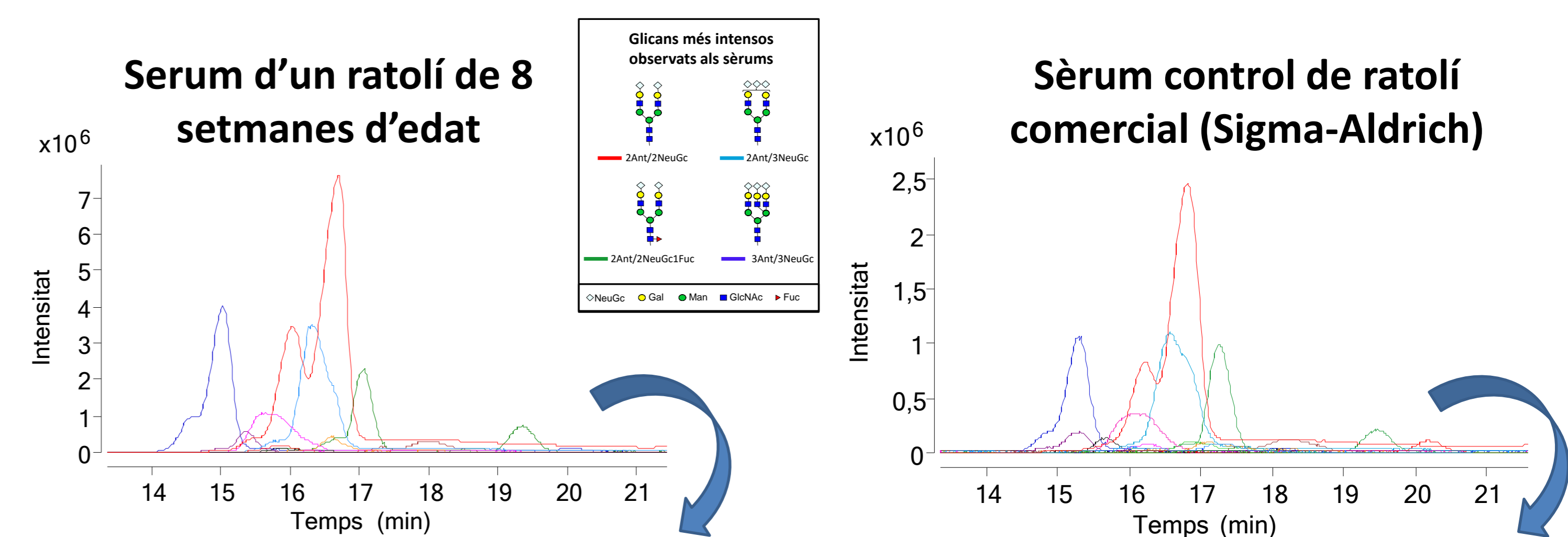
S'han identificat 6 glicoformes del glicopèptid de la mTf i s'ha obtingut una cobertura de la seqüència peptídica del 83%.

✓ La columna IAC permet aïllar la mTf de mostres de sèrum

## 4. Anàlisi dels glicans de la mTf



✓ El mètode permet una bona separació cromatogràfica i una identificació idònia dels glicans de la mTf i dels seus corresponents isòmers.



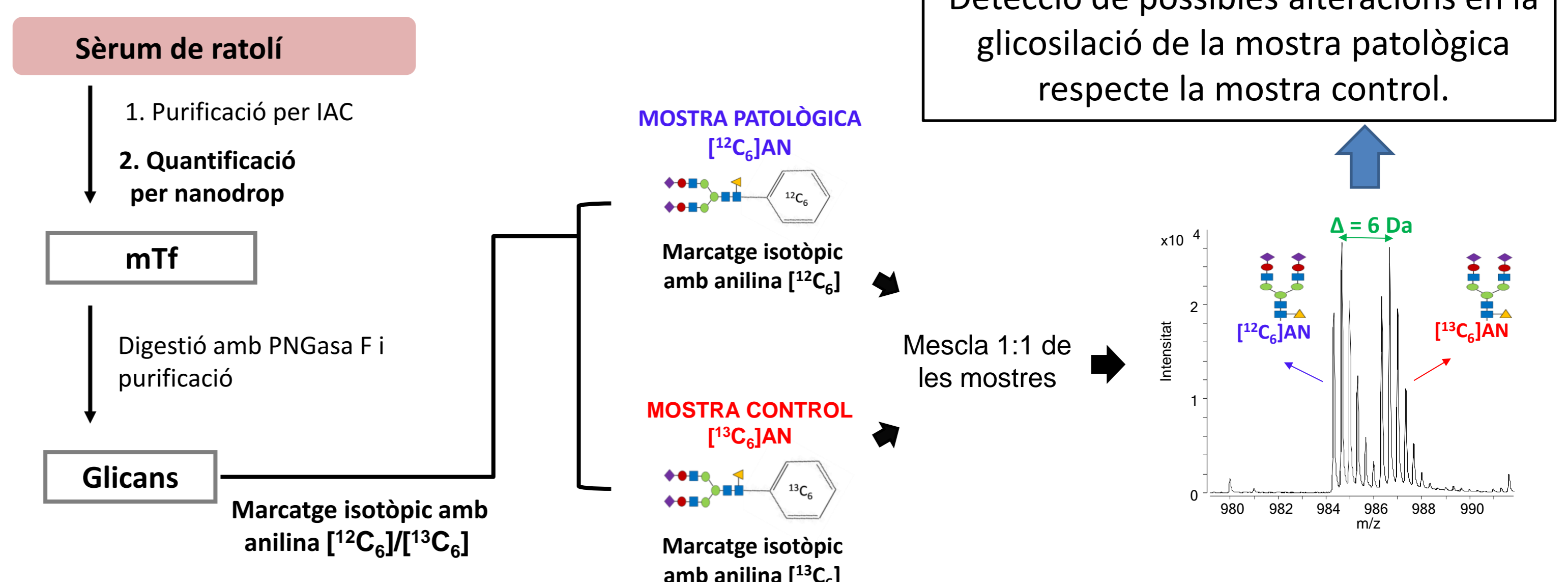
Temps retenció (min)	Àrea pic cromatogràfic	*Àrea normalitzada	
1Ant/1Neu5Gc	23.3	231515	0.03
2Ant/1Neu5Gc	19.4	21819816	3.22
2Ant/1Neu5Gc + 1Fuc	20.0	4337500	0.64
2Ant/2Neu5Gc	16.7	266221701	39.3
2Ant/2Neu5Gc + 1Fuc	17.1	53297776	7.87
2Ant/3Neu5Gc	15.0	106687126	15.7
2Ant/3Neu5Gc + 1Fuc	15.4	13184402	1.95
3Ant/2Neu5Gc	18.0	14481440	2.14
3Ant/2Neu5Gc + 1Fuc	18.4	1884326	0.28
3Ant/3Neu5Gc	16.3	110635649	16.3
3Ant/3Neu5Gc + 1Fuc	16.6	11504764	1.70
3Ant/4Neu5Gc	15.6	46603887	6.88
3Ant/4Neu5Gc + 1Fuc	15.9	3984059	0.59
3Ant/5Neu5Gc	15.9	5339134	0.79
3Ant/5Neu5Gc + 1Fuc	16.0	551948	0.08
4Ant/2Neu5Gc	16.3	1083708	0.16
4Ant/2Neu5Gc + 1Fuc	16.7	841708	0.12
4Ant/3Neu5Gc	17.9	2768919	0.41
4Ant/4Neu5Gc	16.7	6110346	0.90
4Ant/4Neu5Gc + 1Fuc	17.0	821404	0.12
4Ant/5Neu5Gc	16.8	4816442	0.71
4Ant/5Neu5Gc + 1Fuc	16.9	662653	0.10

\*Àrea normalitzada = àrea del pic cromatogràfic del glicà/suma de les àrees de tots els glicans.

✓ El perfil dels glicans de la mostra de sèrum control de ratolí de 8 setmanes d'edat coincideix amb els de la mostra de sèrum de ratolí comercial, de manera que es confirma que el sèrum comercial es pot emprar com a referència per ser comparat amb mostres de sèrum patològic per la cerca de biomarcadors de la malaltia.

## 5. Futur anàlisi de mostres patològiques

### QUANTIFICACIÓ RELATIVA DE LA MOSTRA CONTROL VS LA MOSTRA PATOLÒGICA MITJANÇANT L'ESTRATÈGIA GRIL



Detecció de possibles alteracions en la glicosilació de la mostra patològica respecte la mostra control.

## 6. Conclusions

- ✓ La metodologia aplicada permet una bona separació cromatogràfica i una identificació idònia dels glicans de la mTf i dels seus corresponents isòmers.
- ✓ L'anàlisi dels pèptids i glicopèptid demostra l'eficàcia de la IAC per purificar la mTf de mostres de sèrum, obtenint un 83% de cobertura de la seqüència polipeptídica.
- ✓ El sèrum comercial es pot utilitzar com a mostra control.

## 7. Referències

- Varki A, Kannagi R TB. *Glycosylation Changes in Cancer. Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY); 2009.
- Reis C a, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol*. 2010;63:322-329.
- Giménez E, Balmaña M, Figueras J, et al. Quantitative analysis of N-glycans from human alpha-acid-glycoprotein using stable isotope labeling and zwitterionic hydrophilic interaction capillary liquid chromatography electrospray mass spectrometry as tool for pancreatic disea. *Anal Chim Acta*. 2015;866:59-68.
- Mancera-Arteu M, Giménez E, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Identification and characterization of isomeric N-glycans of human alpha-acid-glycoprotein by stable isotope labelling and ZIC-HILIC-MS in combination with exoglycosidase digestion. *Anal Chim Acta*. 2016;940:92-103.
- Barroso A, Giménez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Classification of congenital disorders of glycosylation based on analysis of transferrin glycopeptides by capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2016;160:614-623.
- Giménez E, Sanz-Nebot V, Rizzi A. Relative quantitation of glycosylation variants by stable isotope labeling of enzymatically released N-glycans using [12C]/[13C] aniline and ZIC-HILIC-ESI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(23):7307-7319.