



FFF A FIBRA CAVA PER LA MS DI PROTEINE INTATTE E BATTERI INTERI

Andrea Zattoni, Barbara Roda, Pierluigi Reschiglian
Dipartimento di Chimica "G. Ciamician"
Università di Bologna
Daniela Parisi, Fabrizio Dal Piaz, Aldo Roda
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università di Bologna
andrea.zattoni@unibo.it

In questo lavoro, viene proposta l'applicazione del frazionamento in campo-flusso a fibra cava porosa (HF FIFFF), una variante FFF microfluidica sviluppata in proprio dagli Autori, al pretrattamento del campione da sottoporre a TOFMS.

L'accoppiamento online con la ESI/TOFMS e offline con la MALDI/TOFMS dimostrano la capacità della HF FIFFF di purificare e frazionare campioni di proteine intatte e di cellule intere, senza alterarne le condizioni native.

L'indagine dei processi fisiologici e metabolici, regolati all'interno della cellula dalle proteine, costituisce una delle principali sfide della proteomica (1). La caratterizzazione delle proteine allo stato nativo (proteomica *top-down*) è dunque necessaria per comprenderne la funzione biologica e catalitica. L'analisi di proteine mediante spettrometria di massa (MS) ha aperto, nell'era post-genomica, nuove opportunità nello studio dell'espressione proteica. L'innovazione strumentale in MS di campioni biologici, e nelle tecniche ancillari per il trattamento di tali campioni, è quindi obiettivo di primario interesse scientifico dagli importanti risvolti applicativi, anche dal

punto di vista commerciale ed economico. La MS con analizzatori a tempo di volo (TOFMS) si è affermata come tecnica di eccellenza per l'analisi di proteine intatte, grazie alla capacità di registrare spettri di massa accurati su un ampio intervallo di valori di m/z (2). L'esigenza di ridurre la frammentazione durante il processo di ionizzazione delle proteine ha quindi portato ad accoppiare la TOFMS a sorgenti di ionizzazione a basso impatto, quali l'interfaccia elettrospray (ESI) e la ionizzazione/desorbimento laser assistiti da matrice (MALDI). A riconoscimento del fondamentale apporto alla caratterizzazione spettrometrica di molecole biologiche, agli inventori di queste

tecniche di ionizzazione è stato assegnato, nel 2003, il Premio Nobel per la Chimica. Nell'ambito di un approccio *top-down* all'indagine proteomica, la ESI/TOFMS permette di studiare i processi di denaturazione delle proteine, così come i loro aspetti morfologici e conformazionali, mentre i metodi MALDI/TOFMS si sono affermati, fra l'altro, come i più efficaci per la caratterizzazione di cellule intere dall'identificazione delle proteine che le costituiscono (3). I valori di m/z ricavati dagli spettri MALDI/TOF di cellule intere sono attribuibili a proteine intere contenute nella cellula. Una specie batterica può quindi essere identificata ricercando tali proteine su librerie di proteomica,

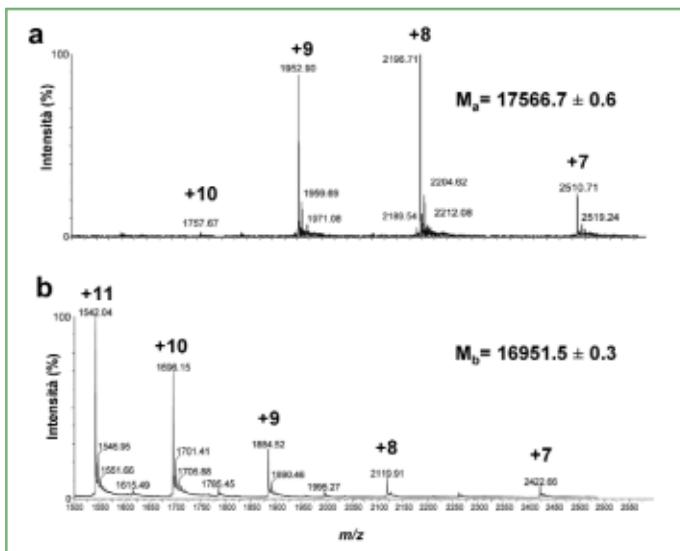


Figura 1 - Spettri multicarica della mioglobina (Mb). a) Spettro HF FIFFF-ESI/TOF; M_a = massa calcolata; b) spettro RP HPLC-ESI/TOF; M_b = massa calcolata

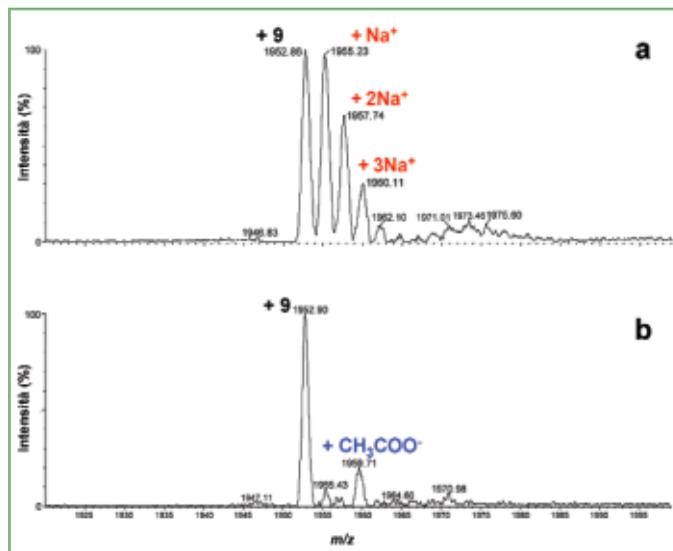


Figura 2 - Purificazione online di mioglobina (Mb). a) Spettro multicarica per iniezione diretta in ESI/TOF MS; b) spettro multicarica per iniezione in HF FIFFF-ESI/TOFMS

oppure confrontando i valori di m/z con una libreria di segnali caratteristici ottenuta su campioni batterici standard. La ricerca di metodi rapidi ed accurati per l'identificazione di microrganismi è attualmente argomento di notevole interesse in svariati ambiti, fra cui le applicazioni biomediche, la sicurezza alimentare, l'industria biotecnologica e, non ultime, le strategie difensive nei confronti di conflitti con armi batteriologiche e di contrasto del bio-terrorismo.

Quando si analizzano mediante TOFMS campioni complessi come proteine non purificate, miscele proteiche o campioni di cellule intere, l'interpretazione degli spettri risulta tuttavia estremamente difficile. La messa a punto di procedure separative e di *clean-up*, che non alterino la struttura nativa degli analiti, è quindi di notevole importanza, in particolare per gli studi indirizzati all'individuazione e caratterizzazione di componenti proteiche a bassa abbondanza. Per l'analisi proteomica, la TOFMS è stata finora accoppiata sia *online* (mediante l'interfaccia ESI) che *offline* a tecniche separative come l'elettroforesi capillare a zone, la HPLC e la cromatografia ad esclusione molecolare (4, 5). Queste tecniche presentano tuttavia limitazioni intrinseche nell'analisi di proteine intatte e di complessi proteici, dovute alla necessità di operare in presenza di elevate concentrazioni saline o

di solventi denaturanti, e di sottoporre le proteine all'interazione con fasi stazionarie o intensi campi elettrici. Inoltre, benché raggiungano un'elevata risoluzione nella separazione di miscele proteiche, queste tecniche non sono generalmente applicabili alla separazione di cellule intere, e non sono particolarmente selettive rispetto a variazioni morfologiche o conformazionali indotte sulle proteine intatte dall'interazione con l'ambiente chimico circostante.

In questo lavoro proponiamo quindi l'utilizzo di un dispositivo prototipo miniaturizzato con caratteristiche peculiari particolarmente adatte ed utili per un accoppiamento con la MS e specificatamente messo a punto nei nostri laboratori per la purificazione ed il frazionamento di proteine e cellule intere per analisi proteomica.

HF FIFFF: un nuovo dispositivo per frazionare bioanaliti

Il dispositivo prototipo che abbiamo sviluppato si basa sul principio del frazionamento in campo-flusso (FFF) ed è costituito da un canale miniaturizzato, sterilizzabile e totalmente biocompatibile. Il cuore del dispositivo HF FIFFF è uno spezzone di fibra cava porosa (*hollow fiber flow FFF*, HF FIFFF) di lunghezza attorno ai 20 cm e diametro interno submillimetrico, con volume quindi attorno ai 100 μL , all'interno del quale proteine o cellu-

le intere vengono separate per effetto idrodinamico in base a differenze di coefficiente di diffusione (nel caso di proteine) e di caratteristiche biofisiche (nel caso di cellule). I canali per HF FIFFF vengono costruiti nei nostri laboratori a partire da fibre in materiale polimerico, fibre solitamente usate in dispositivi per ultrafiltrazione, ed inseriti in un sistema per cromatografia liquida opportunamente modificato. È possibile iniettare nel sistema analiti proteici o cellulari dispersi in fluidi biologici e ottenerne, oltre al frazionamento, anche la purificazione da componenti del campione a più basso peso molecolare.

L'assenza di fase stazionaria e l'estrema flessibilità nella scelta dell'eluente rendono il meccanismo su cui si basa la HF FIFFF intrinsecamente *soft*, e quindi particolarmente adatto a preservare lo stato nativo di campioni biologici. La HF FIFFF raggiunge, ad esempio nel caso di selezione di batteri e cellule intere, prestazioni separative analoghe alla FIFFF di tipo convenzionale (6), a cui si aggiungono i peculiari vantaggi della miniaturizzazione, quali i ridotti carichi analitici, la bassa diluizione del campione durante l'eluizione ed i brevi tempi di analisi, dell'ordine di pochi minuti. Il costo del canale, che possiamo stimare inferiore ai 5 euro anche a livello di costruzione di un singolo prototipo, ne consente l'impiego monouso, con ulteriore vantaggio quando si lavora

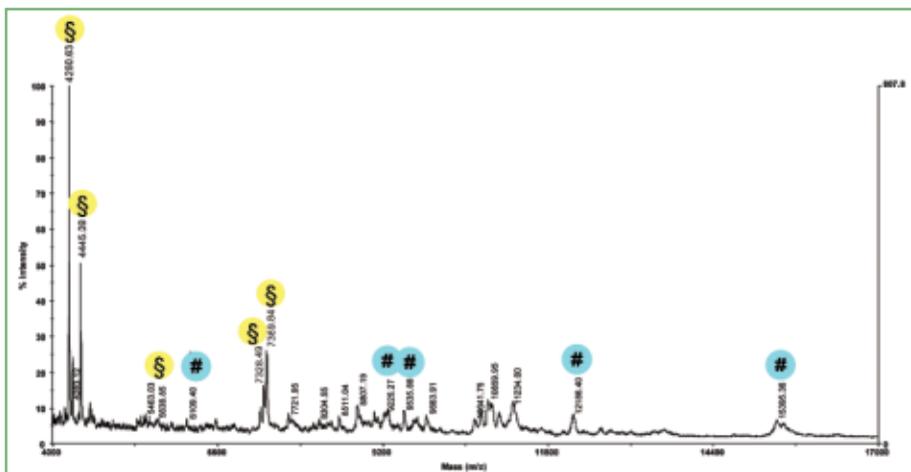


Figura 3 - Spettro MALDI/TOF di una miscela 1:1 di *E. coli* liofilizzati e *B. subtilis*. \$: picchi caratteristici individuali per *E. coli*; #: picchi caratteristici per *B. subtilis*

con campioni di origine biologica, per i quali è necessario evitare rischi di effetto memoria e di contaminazione tra analisi successive. Queste caratteristiche rendono la HF FIFFF particolarmente adatta all'accoppiamento con la TOFMS in analisi proteomica *top-down*.

HF FIFFF-ESI/TOFMS di proteine intatte

Grazie ai bassi flussi di fase mobile in uscita del dispositivo frazionatore (<0,3 ml/min.), è stato possibile l'accoppiamento *online* con sistemi ESI/TOFMS, per l'analisi di proteine allo stato nativo. L'accoppiamento *online* è stato realizzato collegando direttamente l'uscita del canale a fibra cava al capillare d'ingresso dell'interfaccia ESI. Il risultato di questo accoppiamento è mostrato in Figura 1, dove sono messi a confronto gli spettri multicarica ottenuti da un campione di mioglobina (Mb) eluito in HF FIFFF-ESI/TOFMS (Figura 1a) e quello ottenuto da un tipico sistema analitico per analisi proteomica *top-down*, costituito da un accoppiamento MS con un sistema HPLC a fase inversa (RP HPLC ESI/TOFMS, Figura 1b). Il

minor numero di cariche assunte dalla proteina dopo il frazionamento in HF FIFFF è indice di una minore denaturazione, ossia del fatto che la proteina si è mantenuta in condizioni più simili a quelle native. Inoltre, la massa calcolata dallo spettro multicarica per l'unica specie osservata è attribuibile alla somma della catena polipeptidica della Mb e del gruppo prostetico eme, naturalmente presente in tale proteina. Il preventivo frazionamento della proteina in HF FIFFF conserva quindi le interazioni non covalenti del complesso proteina-gruppo prostetico, permettendo di determinarne con accuratezza la sua massa molecolare complessiva. La separazione della medesima proteina in RP HPLC ne provoca invece la denaturazione con conseguente perdita dell'eme, come risulta dalla massa della specie calcolata dallo spettro multicarica riportato in Figura 1b, che coincide con la sola catena polipeptidica.

La rimozione di componenti non volatili quali cationi metallici da campioni proteici è importante per la corretta interpretazione di spettri ESI/TOFMS e per ottenere bassi limiti di rivelabilità nell'identificazione di protei-

ne, in quanto cationi metallici possono formare addotti proteici nella sorgente di ionizzazione. L'impiego del dispositivo HF FIFFF permette, con la fuoriuscita dei componenti non proteici del campione dai pori della membrana utilizzata nel dispositivo da noi sviluppato, anche la purificazione in linea del campione proteico dalle specie in grado di formare addotti nella sorgente. In Figura 2 si riporta il confronto tra i risultati di una analisi ESI/TOFMS ottenuta da una iniezione diretta di Mb (Figura 2a) con quelli ottenuti da pre-frazionamento di Mb mediante HF FIFFF in linea (Figura 2b). Appare chiaro che l'iniezione diretta produce uno spettro, qui riportato solo nella zona attorno allo ione molecolare a carica +9, in cui sono presenti addotti proteici con cationi Na^+ che non sono viceversa presenti nello spettro ottenuto da HF FIFFF-ESI/TOFMS. L'intensità del segnale relativo allo ione molecolare a nove cariche risulta inoltre incrementata nel caso di pre-frazionamento mediante HF FIFFF.

Rispetto alle promettenti peculiarità di frazionamento soft e di *clean-up*, non si pone comunque in secondo piano la caratteristica fondamentale del sistema HF FIFFF, che è appunto una tecnica separativa in senso classico, in altre parole pseudo-cromatografico, in grado quindi di separare, e distinguere dal diverso tempo di ritenzione, proteine intere in base al loro diverso coefficiente di diffusione (D). Poiché il coefficiente di diffusione di proteine intere è in relazione non solo con il peso molecolare (M_r) ma anche con aspetti conformazionali della proteina, differenze in tempo di ritenzione in HF FIFFF in relazione alla analisi di massa via *on-line* ESI/TOFMS possono permettere di studiare, ad esempio, come si possano verificare variazioni conformazionali in una proteina intera senza modificazione di massa.

Bibliografia

- (1) I. Plavec *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 1223.
- (2) Y. Liang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 30098.
- (3) C. Fenselau *et al.*, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 157.
- (4) Y. Shen *et al.*, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3106.
- (5) D.W. Armstrong *et al.*, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5465.
- (6) P. Reschiglian *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2003, **985**, 519.
- (7) P. Reschiglian *et al.*, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 2103.

HF FIFFF-MALDI/TOFMS di miscele di batteri interi

Le potenzialità di un accoppiamento *off-line* HF FIFFF e MALDI/TOFMS per il frazionamento di cellule sono risultate chiare quando si sono confrontati gli spettri di batteri analizzati direttamente in MALDI/TOFMS con quelli ottenuti dopo frazionamento HF FIFFF, sia per quanto riguarda la possibilità di purificare il campione, sia per quanto riguarda la semplificazione degli spettri ottenuti da batteri in miscela. L'identificazione mediante MALDI/TOF MS di più batteri presenti in un campione risulta complicata dalla simultanea presenza negli spettri di segnali caratteristici per entrambe le specie, oltre che dalla possibile soppressione di alcuni segnali dovuta alla tipica natura competitiva del meccanismo di ionizzazione MALDI (7). In Figura 3 si riporta, ad esempio, lo spettro MALDI/TOF di una miscela di cellule di *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* nel quale, per ciascuna specie, è possibile ritrovare solo 5 dei 10 segnali caratteristici che erano stati identificati su una libreria di spettri ricavata da campioni dalle singole specie.

Il prefrazionamento della miscela in HF FIFFF consente, invece, di ottenere spettri più semplici, e quindi di semplificare l'identificazione delle specie batteriche. In Figura 4 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi MALDI/TOFMS a seguito di un frazionamento HF FIFFF della stessa miscela di *E. coli* e *B. subtilis* il cui spettro è riportato in Figura 3. Dal confronto di tale spettro con quelli ottenuti dalle cellule batteriche delle due specie (Figura 4 b,c) raccolte in corrispondenza delle due bande di frazionamento indicate in Figura 4a, appare evidente la presenza in ciascuno spettro di segnali relativi ad una sola specie, oltre ad un maggior recupero di segnali caratteristici per ciascuna specie (9

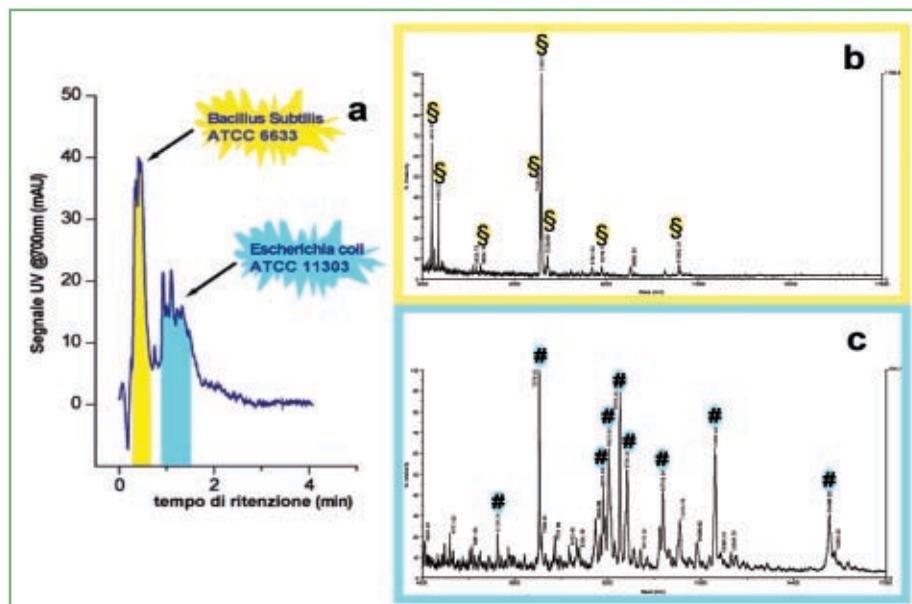


Figura 4 - HF FIFFF MALDI/TOF di una miscela 1:1 di *E. coli* e *B. subtilis* liofilizzati. a) Frattogramma HF FIFFF: picco 1 = *B. subtilis*, picco 2 = *E. coli*; b) spettro MALDI/TOF della frazione 1 e rispettivi picchi caratteristici individuati; c) spettro MALDI/TOF della frazione 2 e rispettivi picchi caratteristici individuati

per *E. coli* e 8 per *B. subtilis* rispetto ai 10 segnali caratteristici per ciascuna specie). Analogamente a quanto mostrato nel caso della purificazione di proteine, il pretrattamento mediante HF FIFFF può inoltre migliorare la qualità degli spettri ottenuti da campioni di cellule intere in matrici reali. È noto, infatti, come la riproducibilità ed il rapporto segnale/rumore negli spettri MALDI/TOF di cellule intere siano condizionati dalla presenza nel campione di componenti non cellulari di diversa origine, che possono co-cristallizzare con la matrice. La HF FIFFF, che è in grado di purificare il campione di partenza da tali specie, consente di ottenere spettri in cui i segnali, quindi gli analiti, sono più facilmente identificabili.

Prospettive di sviluppo

I dispositivi e le procedure HF FIFFF da noi sviluppate possono integrarsi ed aggiungersi efficacemente alle strategie di trat-

tamento del campione in indagine proteomica di tipo *top-down*, ogniquale volta sia necessario ridurre la complessità dei campioni da analizzare senza alterarne le condizioni native. La scelta di geometrie e materiali opportuni può consentire la realizzazione di canali ottimizzati per applicazioni specifiche. Stiamo quindi lavorando anche a sviluppi tecnici da apportare sia al dispositivo separativo in sé che al miglior schema strumentale per il suo funzionamento e il controllo delle condizioni operative, che ci possano permettere di prendere in considerazione anche aspetti di brevettabilità della metodica. Tra questi, un interessante sviluppo è legato all'impiego di fibre cave di sezione ridotta tale da rendere il sistema HF FIFFF compatibile con interfacce di tipo nanospray, che sappiamo rivestire grande importanza nella analisi MS di proteine a bassa abbondanza.

Hollow Fiber FFF for MS of Intact Proteins and Whole Bacteria

ABSTRACT 

Time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) is a fundamental technique for characterization and identification of intact proteins, which is the basis of top-down proteomics. In this work, the application of hollow-fiber field-flow fractionation (HF FIFFF) - a miniaturized, home-built FFF version - for sample pretreatment in TOFMS is proposed. Online coupling with ESI/TOFMS and offline coupling with MALDI/TOFMS demonstrate the ability of HF FIFFF to purify and fractionate intact proteins and whole cells, preserving their native conditions.