

Sobre elefants voladors i altres prodigis: comentaris entorn del Premi Nobel de Química 2002

David Andreu

Unitat de Proteòmica i Química de Proteïnes, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, a/e: david.andreu@upf.edu

Amb el Premi Nobel del 2002, l'Acadèmia Sueca de Ciències ha posat en relleu diverses aportacions metodològiques que han fet avançar decisivament la química de proteïnes en les darreres dues dècades. Així, mètodes d'ionització suau, com l'electrosprai o el MALDI, han produït un veritable canvi de paradigma en l'espectrometria de masses; de molècules petites, ha passat a ocupar-se de proteïnes d'elevat pes molecular. D'altra banda, diverses innovacions tècniques en RMN bidimensional han permès aplicar, amb notable èxit, aquesta espectroscòpia per a desxifrar l'arquitectura tridimensional de proteïnes en solució.

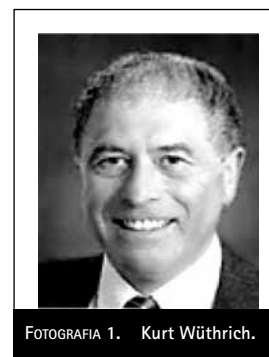
By way of the 2002 Nobel Prize in Chemistry, the Swedish Royal Academy has highlighted several methodologies that have contributed decisively to the advance of protein chemistry in the last two decades. Thus, soft ionisation techniques such as electrospray or MALDI have led to a true paradigm shift in mass spectrometry, which from small analytes has moved to protein molecules of high molecular mass. On the other hand, several technical innovations in bidimensional NMR have brought about a very successful application of this spectroscopy to decode the three-dimensional architecture of proteins in solution.

El Premi Nobel de Química del 2002 ha estat atorgat a tres científics que han impulsat avenços tecnològics amb importants aplicacions en el camp de les biomolècules, molt particularment les proteïnes. El text oficial de l'Acadèmia Sueca de Ciències diu que el premi s'ha concedit «pel desenvolupament de mètodes per a la identificació i l'anàlisi estructural de macromolècules biològiques». Més específicament, la meitat del premi (cinc milions de corones sueques) ha correspost al professor Kurt Wüthrich, «per haver desenvolupat l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear que permet la determinació de l'estructura tridimensional de macromolècules biològiques en solució», i l'altra meitat se l'han repartit el professor John B. Fenn i Koichi Tanaka «per haver desenvolupat mètodes d'ionització suau per desorció, que permeten l'anàlisi de macromolècules biològiques per espectrometria de masses». En aquesta recensió, posarem l'accent en l'impacte que les metodologies guardonades tenen en el camp específic de la química de proteïnes, que han estat no tan sols el primer i principal camp de prova d'aquestes metodologies, sinó que són reconegudes com les biomolècules que, de manera més fascinant, combinen diversitat estructural amb rellevància funcional. Per altra banda, l'especialització de l'autor fa aconsellable que la revisió se centri principalment en la segona de les metodologies premiades, que té un impacte més directe en la proteòmica.

RMN de proteïnes

El Premi Nobel atorgat a Kurt Wüthrich (1938) ha estat poc sorprenent: la importància dels seus treballs per a l'anàlisi

conformacional de proteïnes en solució per RMN era àmpliament reconeguda. Wüthrich (fotografia 1) es va llicenciar en química, física i matemàtiques a la prestigiosa ETH de Zuric, on des de 1980 és catedràtic de Biofísica. Des del 2001 és també professor visitant de biologia estructural a una altra prestigiosa institució, l'Institut de Recerca Scripps de La Jolla (Califòrnia). Amb el Nobel a Wüthrich, l'Scripps aconsegueix la molt inusual fita de repetir dos anys seguits com a institució guardonada.



FOTOGRAFIA 1. Kurt Wüthrich.

L'anàlisi estructural de les molècules de la vida, i de les proteïnes en particular, ha estat un objectiu llargament ambiciós pels químics. Pasteur va ser un dels primers a concebre les molècules en general i les biomolècules en particular, en termes tridimensionals. Hom recordarà els seus experiments clàssics de separació de l'àcid tartàric racèmic, seleccionant (manualment!) els cristalls de formes hemièdriques diferents, impulsat per la genial intuïció que cadascuna reflectia una diferència en la disposició espacial dels seus àtoms components. Amb el progrés de la química orgànica, a finals del segle XIX, el repte d'esbrinar l'estructura de les proteïnes va anar fent-se cada cop més imperiós. Emil Fischer va demostrar que les proteïnes estaven formades per aminoàcids units formant una cadena lineal, i va postular, de nou amb notable intuïció, que l'ordenació seqüencial dels aminoàcids no era inespecífica, sinó fonamental per a l'estructura de la proteïna. Va ser també el primer en proposar que la capacitat dels en-

zims per discriminar entre dos enantiòmers —que Pasteur havia observat en els seus experiments de fermentació del tartàric— tenia una base estructural, similar a la relació entre una clau i el seu pany. Dissortadament, els «panyes» (enzims) van resultar ser força més complicats que les «claus» (molècules orgàniques petites), i la determinació detallada de les estructures moleculars de les proteïnes va haver d'esperar el desenvolupament de la cristal·lografia.

Quan al 1934 John D. Bernal va enregistrar el primer diagrama de difracció de raigs X d'una proteïna globular, va iniciar un procés que, en les dècades següents, duria a resoldre les estructures cristal·lines de la mioglobina (Max Perutz i John Kendrew, Nobel de Química de 1962) i l'hemoglobina, i a partir d'ací un veritable devessall d'estructures d'altres proteïnes. Fins fa pocs anys, aquesta tècnica de cristal·lografia de raigs X ha estat l'única manera de determinació estructural de proteïnes. Com el seu nom indica, la cristal·lografia de raigs X requereix que la proteïna a estudiar es trobi en estat cristal·lí. Els treballs de Wüthrich en RMN han obert camí a l'estudi de proteïnes en solució, és a dir, en condicions que s'assemblen força a les que la proteïna adopta en el medi cel·lular.

Com és sabut, la RMN és una modalitat espectroscòpica que aprofita el fet que certs nuclis, com ara ^1H , ^{13}C , o ^{31}P , presenten una propietat anomenada spin nuclear, que en presència d'un camp magnètic els duu a orientar-se com si fossin petits imants. L'aplicació durant un temps curt (un pols) d'una radiofreqüència provoca un canvi en l'orientació i en l'energia d'aquests spins nuclears. És l'absorció d'aquesta radiació el que hom detecta com a senyal de RMN.

El paper fonamental de la RMN en la determinació d'estructures moleculars és ben conegut. Bona part de l'èxit de la seva aplicabilitat, a la majoria de molècules orgàniques i inorgàniques de talla petita mitjana, es deu als treballs d'un altre químic suís, Richard Ernst (Nobel de Química, 1991), que amb la introducció de la RMN de polsos¹ va fer possible superar els problemes de sensibilitat de les versions inicials d'aquesta tècnica.

Els notables progressos en RMN de molècules orgàniques, des dels anys seixanta, setanta, no resultaren gens fàcils d'aplicar a biomolècules de talla gran, com les proteïnes. Els centenars, per no dir milers de protons d'aquestes donaven lloc a veritables boscos de pics, l'assignació dels quals, a cadascun dels

protons de la proteïna, constituïa a primera vista un trencaclosques insoluble. A partir dels anys vuitanta, Wüthrich va encarar aquest repte formidable desenvolupant l'anomenat «mètode d'assignació seqüencial», que constitueix la pedra angular de la moderna RMN de proteïnes.²⁻⁴ Aquest mètode, basat en les tècniques de RMN bidimensional, fa possible correlacionar no tan sols els protons de cadascun dels aminoàcids de la proteïna entre ells, sinó també amb els protons dels residus veïns i, d'aquesta manera, anar progressivament assignant els diversos senyals a cadascun dels protons. Un element essencial en aquest procés és la informació que proporciona un experiment anomenat NOESY,⁵ basat en l'efecte nuclear Overhauser. La intensitat dels senyals de correlació d'un espectre NOESY és inversament proporcional a la sisena potència de la distància entre els protons ($1/r^6$); això permet no tan sols establir la connexió entre protons de residus consecutius, sinó que permet, en general, identificar protons espacialment propers, tant si són veïns en la seqüència, com si no. El conjunt de distàncies interprotòniques així derivades és el punt de partida per a determinar l'estructura tridimensional de la proteïna, utilitzant algorismes de geometria de distàncies i/o protocols de dinàmica molecular restringida. Una visió molt simplista de com té lloc aquest procés la podem trobar a la figura 1. Wüthrich va publicar la primera determinació estructural d'una proteïna en solució per aquests mètodes el 1985. Des d'aleshores, el nombre d'estructures elucidades ha crescut notablement, fins al punt que actualment vora un 20 % dels milers d'estructures dipositades al Protein Data Bank s'han obtingut per tècniques de RMN.

En molts sentits, la RMN ha de considerar-se complementària de la difracció (també anomenada cristal·lografia) de raigs X, l'eina més potent per a investigar l'estructura tridimensional de proteïnes. Així, quan hom estudia una mateixa proteïna per ambdues tècniques, el més habitual és que la correlació entre l'estructura en solució (RMN) i la cristal·lina (raigs X) sigui molt bona. Per altra banda, la cristal·lografia de raigs X permet determinar, a molt elevada resolució, estructures de talla molt gran (per exemple, complexos entre diverses proteïnes) que, ara per ara, no són fàcilment accessibles per RMN. En contrapartida, la RMN fa possible explorar regions no estructurades o molt mòbils d'una proteïna, que en estat cristal·lí són de difícil resolució. Un exemple particularment il·lustratiu en aquest sentit és la resolució de l'estructura de les proteïnes priòniques (descobertes pel Premi Nobel de Medicina de 1997, Stanley Prusiner) implicades en malalties com la de les vaques

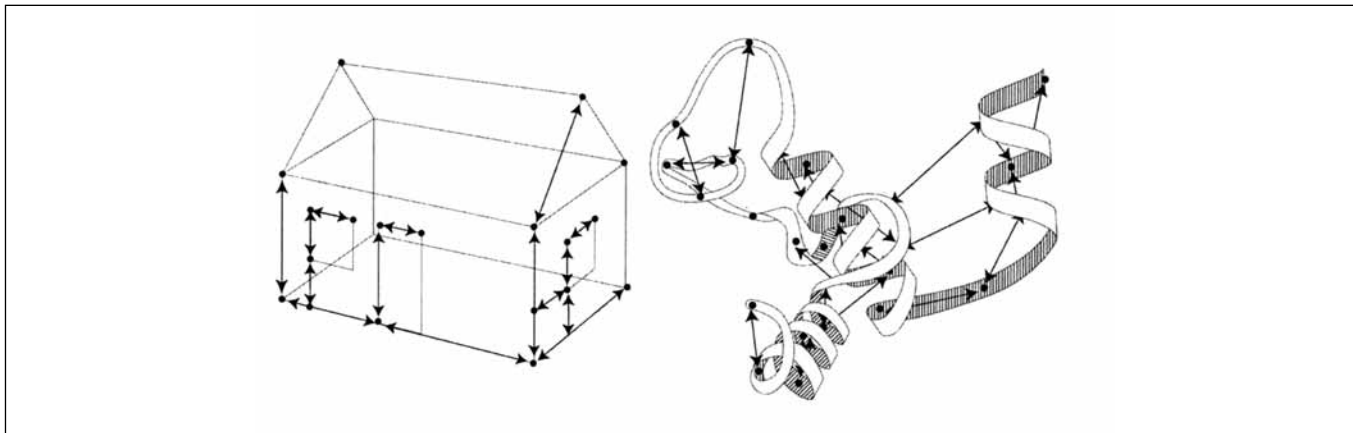


FIGURA 1. En conèixer totes les mides d'un objecte (p. ex., una casa), hom pot deduir-ne l'estructura en tres dimensions. De la mateixa manera, en mesurar un gran nombre de distàncies entre els protons d'una proteïna és possible crear una imatge tridimensional de la seva estructura.

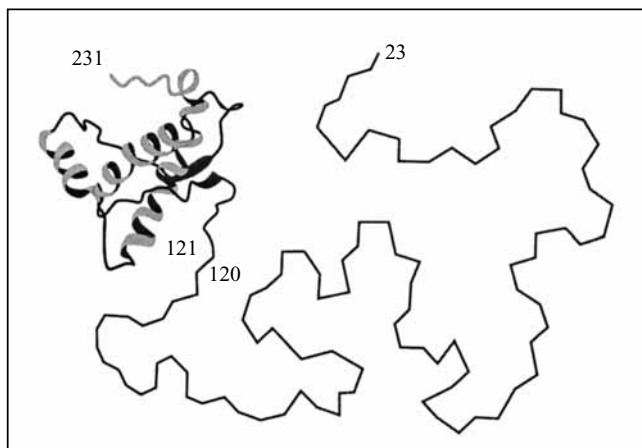


FIGURA 2. Representació de l'estructura tridimensional de la forma normal (saludable) de la proteïna priònica, determinada per RMN en solució aquosa pel grup de Wüthrich. La cadena d'aminoàcids s'estructura predominantment en forma helicoidal a la zona C-terminal (residus 121-231) mentre que la regió N-terminal (residus 23-120) és desordenada i flexible.

boges. Wüthrich i els seus col·legues van provar, mitjançant la RMN, que la proteïna (figura 2) es pot considerar composta per dues regions molt ben diferenciades, una ordenada i una altra pràcticament desestructurada.

Molt recentment, el propi grup de Wüthrich ha introduït una sèrie d'innovacions metodològiques, com ara les tècniques TROSY⁶ (relaxació transversal optimitzada) o les CRINEPT^{7,8} (transferència de polarització millorada per la correlació creuada), que permeten disminuir les velocitats de relaxació transversal dels nuclis que intervenen en l'experiment, reduint l'eixamplament de banda dels senyals i permetent així de su-

perar els problemes de baixa sensibilitat que planteja l'estudi per RMN de proteïnes de talla molt gran. Aquestes millores, juntament amb la utilització de mostres enriquides isotòpicament (¹³C, ¹⁵N i/o ²H), permeten augmentar notablement el rang de pesos moleculars de proteïna abordables per RMN i retallar distàncies respecte a la difracció de raigs X. Per exemple, una de les fites més espectaculars recentment aconseguides ha estat l'anàlisi d'espectres de RMN en solució del complex de *chaperonines* GroEL-GroES d'*Escherichia coli*, de 900 kDa.⁹

Espectrometria de masses de proteïnes: fer volar elefants

En paral·lel amb els progressos en RMN de proteïnes, cal situar també els avenços espectaculars que s'han produït durant els darrers anys en espectrometria de masses biomolecular, il·lustrats pel guardó que Fenn i Tanaka han compartit, novament amb les proteïnes com a principal àrea d'aplicació.

Recordem que l'espectrometria de masses (EM) és una tècnica analítica que permet identificar una substància en virtut de la seva massa. Tot i que el terme engloba un ampli ventall de dispositius instrumentals, cadascun amb aplicacions força diverses, tots comparteixen un mateix fonament (figura 3): convertir la mostra a analitzar en ions i separar-los d'acord amb les diferents relacions massa/càrrega (m/z). Totes les varietats d'EM es caracteritzen també per la rapidesa d'adquisició de dades i per una elevada sensibilitat. Avui dia, l'EM s'uti-

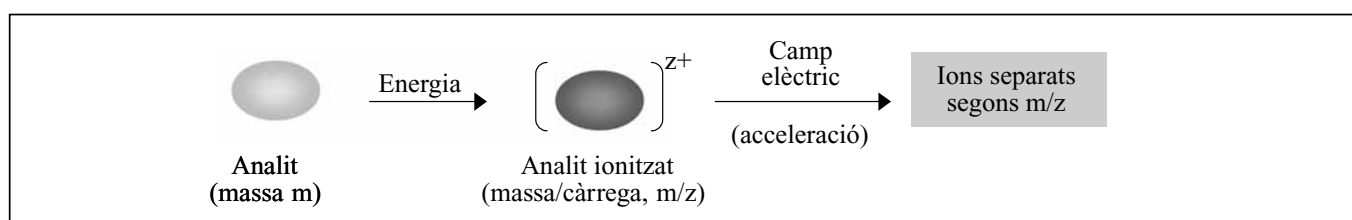


FIGURA 3. Fonament de l'espectrometria de masses. En comunicar l'energia apropiada a una molècula hom aconsegueix ionitzar-la, la qual cosa permet separar-la en el si d'un camp elèctric, on experimenta una acceleració determinada per la relació massa/càrrega.

litza de forma rutinària, en àrees tan diverses com l'anàlisi ambiental, la farmacologia, el control antidopatge o l'arqueologia.

Les bases de l'EM es van establir fa ja més d'un segle, amb els treballs de Joseph J. Thomson (Nobel de Física, 1906), Frederick Soddy i Francis W. Aston (Nobel de Química 1921 i 1922, respectivament). Alguns altres premis Nobel de Química del segle xx han estat també directament relacionats amb l'EM, com ara el descobriment del deuteri per Urey (1934) o el dels fullerenes per Curl, Kroto i Smalley (1996).

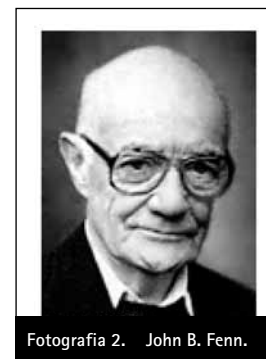
Fins a la darrera part del segle passat, la pràctica totalitat de les aplicacions de l'EM se centraven en analits de «vol fàcil», és a dir, molècules primordialment de tipus orgànic, de talla petita o mitjana i per tant relativament fàcils d'ionitzar. Amb tot, el repte de poder ionitzar i analitzar macromolècules biològiques —és a dir, «fer volar els elefants», una expressió del propi Fenn que recull el nostre títol— atreia els científics des de feia temps. Als anys setanta es van aconseguir els primers èxits en la transformació de biomolècules (pèptids, principalment) en els seus ions en fase gasosa, un fenomen anomenat *desorció*. La revolució que ha experimentat el camp de l'EM, en les dues darreres dècades, s'ha basat fonamentalment en el desenvolupament de mètodes de desorció suficientment suaus per a la ionització de biomolècules làbils, com les proteïnes o els àcids nucleics.

Tot i la relativa grandària d'aquestes biomolècules, cal no oblidar que es tracta d'estructures extraordinàriament petites i amb masses consegüentment minúscules. La molècula d'hemoglobina, per exemple, pesa 10^{-19} g. L'EM té per objectiu «pesar» molècules com aquestes, i el primer pas en aquest sentit és el que hom anomena *ionització per desorció*: aconseguir que les molècules individuals de proteïna passin d'associar-se unes amb altres (amb el dissolvent) a una fase dispersa, for-

mant un núvol de molècules ionitzades. Un cop aconseguit això, els ions poden separar-se aprofitant l'acceleració que la seva relació massa/càrrega els permet assolir: els més lleugers, i/o de càrrega més alta, són més ràpids que els més pesats, i/o de càrrega inferior, la qual cosa en possibilita l'anàlisi. El descobriment que l'Acadèmia sueca ha considerat mereixedor de la meitat del premi Nobel del 2002 és precisament el d'aquests mètodes d'ionització per desorció, en particular dels dos actualment més utilitzats: electrosprai i MALDI.

Ionització per electrosprai

John B. Fenn (fotografia 2) ha estat premiat per la seva contribució fonamental al desenvolupament de la ionització per electrosprai. Fenn (1917), un dels històrics de l'EM, és un científic tan brillant com atípic, capaç de projectar la seva curiositat en nombroses direccions. Format a Yale com a químic, va començar la seva carrera professional a la indústria química



Fotografia 2. John B. Fenn.

per, uns anys després, involucrar-se en programes de recerca aeroespacial. D'ací prové probablement el seu interès pels sistemes de projecció de fluids (jets, esprais, etc.), i com a expert en aquest camp va ser quan es produí el seu retorn al món acadèmic, primer a Princeton (1959), com a catedràtic de Ciència Aeroespacial, i després, de retorn a Yale (1967), com a catedràtic d'Enginyeria Química (Fenn planteja un veritable maldecap als qui s'ocupen de classificar els científics per àrees de coneixement!). Quan, després de vint anys en actiu i set com a emèrit, Yale va proposar-li una jubilació honorable, però inapel·lable (decisió sens dubte molt lamentada a hores d'ara!), Fenn va refusar retirar-se i va acceptar una posició de

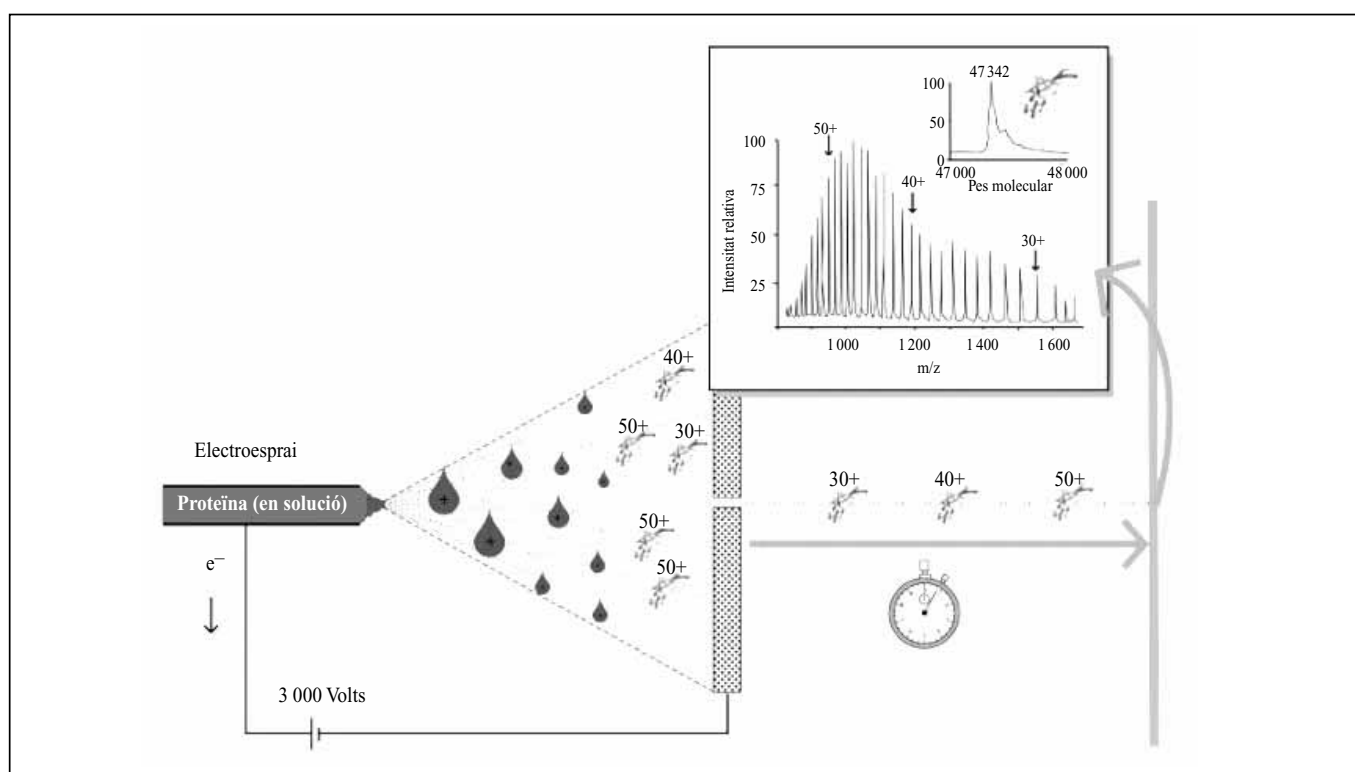


FIGURA 4. Representació esquemàtica de la ionització per electroesprai d'una proteïna. La solució de proteïna injectada per un capil·lar (p. ex., un sistema de nano-HPLC) a la cambra d'ionització genera un aerosol en expandir-se bruscament. El camp elèctric existent entre el capil·lar i les parets de la cambra provoca la ionització de les microgotetes generades, que progressivament van perdent volum (vegeu text) i acaben donant ions amb càrrega múltiple, separables en un analitzador de massa segons les seves relacions m/z .

professor d'investigació en química analítica a la més modesta Virginia Commonwealth University, que ha rebut amb la lògica satisfacció la notícia del seu guardó.

En la ionització per electroesprai, els ions es generen directament d'una solució (aquosa o amb un cosolvent orgànic) que es nebulitza en forma de gotes molt petites, les quals, en presència d'un camp elèctric fort (3-3,5 kV, figura 4), esdevenen carregades. La primera descripció de l'efecte electroesprai va fer-la Dole (1968),¹⁰ que va proposar també el model fisicoquímic (*charge residue model*) que avui continua essent acceptat com a explicació per a aquest procés encara força enigmàtic. Segons aquest model, les gotes tendeixen a perdre volum —a causa de l'expansió brusca que comporta el procés de nebulització i a l'ús d'un gas inert que facilita, per arrossegament de vapor, la dessolvatació de l'analít—, la qual cosa fa augmentar la densitat de càrrega superficial. La repulsió mútua entre càrregues del mateix signe, a la superfície decreixent de la microgota, acaba superant les forces de tensió superficial i provoca l'anomenada «explosió de Rayleigh», en la qual es generen microgotetes encara més petites. En última

instància, les gotes acaben alliberant ions que, gràcies al camp elèctric, es poden direccionar cap a un analitzador de massa.

El procés d'electroesprai genera un ampli ventall d'ions, la majoria de càrrega múltiple, que donen lloc a patrons espectrals complexos, a primera vista dissuasius. Fenn va intuir emperò que, lluny d'ésser un problema, aquesta multiplicitat d'ions permetia determinar la massa molecular amb gran exactitud. En una reunió a San Francisco, el 1988,¹¹ va descriure per primera vegada l'aplicació de l'EM d'electroesprai per a identificar, amb una exactitud del 0,01 %, pèptids i proteïnes de pesos moleculars fins a 40 kDa. Això ho aconseguia desconvolucionant el complex patró de senyals (requadre, figura 4) que resulta de les diverses espècies multicarregades de l'analít (part superior del requadre, figura 4) per un sistema d'equacions simultànies. En l'exemple de la figura 4, els més de quaranta pics de l'espectre primari (requadre) corresponen al conjunt d'espècies iòniques del tipus $[M + nH]^{n+}$, on M i H són, respectivament, la massa de la proteïna i del protó, i n pot agafar valors entre vint i seixanta, aproximadament. La

desconvolució d'aquest espectre condueix a un pic essencialment únic, de massa 47 342 Da.

Un aspecte particularment atractiu de l'EM d'electrosprai és que els pics de l'espectre primari solen ocupar un rang de m/z entre 1 000 i 2 000 (figura 6), assequible a analitzadors senzills com ara els quadrupols (desenvolupats per Wolfgang Paul, Premi Nobel de Física, 1989). Aquest fet ha tingut una incidència molt positiva en l'espectacular desenvolupament d'aquesta tècnica,¹² que en poder implementar-se en plataformes instrumentals relativament senzilles, resulta assequible a costos notablement inferiors als de la major part de la instrumentació d'EM.

Ionització induïda per làser i assistida per matriu (MALDI)

L'altra meitat de la meitat del Nobel destinada a EM ha estat per a Koichi Tanaka (1959) (fotografia 3), vinculat al llarg de tota la seva vida professional a Shimadzu Corporation, una companyia japonesa d'instrumentació científicomèdica.

Així com el Nobel a Fenn ha estat poc sorprenent, el de Tanaka ha suscitat una mica més d'enrenou entre la comunitat d'experts ja que, el seu perfil és «atípic» (jove, enginyer no doctorat, industrial sense vincles acadèmics) i, sobretot, pel fet que la seva contribució al desenvolupament de la tècnica MALDI fos relativament primerenca, sense molta continuïtat bibliogràfica posterior, i fins a cert punt eclipsada per altres aportacions que alguns han considerat més substantives. Deixant de banda si aquesta agitació és o no justificada, sembla que, amb la distinció atorgada a Tanaka, l'Acadèmia Sueca ha volgut, com en altres ocasions, premiar per damunt de tot la idea primigènica (el que els anglosaxons anomenen *seminal contribution*), més que no pas els refinaments posteriors que hagin contribuït a donar-li la gran aplicació que avui dia té.

L'any 1987, en un simposi sinojaponès celebrat a Osaka,¹³ Tanaka va presentar l'anàlisi, per primera vegada, d'una proteïna



Fotografia 3. Koichi Tanaka.

intacta per EM. En dues publicacions de l'any següent,^{14,15} va ampliar aquell resultat inicial descrivint la ionització i posterior anàlisi de proteïnes com el quimotripsinogen (25 717 Da), la carboxipeptidasa A (34 472 Da) i el citocrom c (12 384 Da). Tanaka havia aconseguit el que hom anomena avui desorció suau per làser (SLD, *soft laser desorption*) a còpia de fer incidir llum làser de baixa energia (làser de N₂) sobre una mostra de proteïna impregnada en una matriu de glicerol i partícules col·loïdals. Tanaka va demostrar que en aquestes condicions la mostra es volatilitzava formant ions amb m/z corresponents a la massa de la proteïna.

Abans de Tanaka, ja hi havia hagut alguns intents infructuosos de solucionar el problema de la volatilització/ionització de proteïnes per bombardeig amb làser. Per exemple, un grup rus havia aconseguit ionitzar aminoàcids, tot i evitant-ne la degradació química, per irradiació amb làser.¹⁶ L'any 1985, a la Universitat de Münster (RFA), Michael Karas i Franz Hillenkamp (més mereixedors que Tanaka del viatge a Estocolm, en opinió d'alguns sectors, però no pas de l'Acadèmia Sueca) havien descrit una matriu orgànica capaç d'absorbir la radiació làser i transferir-ne l'energia a analits que, de resultes, s'ionitzaven. Així, Karas i Hillenkamp¹⁷ havien aconseguit ionitzar diverses molècules de baix pes molecular amb un làser YAG de 266 nm i matrius d'àcid nicotínic, però en aplicar aquestes condicions a proteïnes de talla superior no van tenir èxit.

Els resultats de Tanaka van posar de relleu la importància d'una combinació adequada entre la longitud d'ona i l'energia del làser, la capacitat d'absorció d'energia de la matriu i l'estructura de l'analit. Així, el làser de nitrogen de Tanaka tenia una longitud d'ona ($\lambda = 330$ nm) en la qual les cadenes laterals d'aminoàcids aromàtics, com Phe, Tyr o Trp, no absorbien, la qual cosa resultava essencial per evitar la fragmentació de la proteïna. Per la seva banda, la matriu de glicerol i partícules col·loïdals, originalment emprada per Tanaka, no ha tingut pràcticament acceptació, tot i que hom continua descrivint matrius fisicoquímiques amb aplicacions interessants. En la pràctica, però, la versió que ha anat progressivament implantant-se (figura 5) és una fusió d'ambdues aproximacions: fa servir, com Tanaka, un làser de nitrogen amb energia lleugerament més baixa ($\lambda = 337$ nm), i, com Karas i Hillenkamp, utilitza matrius orgàniques basades en composts aromàtics amb $\lambda_{\text{màx}}$ coincident amb la del làser. En els instruments comercials actuals, la descàrrega de la font làser s'efectua de manera pulsàtil, unes vint vegades per se-

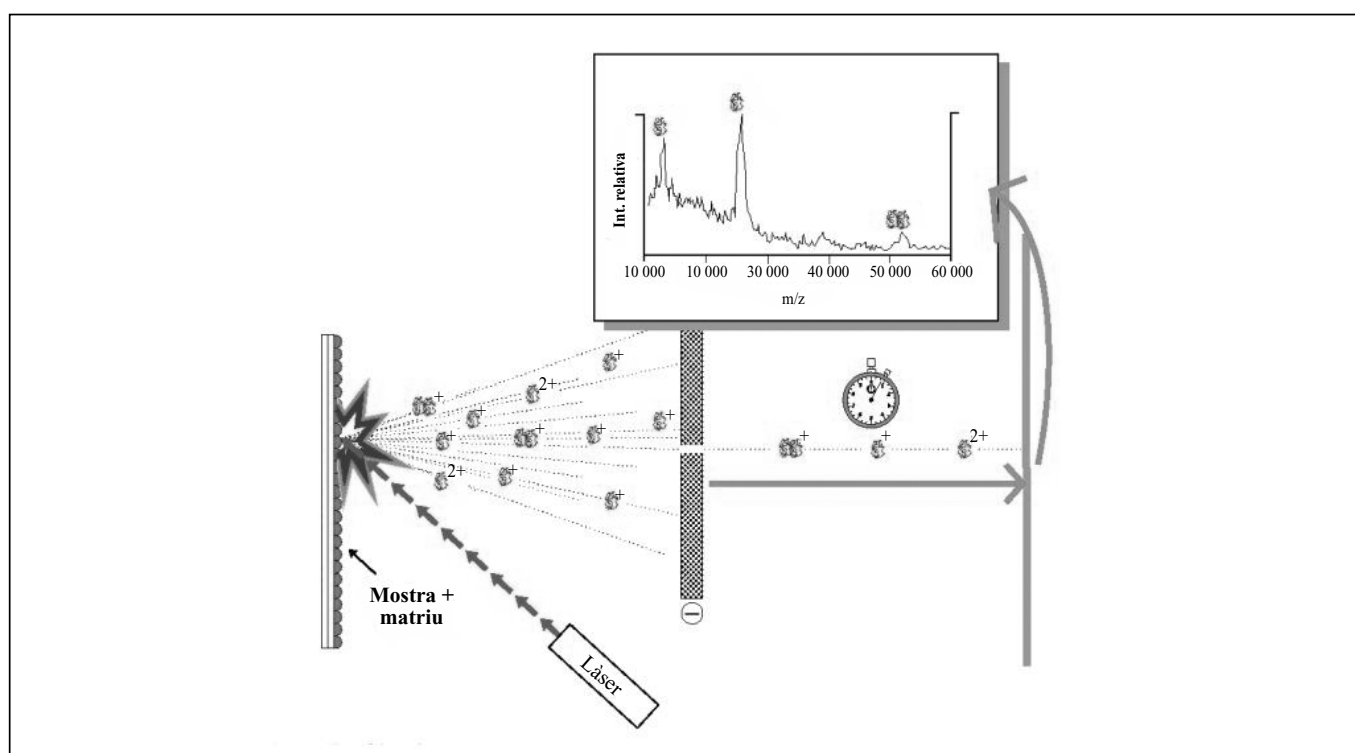


FIGURA 5. Representació esquemàtica de la ionització per desorció amb làser, assistida per matriu (MALDI) d'una proteïna. La irradiació amb làser d'una matriu (un cromòfor amb $\lambda_{\text{màx}}$ coincident amb la del làser) on s'ha dispersat prèviament la proteïna, provoca la volatilització/ionització de la matriu, que permet la ionització de l'analít proteic per desorció suau. En contrast amb l'electrosprai, la proteïna ionitzada assoleix nivells de càrrega baixos; a l'espectre (requadre) poden observar-se pics corresponents a espècies mono-moleculares amb càrrega +1 ($m/z = 25\ 700$) i +2 ($m/z = 12\ 800$), així com un dímer no covalent amb càrrega +1 ($m/z = 51\ 500$).

gon. Els paquets d'ions generats en cada descàrrega, accelerats aplicant un voltatge entre la placa de suport de la mostra i l'extrem de la cambra d'ionització, se separen en un tub de vol, un dispositiu analitzador clàssic que mesura el temps de vol (TOF, *time of flight*) dels diversos ions. Aquests temps es poden relacionar amb els corresponents valors m/z mitjançant una senzilla expressió: $t = k (m/z)^{1/2}$ on k és una constant instrumental. Els equips d'espectrometria de masses MALDI-TOF, que combinen la ionització per desorció suau amb làser i l'anàlisi de massa per temps de vol, s'han convertit en una eina imprescindible d'anàlisi biomolecular i han conferit un notable impuls a la recerca en proteòmica.

El paper fonamental de l'EM en proteòmica

58

Tot i la sensible millora en exactitud que comporta respecte als mètodes convencionals, l'EM de proteïnes no hauria assolit

l'actual predicament si s'hagués circumscrit a la mesura de masses moleculars. En contrast amb l'EM de molècules orgàniques petites, que provoca la fragmentació química de l'analít i l'aprofita per extreure'n informació estructural, les tècniques que acabem de veure no indueixen nivells de fragmentació substancials, permeten tan sols accedir, almenys en primera instància, a la massa global de la proteïna, una informació valuosa, però totalment insuficient per a identificar-la de forma inequívoca.

Ben poc després que Fenn, Tanaka i altres introduïssin l'EM de biomolècules que acabem de veure, va fer-se avinent la percepció que el veritable potencial d'aquestes tècniques rauria no tant en la determinació de pesos moleculars, com en la seva aplicació a l'elucidació d'estructures primàries de proteïnes, és a dir, com a alternativa al mapeig peptídic clàssic.

Els procediments clàssics de determinació d'estructura primària de proteïnes (que molts segurament recordaran haver efectuat com a exercicis en els cursos de bioquímica) so-

lien iniciar-se amb una digestió de la proteïna amb proteases que l'escindien en posicions específiques. Els fragments peptídics resultants de cada digestió se separaven per cromatografia i se sotmetien cadascun a seqüenciació d'Edman. El conjunt d'aquests mapes peptídics permetia, amb no poc esforç, reconstruir l'estructura primària i caracteritzar així la proteïna.

Els espectaculars avenços de la biologia molecular en els darrers anys han fet assequibles els genomes de molts organismes i, per tant, les estructures primàries de les seves proteïnes, recopilades en bases de dades informàtiques. Aquest veritable tresor d'informació, junt amb la sensibilitat, exactitud i —sobretot— rapidesa amb què es poden determinar les masses de pèptids per MALDI-TOF, s'han combinat sinèrgicament per a possibilitar la identificació de proteïnes amb elevada fiabilitat i estalvi de temps i d'esforç, respecte als procediments convencionals. Tot això ha comportat un impuls extraordinari per a la *proteòmica*, definida (per analogia amb la genòmica) com el conjunt de tècniques analítiques que permeten identificar i quantificar el *proteoma*, és a dir, el perfil de proteïnes d'una cèl·lula, un organisme o un teixit en condicions especificades.

A tall d'exemple, ja que el tema excedeix força l'àmbit d'aquesta ressenya, descriurem breument una de les tècniques proteòmiques més habituals, l'anàlisi de perfils proteolítics per EM MALDI-TOF, també conegut com a *peptide mass fingerprint* (PMF). En aquesta aproximació, una proteïna d'una determinada espècie biològica (p. ex., d'*Homo sapiens*) es di-

gereix amb una proteasa (molt sovint tripsina) i la barreja de pèptids resultants, sense ulterior separació, s'analitza tot seguit per EM MALDI-TOF. La considerable singularitat de les seqüències proteiques (és a dir, el fet que la degeneració d'una seqüència respecte a la resta del proteoma d'una mateixa espècie sigui pràcticament nul·la) fa que el conjunt de masses que defineixen els pèptids resultants de la digestió constitueixi una característica intrínseca de la proteïna, una mena d'empremta digital que permet identificar-la.

Això s'aconsegueix per mètodes bioinformàtics, comparant l'espectre experimental (el del conjunt de pèptids produïts en la digestió) amb cadascun dels espectres de massa teòrics que resulten de digerir *in silico* el proteoma complet d'*Homo sapiens*, disponible a les bases de dades. En aquest proteoma hi haurà algunes proteïnes, el perfil proteolític *in silico* de les quals serà relativament coincident amb l'experimental, la qual cosa permet ordenar, en funció del seu encaix amb les dades experimentals, les diverses proteïnes i triar-ne la més plausible. Tot i el seu caràcter probabilístic, el mètode (figura 6) és de considerable fiabilitat.

En altres modalitats encara més resolutives d'anàlisi proteòmica per EM, algun dels ions (de pèptids) obtinguts en la digestió anterior se separa de la resta d'ions —en un quadrupol— i es redirigeix a una cambra de col·lisió on es fragmenta; s'obté així un espectre secundari característic que pot emprar-se per a una seqüenciació de *ново* o per a una identificació directa del pèptid (figura 7). Aquesta identificació sol comportar, per extensió, la de la proteïna. Tècniques com aquestes i

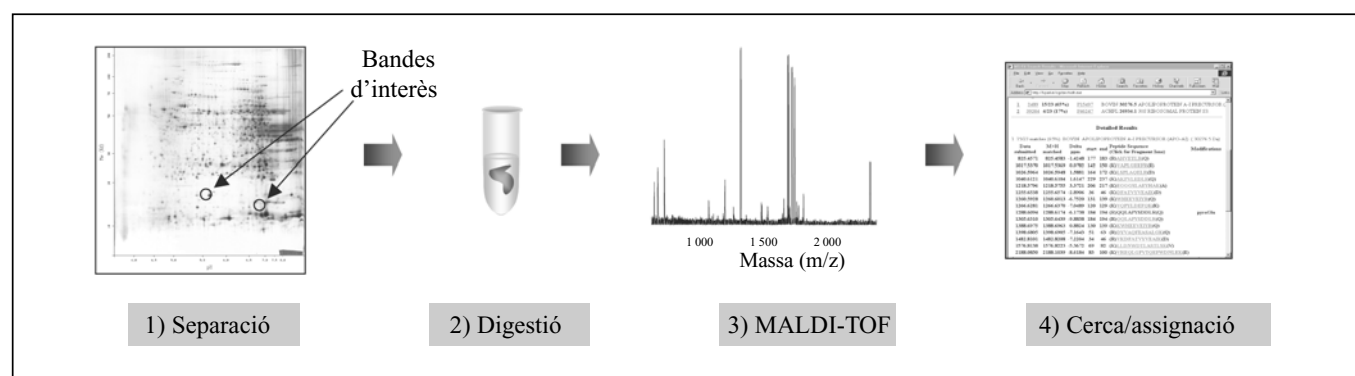


FIGURA 6. Etapes principals en la identificació d'una proteïna per PMF. 1) L'electroforesi bidimensional d'un proteoma permet (per comparació amb un gel de referència) identificar bandes d'expressió diferencial que se seleccionen per a l'anàlisi. 2) La proteïna es digereix sobre la banda, retallada del gel. 3) Els pèptids producte de la digestió s'analitzen per EM MALDI-TOF. 4) El conjunt de masses obtingudes es compara informàticament amb les de la digestió *in silico* de totes les proteïnes del mateix proteoma. La proteïna amb perfil proteolític més proper a l'experimental s'identifica com a estructura més probable.

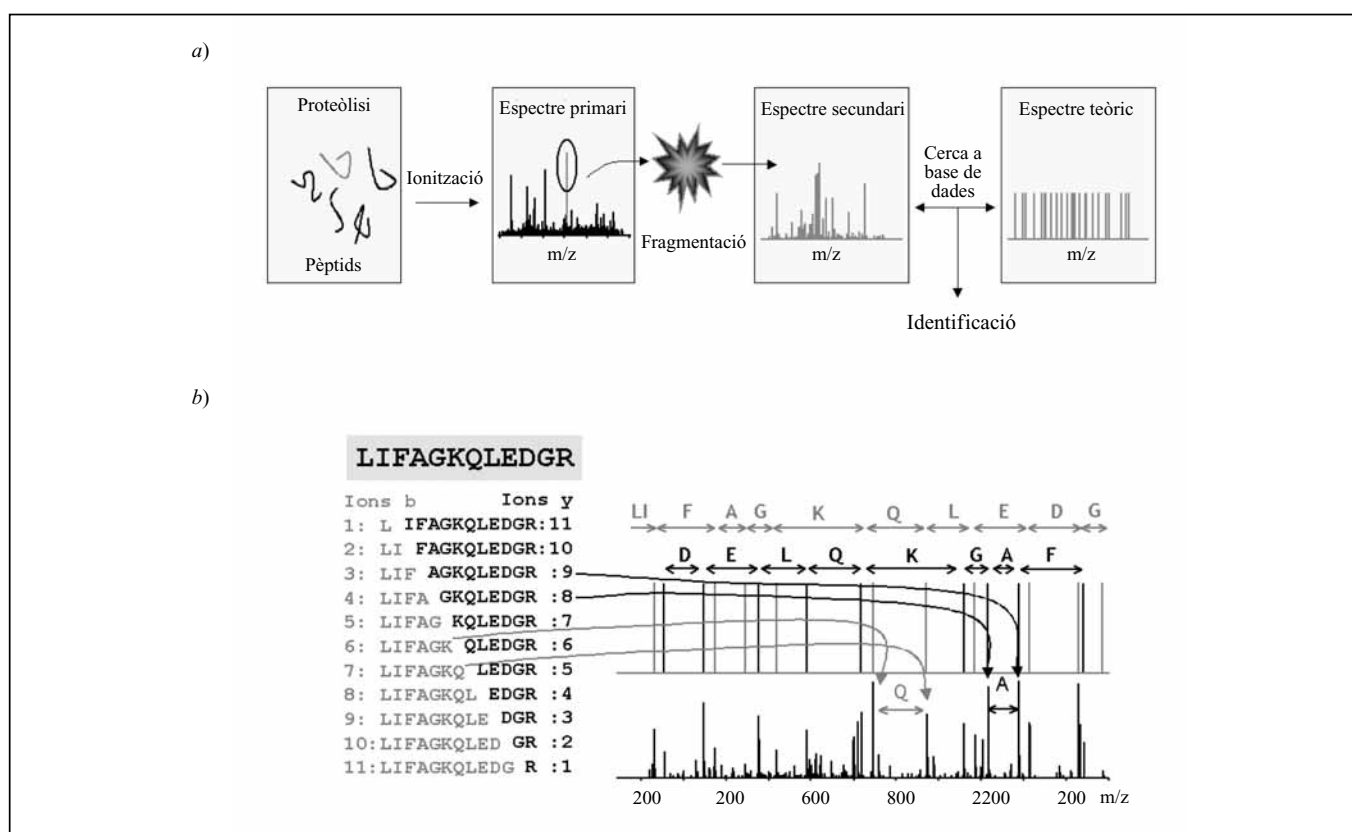


FIGURA 7. Identificació d'una proteïna a partir del patró de fragmentació d'un dels seus pèptids constituents per espectrometria de masses (MS/MS).

a) El conjunt de pèptids resultant de la digestió s'analitza per electroesprai (espectre primari). El quadrupol de l'instrument, actuant de filtre iònic, selecciona un dels pics (pèptids) d'aquest espectre primari, que per col·lisió amb un gas inert en un dispositiu adequat es fragmenta i dona un espectre secundari. Els pics d'aquest espectre, corresponents a les diverses fragmentacions possibles del pèptid seleccionat, s'envien a una base de dades que, segons la massa del pèptid i el patró de fragmentació, permet identificar la seqüència i, per extensió, la proteïna original.

b) Visió simplificada de la fragmentació del pèptid LIFAGKQLEDGR. Entre els diversos ions produïts hi ha els de tipus b (gris) i y (negre), que corresponen a l'escissió dels enllaços peptídics: a la fragmentació que dona lloc als ions b, la càrrega es localitza al fragment N-terminal; a la que genera els ions y, el fragment carregat és el C-terminal. Les diferències de massa entre ions d'una determinada sèrie de fragmentació (b, y, etc.) corresponen als residus d'aminoàcid progressivament escindits i defineixen per tant la seqüència.

altres de relacionades comporten un augment espectacular en la capacitat d'analitzar proteïnes amb fiabilitat, sensibilitat i rapidesa. En aquest sentit, la proteòmica ha esdevingut molt ràpidament una de les eines fonamentals de l'actual recerca biomèdica.

En conjunt, els dos processos d'ionització suau premiats amb el Nobel de Química del 2002 i que aquí hem ressenyat succintament, pot dir-se que han configurat, en la seva eficàcia i complementarietat, un veritable canvi de paradigma, que ha permès que l'espectrometria de masses transcendís els límits de la física i la química on fins no fa gaire es desenvolupava, i irrompés amb força en el camp de les biomolècules. Una situació, d'altra banda, molt similar a l'experimentada per la RMN,

gràcies a les aportacions de Wüthrich i altres. En resum, dos escenaris de progrés espectacular en àrees de la química amb forta projecció sobre les ciències de la vida que la Fundació Nobel, amb el premi del 2002, ha volgut reconèixer com cal.

Agraïments

Estic en deute amb diversos col·legues que han fet aportacions molt constructives a aquest treball i que han contribuït a fer-lo entenedor per a un públic el més ampli possible. En particular, a les doctores Margarida Gairí i Maria Antònia Molins, de la Unitat de RMN d'Alt Camp (Serveis Científic-Tècnics, PCB-UB), per la lectura crítica i suggeriments efectuats a

la secció sobre RMN de proteïnes. També agraeixo a les doctores Cristina Chiva, Mari Luz Valero i Judit Villén, col·laboradores meves a la Unitat de Proteòmica de la Universitat Pompeu Fabra, les seves aportacions.

Referències bibliogràfiques

- 1) ERNST, R. *Nobel Lectures, Chemistry 1991-1995*. Singapur: World Scientific Publishing Co., 1996, p. 12-57.
- 2) WÜTHRICH, K. «NMR - this other method for protein and nucleic acid structure determination». *Acta Cryst.*, D51 (1995), p. 249-270.
- 3) WAGNER, G.; KUMAR, A.; WÜTHRICH, K. «Systematic application of two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance techniques for studies of proteins. 2. Combined use of correlated spectroscopy and nuclear Overhauser spectroscopy for sequential assignments of backbone resonances and elucidation of polypeptide secondary structures». *Eur. J. Biochem.*, núm. 114 (1981), p. 375-384.
- 4) WAGNER, G.; WÜTHRICH, K. «Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra: basic pancreatic trypsin inhibitor». *J. Mol. Biol.*, núm. 155 (1982), p. 347-366.
- 5) JEENER, J.; MEIER, B. H.; BACHMANN, P.; ERNST, R. R. *J. Chem. Phys.*, núm. 71 (1979), p. 4546-4553.
- 6) PERVUSHIN, K.; RIEK, R.; WIDER, G.; WÜTHRICH, K. «Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94 (1997), p. 12366-12371.
- 7) RIEK, R.; WIDER, G.; PERVUSHIN, K.; WÜTHRICH, K. «Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 96 (1999), p. 4918-4923.
- 8) RIEK, R.; PERVUSHIN, K.; WÜTHRICH, K. «TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution». *Trends Biochem Sci.*, núm. 25 (2000), p. 462-468.
- 9) FIAUX, J.; BERTELSEN, E. B.; HORWICH, A. L.; WÜTHRICH, K. «NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex». *Nature*, núm. 418 (2002), p. 207-211.
- 10) DOLE, M.; MACH, LL.; HINES, R. L.; MOBLEY, R. C.; FERGUSON, L. D.; ALICE, M. B. «Molecular beams of macroions». *J. Chem. Phys.*, núm. 49 (1968), p. 2240-2247.
- 11) FENN, J. B. *et al. Proc. 36th Annual Conference*. San Francisco: Am. Soc. for Mass Spectrom., 5-10 juny 1988, p. 773.
- 12) FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F., WHITEHOUSE, C. M. «Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules». *Science*, núm. 246 (1989), p. 64-71.
- 13) TANAKA, K.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. *Proc. Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*. Osaka: Matsuda, H.; Xiao-Tian, L., 15-18 setembre de 1987, p. 185-188.
- 14) YOSHIDA, T.; TANAKA, K.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y. *Mass Spectroscopy [Japó]*, núm. 36 (1988), p. 59.
- 15) TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T. «Protein and polymer analysis up to m/z 100.000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry». *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, núm. 2 (1988), p. 151-153.
- 16) ALEKSANDROV, M. L.; GALL, L. N.; KRASNOV, V. N.; NIKOLAEV, V. I.; PAVLENKO, V. A.; SHKUROV, V. A. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, núm. 277 (1984), p. 379-383.
- 17) KARAS, M.; HILLENKAMP, F. «Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons». *Anal. Chem.*, núm. 60 (1998), p. 2299-2301.

Autor

David Andreu (1953) es va formar com a químic orgànic a la Universitat de Barcelona, on es va doctorar el 1981 amb una tesi sobre síntesi de pèptids. Del 1982 al 1985 va continuar la recerca en aquest camp a la Universitat Rockefeller de Nova York en el laboratori de Bruce Merrifield, que durant aquells anys (1984) va rebre el Premi Nobel de Química per haver inventat les tècniques de síntesi en fase sòlida. A finals de 1985 va retornar a la Universitat de Barcelona com a professor titular de química orgànica. Des del 2002 és catedràtic de Química al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut de la Universitat Pompeu Fabra, on dirigeix un grup de recerca en proteòmica i química de pèptids.