

Anal. Real Acad. Nal. Farm., 2003,

## **Métodos revolucionarios para el análisis de macromoléculas**

GUILLERMO GIMÉNEZ GALLEGO

*Académico de Número Electo de la Real Academia  
Nacional de Farmacia*

### **INTRODUCCIÓN**

El premio Nobel de química del año 2002 ha ido destinado a premiar la puesta a punto, para adecuarlos al estudio de macromoléculas, de dos métodos analíticos muy populares en química: la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. El premio por los desarrollos en espectrometría de masas ha sido concedido a los doctores John Fenn, Profesor de la Commonwealth University de Virginia y Emérito de la Universidad de Yale y Koichi Tanaka, Ingeniero de la Compañía Shimadzu. El de resonancia magnética nuclear ha sido concedido al Profesor Kurt Wütrich de la Escuela Técnica Superior de Zurich. El profesor Wütrich fue un estrecho colaborador del Profesor Ernst, de la misma institución, que recibió el premio Nobel el año 1991 por sus contribuciones al desarrollo de la resonancia magnética nuclear moderna.

### **LAS MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS: INTERÉS DE SU ESTUDIO**

Todos los organismos vivos contienen compuestos químicos de peso molecular superior a la decena de kilodaltons, a los que generalmente se suele englobar bajo la denominación de macromoléculas biológicas. Estas macromoléculas pertenecen a tres grupos químicos principales: las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos. Con frecuencia

aparecen asociadas entre sí o con otros compuestos químicos de menor masa molecular formando complejos que pueden llegar a tener tamaños enormes. Las macromoléculas biológicas juegan un papel primordial en la química de la vida, ya sea “dirigiéndola” a modo de programa informático, caso de los ácidos nucleicos, ya sea como agentes ejecutores de las instrucciones de ese programa, caso primordialmente de las proteínas. Una vez dilucidado el genoma (el conjunto de macromoléculas que almacenan las instrucciones del programa que rige el funcionamiento de la célula) de una fracción importante de los principales organismos tipo, el problema ahora es determinar cómo esas instrucciones son ejecutadas por el resto de las macromoléculas y sus asociaciones. El estudio de las proteínas bajo esta perspectiva constituye el objetivo de esta moderna disciplina biológica de frontera conocida como Proteómica. Tanto la espectrometría de masas como la resonancia magnética nuclear, a través de las aproximaciones desarrolladas por los doctores Fenn, Tanaka y Wütrich constituyen en estos momentos una de las bases más sólidas de la Proteómica. De ahí lo justificado del premio.

## **LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE MACROMOLECULAS**

La espectrometría de masas es una técnica que data de los comienzos del siglo XX. Esta técnica se desarrolló con vistas a determinar el peso molecular de los compuestos químicos. En la actualidad, la espectrometría de masas es una técnica de gran exactitud, sensibilidad y rapidez, y permite además llevar a cabo sus determinaciones en mezclas químicas complejas. Todo este conjunto de propiedades han convertido a la espectrometría de masas en una de las técnicas más potentes para identificar compuestos. Por ello ha encontrado aplicaciones amplísimas en la industria química y farmacéutica y en los procedimientos de controles de calidad.

La espectrometría de masas trabaja siempre con moléculas en estado gaseoso y con cargas del mismo signo. Una vez en estado gaseoso las moléculas son separadas en vacío de acuerdo con su relación carga/masa, por procedimientos físicos, y detectadas. Sin embargo la espectrometría de masas no resultó aplicable por muchos años a las macromo-

léculas biológicas por no ser de fácil aplicación a estas los procedimientos tradicionales de vaporización. Al hablar de macromoléculas biológicas estamos hablando de moléculas lábiles y, a veces, como hemos apuntado en párrafos anteriores, de meras asociaciones macromoleculares no mediadas por verdaderos enlaces químicos que van de las decenas a las centenas de kilodaltons. El Prof. Fenn contribuyó al desarrollo de la espectrometría de masas para macromoléculas modificando adecuadamente la técnica de *electrospray* para volatilizar en forma altamente cargada eléctricamente, y sin inducir alteraciones, las macromoléculas y sus asociaciones. Desarrolló también un método de interpretación de los espectros de masas que permite determinar el tamaño de la molécula/complejo volatilizado con gran precisión. El Dr. Tanaka desarrolló un nuevo método de volatilización -asociado a ionización- de macromoléculas mediante rayos láser suficientemente suaves como para no dañar la estructura química de las macromoléculas o sus asociaciones. La técnica desarrollada por el Dr. Tanaka es conocida por las siglas SLD (soft laser desorption). Esta técnica evolucionó rápidamente a lo largo de los años inmediatamente subsiguientes a su puesta a punto. Al final se ha impuesto la versión conocida por las siglas de MALDI (matrix-assisted, laser desorption ionisation). La técnica de *electrospray* es tan suave que puede utilizarse para separar partículas de virus completos sin que se disocien sus distintos componentes y sin que, consecuentemente, resulte afectada su capacidad infectiva.

### **LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DE LA VOLATILIZACIÓN E IONIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS MEDIANTE ELECTROSPRAY**

Los primeros experimentos describiendo el fenómeno de *electrospray* fueron llevados a cabo por el físico John Zeleny en 1917. Malcom Dole llevó a cabo una descripción más detallada del proceso en 1968. En 1976 Iribarne y Thomsom propusieron el modelo físico del fenómeno generalmente más aceptado en estos momentos. Fenn usó su experiencia en expansión de corrientes libres de gases para perfeccionar el método de Dole. En el proceso de *electrospray* desarrollado por el Prof. Fenn, la

solución del soluto a analizar es introducida en una cámara a un flujo de unos pocos microlitros por minuto a través de un capilar metálico. Este capilar es mantenido a una diferencia de potencial del orden de kilovoltios con respecto a las paredes de la cámara lo que lleva a una acumulación importante de cargas del mismo signo en la superficie de la solución que asoma a la cámara a través de este, al adquirir el potencial del capilar. Esta acumulación de cargas que se repelen por ser del mismo signo hace que la superficie de la solución estalle dispersándose en microgotitas de entre 0.5 y 1 micrometro, extremadamente cargadas, que se dirigen fundamentalmente hacia la pared de la cámara situada enfrente del capilar. Por esta cámara circula un gas inerte a una temperatura entre 50 y 70 grados centígrados que hace que las gotas empiecen a evaporarse rápidamente. Como consecuencia de ello aumenta la concentración de cargas de signo opuesto lo que lleva a que la gota estalle de nuevo en cuanto las fuerzas de repulsión superan a las de la tensión superficial. Esta explosión se conoce con el nombre de **explosión culómbica** o de **explosión de Rayleigh**. Las nuevas gotitas siguen evaporándose con lo que se producen nuevas explosiones sucesivas que van disminuyendo su diámetro. Llega un momento en que cuando la gota tiene un diámetro de unos 10 nanómetros, la densidad de carga es tal que los iones empiezan a desolvatarse mediante un proceso denominado **evaporación de iones**, a través de unas estructuras transitorias que se forman en la superficie de la gotita conocidas como **conos de Taylor**. Los iones que se desolvatan con van con frecuencia asociados a moléculas del soluto a analizar formando lo que se denomina iones “quasi-moleculares”. Gracias a la aparición de éstos, el soluto a analizar adquiere ya el estado gaseoso apropiado para el análisis de masas.

Los iones quasi-moleculares presentan una enorme variedad de carga: de 2 a 50. Esto da lugar a unos espectros complejos con numerosos picos de acuerdo con el número de iones que acompañan a la macromolécula. Estos espectros desconcertaron inicialmente a los espectrometristas, pero Fenn cayó en la cuenta de que se podía sacar partido de esta complejidad para aumentar la exactitud de la determinación del peso molecular. De la diferencia en masa aparente entre dos picos puede deducirse la naturaleza del ión que acompaña a la macromolécula (ordinariamente,  $H^+$ ,

$\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ ). Conocido éste, por el efecto de desplazamiento que produce la diferencia de un ión más en la masa aparente de la macromolécula (la diferencia entre dos picos consecutivos), puede deducirse la masa real de ésta mediante un sencillo sistema de dos ecuaciones lineales, a partir de la ecuación  $K_i - m_a = (M - im_a)/i$  ( $K_i$ , valor aparente de  $m/z$ ;  $m_a$ , masa del ión;  $M$ , la masa de la macromolécula;  $i$ , el número de cargas). Como esto puede hacerse con todos los pares posible de picos observados, se puede obtener la media de un número muy elevado de observaciones que es lo que da lugar al alto grado de precisión de la medida.

### **LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS A PARTIR DE LA VOLATILIZACIÓN E IONIZACIÓN DE MACROMOLÉCULAS MEDIANTE LASER**

La idea tras esta técnica es que un pulso corto de radiación láser que incida en un volumen extremadamente pequeño y preciso de una solución debe provocar una vaporización rápida y extremadamente localizada del solvente de ese volumen. Esa vaporización llevará obviamente consigo el subsiguiente paso a estado gaseoso de los solutos localizados en ese punto al desaparecer el solvente. Este procedimiento se demostró que era verdad para el caso de solutos de pequeño peso molecular, pero parecía inviable para las macromoléculas, en concreto para las proteínas, hasta los trabajos de Koichi Tanaka. La clave del éxito de este ingeniero estuvo en escoger un láser de la longitud de onda adecuada (una longitud de onda a la que no es absorbido por las proteínas) y de la intensidad suficiente para vaporizar el solvente sin que llegara a transmitirse suficiente energía a las proteínas para que estas se degradaran. Koichi Tanaka utilizó un láser de nitrógeno que emite a 337 nanómetros (el máximo de absorción de mayor longitud de onda de las proteínas está situado a 280 nanómetros) e iluminaba con una energía de  $20 \text{ mJ/cm}^2$ . Koichi Tanaka observó también que era fácil escoger las condiciones de la solución para que la macromolécula desolvatada presentase un número moderado de cargas, idealmente una o dos. Koichi Tanaka utilizó soluciones de proteína en glicerol en los estudios que presentó en el Simposio Chino-Japonés de Osaka de 1987 que son los que le han hecho merecedor del

premio Nobel de química del 2002. La técnica puesta a punto por Koichi Tanaka pasó a ser denominada como SLD de acuerdo con las siglas de su denominación en inglés: *soft laser desorption*. Un año después de su descripción en el simposio de Osaka, M. Karas y F. Hillenkamp, que habían sido pioneros en el uso de la radiación láser para volatilizar compuestos con vistas a la espectrometría de masas, pusieron de manifiesto que la técnica de Tanaka también funcionaba si las macromoléculas estaban embebidas en una matriz cristalina con un espectro de absorbencia que solapara con el de emisión del rayo láser con exactitud. Pusieron de manifiesto, además, que podía conseguirse también escogiendo la matriz adecuada que la macromolécula incorporara mayoritariamente una sola carga. Esta aproximación es hoy día la variante más popular de la técnica de Tanaka y es conocida como MALDI, acrónimo de su denominación en inglés: *matrix-assisted, laser-desorption ionisation*.

La técnica de Tanaka ha dado hoy día lugar a un tipo de espectrómetro de masas muy popular denominado MALDI-TOF. TOF son las iniciales de *time of flight*, en español, tiempo de vuelo. Esta última técnica fue propuesta por William E. Stephens en 1946. En esencia se basa en que si disparamos una serie de iones con la misma energía desde un punto preciso y medimos el tiempo que tardan en llegar a otro también bien determinado, podremos calcular la masa de estos iones a partir del tiempo invertido en la trayectoria, dado que el tiempo que cada uno de ellos tardará en cubrir el recorrido será inversamente proporcional a su masa. El problema que encerraba la aplicación de esta técnica estribaba en que dado que los tiempos de vuelo son extremadamente cortos (milisegundos), es preciso determinar con muchísima exactitud el momento del disparo. En la técnica desarrollada por Koichi Tanaka, esto es relativamente fácil dado que los pulsos de laser, por su precisión y brevedad (unos pocos nanosegundos), pueden utilizarse como una excelente referencia del momento del disparo de salida.

## RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE MACROMOLÉCULAS

Antes de los trabajos de Kurt Wüthrich la estructura tridimensional de las proteínas solo podía ser determinada a partir de los espectros de difracción de rayos X de sus cristales. Por mucho tiempo se buscó la forma de determinar estas estructuras cuando las proteínas estaban en solución, sin necesidad de cristalizarlas. Kurt Wüthrich puso a punto el método para ello, utilizando para ello la espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear se basa en que el núcleo de determinados átomos como los del H, el  $C^{13}$  y el  $N^{15}$ , tienen un cierto carácter eléctricamente dipolar. Estos núcleos al girar, generan un campo magnético cuyo momento coincide con eje del radio de giro. Como consecuencia de ello, se comportan como verdaderos imanes. Al introducir estos átomos en un campo magnético, sus núcleos se orientarán de tal forma que la dirección y sentido de su momento magnético sea la misma que la del vector del campo. Una vez creada esta situación, los átomos pueden ser desviados de esta posición la energía adecuada, energía que corresponde a la de las frecuencias de radio. Una vez que hemos dejado de aplicar esta fuerza, los átomos volverán a su posición inicial mediante un movimiento de precesión alrededor del eje definido por el vector campo magnético. Como consecuencia de ello emitirán una radiación electromagnética, por la que devolverán al medio la energía recibida al sacarlos de su posición inicial. La frecuencia de esta radiación es también el de las ondas de radio. El núcleo de estos átomos bajo un campo magnético se comporta pues como un trompo girando cuando al ser desviado de la vertical y adquiere un movimiento de precesión alrededor del eje de giro vertical original. Desde el punto de vista de las ondas que emiten los núcleos de estos átomos se comportan también como las cuerdas de un instrumento musical.

Las cuerdas de un piano o cualquier otro instrumento musical las podemos hacer vibrar de dos formas. Una, pulsándola directamente. Otra,

produciendo un sonido fuerte en su cercanía. En este último caso, si acercamos nuestro oído al instrumento, veremos que éste, sin haberlo tocado directamente emite también su sonido. Es más, en el caso de instrumentos con más de una cuerda, veremos que cada una de ellas emite su sonido propio, no el que provocó el que entraran en vibración. Es decir, en términos físicamente más precisos, cada cuerda comienza a vibrar con su frecuencia característica. Si en esta situación repetimos el sonido inicial que las puso a vibrar podríamos observar que siguen vibrando, pero que además su vibración se ha alterado un poco de forma que empiezan a vibrar también con una oscilación compuesta: la suya propia, y la de las cuerdas más próximas. Algo parecido ocurre cuando los núcleos con un cierto carácter eléctricamente dipolar de los átomos de una molécula en un campo magnético reciben un pulso de radiofrecuencia de una potencia adecuada. Todos ellos comienzan a precesionar. Pero no todos, incluso los de la misma naturaleza, con la misma frecuencia pues cada uno, por estar en un sitio distinto de la molécula, adquiere una precesión propia característica. Con la instrumentación adecuada podremos registrar estas vibraciones electromagnéticas que emiten. Los estudios originales de Wüthrich se llevaron a cabo midiendo las vibraciones de los núcleos de los protones de las proteínas. Por simplicidad, aquí nos referiremos sólo a este sistema. El procedimiento es extrapolable, sin embargo al estudio de proteínas en que no sólo se observa el comportamiento de los protones sino de los núcleos de  $C^{13}$  y el  $N^{15}$ .

Un análisis de Fourier de las vibraciones emitidas por una solución de proteína en campo magnético irradiada con un pulso de radiofrecuencia adecuada nos va a permitir identificar la frecuencia a la que emite cada uno de los núcleos de sus protones. Si a continuación irradiamos la solución de proteína con series distintas de pulsos sucesivos, observaremos que los resultados del análisis de Fourier son distintos (cambia la intensidad de la frecuencia propia de cada uno de los protones) en función de los trenes de pulsos que hemos dado. El efecto de estos trenes de pulsos sobre la intensidad de la frecuencia característica del núcleo de cada protón puede representarse y someterse también a un análisis de Fourier. El espectro de frecuencias obtenido por este procedimiento nos va a poner en evidencia todas las frecuencias adicionales a la suya propia a las que



precesiona cada uno de los núcleos de los protones de la molécula. Estas frecuencias añadidas, como en el caso del instrumento musical, corresponden a la de los núcleos de los protones (ya identificados a partir del primer análisis de Fourier) que están cerca. Por la intensidad de estas frecuencias añadidas a la fundamental de los núcleos de cada uno de los protones se puede calcular también la distancia a la que se encuentra el protón responsable de la frecuencia añadida. Identificados qué protones de una proteína quedan próximos, podemos determinar unívocamente su estructura, pues sólo hay una forma de plegar en el espacio la cadena lineal polipeptídica para que sus protones queden a la distancia que hemos calculado. El desarrollo de esta técnica de adquisición y análisis de datos de resonancia magnética nuclear de proteínas es lo que ha valido a Kurt Wüthrich el premio Nobel de química de este año. La primera determinación completa de la estructura de una proteína utilizando el método de Wüthrich fue en 1985. En la actualidad entre el 15 y el 20% de los pocos miles de estructuras tridimensionales de proteínas conocidas han sido ya determinadas por resonancia magnética nuclear.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) BASUS, V. (1989) Proton nuclear magnetic resonance assignments. En *Methods in Enzymology*. Editores: Oppenheimer, N. J., y James, T. L. Vol. 177, pp. 132-149. academic Press, San Diego.
- (2) BRUINS, A. P. (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr.* 794-345.
- (3) FENN, J. B., MANN, M., MENG, C. K., WONG, S. F. AND WHITEHOUSE, C. M. (1989). Electrospray ionisation for mass spectroscopy of large biomolecules. *Science* 256- 64.
- (4) Información básica sobre la espectrometría de masas de macromoléculas volatilizadas e ionizadas mediante *electrospray* o por irradiación con rayos laser: <http://masspec.scripps.edu/information/intro/index.html>.
- (5) MANN, M., MENG, C. K., FENN, J. B. (1989). Interpreting mass spectra of multiply charged ions. *Anal. Chem.* 61 -1702.

- (6) SINCLAIR, B. (1999). MALDI-TOF goes mainstream: laser desorption mass spectrometers for multisample analysis. *The Scientist* 13-18
- (7) WÜTHRICH, K. (1989). Determination of three-dimensional protein structures in solution by nuclear magnetic resonance: and overview. En *Methods in Enzymology*. Editores: Oppenheimer, N. J., y James, T. L. Vol. 177, pp. 125-131. Academic Press, San Diego.
- (8) WÜTHRICH, K. (1990). Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 265 - 22059.
- (9) WÜTHRICH, K. (2001). The way to NMR structures of proteins. *Nature Struct. Biol.* 8 -923.