

Análisis estructural de proteínas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas

*Federico del Río Portilla**

Desde el comienzo de los tiempos el hombre ha tratado de escudriñar y comprender los diferentes fenómenos que acontecen a su alrededor. La vida es uno de esos fenómenos que la humanidad ha tratado de explicar y comprender, dándole múltiples explicaciones. Hoy sabemos que todos los seres vivos poseen el mismo tipo de moléculas, las cuales gobiernan cada una de las funciones que ellos mismos realizan. En tiempos modernos se ha tratado de correlacionar el arreglo de los átomos en una molécula con la función o reactividad que ella tiene. Este hecho ha permitido el desarrollo de la ciencia conocida como proteómica, el estudio de las proteínas. Las técnicas analíticas han sido y están siendo herramientas fundamentales para que los bioquímicos intenten comprender el proceso vital y el papel que las proteínas juegan en este proceso.

En el año de 1962 Max Perutz y John Kendrew compartieron el premio Nobel de Química (Nobel de Química 1962)[Cita electrónica] por haber obtenido por cristalografía de rayos X la primera estructura proteica, la mioglobina. Por muchos años la difracción de rayos X por cristales únicos fue la única técnica que determinaba estructuras de macromoléculas bioquímicas. Treinta y ocho años después se le da el premio Nobel de Química a investigadores que contribuyeron a la aplicación de la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) al análisis y determinación de estructuras de proteínas. La mitad del premio fue otorgado a los investigadores John B. Fenn y Koichi Tanaka, por la implementación del método de ionización por "electrospray" y por la aplicación de la ionización suave por rayos láser en EM para el análisis de macromoléculas biológi-



John B. Fenn

cas. La otra mitad del premio fue otorgado a Kurt Wüthrich, por el desarrollo de métodos en RMN para la identificación y análisis estructural de macromoléculas biológicas.

En el presente trabajo se explicarán las contribuciones de estos investigadores que merecieron dicho premio, para lo cual se describirán brevemente los fundamentos de las técnicas de EM y de RMN.

Espectrometría de masas

La EM es una técnica analítica en la cual los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, posteriormente separados de acuerdo con su relación masa / carga (m/z) y posteriormente detectados. La EM [Larse y McEwen, 1998] nace en 1886 cuando Golstein descubre los iones positivos en un tubo de descarga eléctrica a baja presión. Wien (N. Física 1911) en 1898 muestra que los rayos de esos iones podían ser desviados por campos eléctricos y magnéticos. Entre 1912 y 1919, Aston (N. Química 1922) y J. J. Thomson (N. Física 1906) realizaron modificaciones a la técnica. Para 1924, Aston fue capaz de determinar las abundancias isotópicas de más de 50 elementos. Pero no fue sino hasta los años cuarenta que se popularizó su uso en Química. Hoy en día existen diferentes tipos de espectrómetros de masas comercialmente disponibles. Los detalles de ellos difieren en la forma en que se realizan los diferentes procesos requeridos para realizar el fenómeno. En forma esquemática podemos decir que los espectrómetros de masas consisten de tres secciones fundamentales: 1) Sistema de introducción de muestra; 2) Cámara de ionización; 3) Analizador y 4) Detector.

Las modificaciones instrumentales han sido de la mayor trascendencia en la EM. Los analizadores, que comenzaron siendo sectores magnéticos, han evolucionado a sectores de cuadrupolo, sextupolos, octupolos, trampa de iones, analizadores por tiempo de vuelo, llegando a contener uno o dos sectores para lograr una mayor precisión.

Las modificaciones de Fenn y Tanaka fueron en la manera de introducción y en la forma de ionización de la muestra. En los inicios de la EM la introducción de la muestra era un problema. Para que el

*Instituto de Química, Ciudad Universitaria s/n, 04510 México, D.F.
Correio electrónico: jfrp@servidor.unam.mx
Artículo solicitado al autor por el director de la revista.

compuesto fuese ionizado, era requisito fundamental tener la muestra en fase gaseosa. Por ello, sólo se podía obtener espectros de masas de aquellos compuestos que vaporizaran o sublimaran de forma estable. Posteriormente se modificaron los equipos y la introducción de muestra se realizó en forma directa, lo que provocó un incremento en el número de compuestos analizados. Pese a todas estas mejoras en la técnica, seguían existiendo un gran número de compuestos que no podían analizarse. El ejemplo del azúcar (sacarosa) es muy conocido, no se puede evaporar o sublimar, ni a presiones muy bajas (10^{-7} mmHg). A este respecto, los químicos propusieron una solución al problema, comenzaron a obtener derivados que fueran volátiles y estables. Sin embargo, ésta no es la solución más viable cuando el compuesto es desconocido, o cuando la molécula es tan grande que no es factible la formación de derivados.

La búsqueda de nuevas formas de ionización suaves emplearon el bombardeo de iones para ionizar a las moléculas. Esta acción provocaba que la muestra se ionizara y sublimara al mismo tiempo, aunque frecuentemente las moléculas eran destruidas. Para evitar que las moléculas se fragmentaran por la colisión, Barber [1981] generó un medio químico protector no volátil adyacente a las moléculas bajo análisis para permitir que compuestos polares y lábiles pudieran ser volatilizados y ionizados en un mismo proceso sin ser destruidos. La técnica se llama "Fast Atom Bombarder" o FAB. Este método no solucionó el problema de obtener espectros de masas de proteínas de alto peso molecular, pero la solución estaba en camino.

Ionización "electrospray"

El principio del electrospray o "electrospray" se conoce desde 1917 [Larse y McEwen, 1998]. Consiste en generar gotas cargadas muy pequeñas. El agua de la gota se irá evaporando gradualmente hasta un punto donde el número de cargas electrostáticas repulsivas en la superficie es tan grande con relación al tamaño de la gota que se produce una explosión, debida a la repulsión de las cargas en la gota. Esta explosión genera un gran número de gotas cargadas más pequeñas y, dependiendo de las condiciones iniciales, el proceso se puede repetir nuevamente. Dole [1968] empleó un gas inerte para favorecer la desolvatación en los análisis de espectrometría de masas en polímeros de poliestireno de alto peso molecular. Logró obtener masas considerablemente altas.

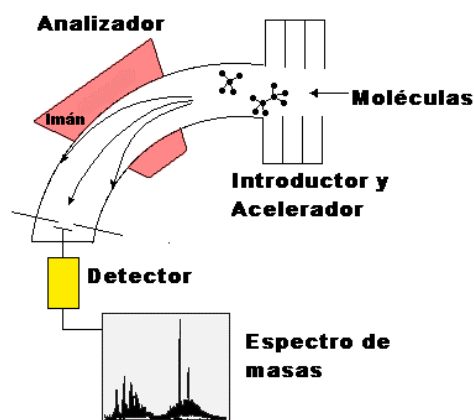


Figura 1. Esquema de los equipos de espectrometría de masas. La introducción e ionización de la muestra se esquematizan como cámaras separadas.

Pero fue hasta 1988 cuando Fenn en un congreso en San Francisco [Fenn, 1988] presentó espectros de proteínas de hasta 40 kDa. En ese momento mostró que era posible obtener la masa molecular de moléculas grandes con precisión del 0.01%. Fenn [1989] logró mejorar el método de Dole con un gas a contra flujo, favoreciendo la evaporación del agua, evitando la re-solvatación de los recién formados iones multicargados de biomoléculas. La relación m/z es fun-

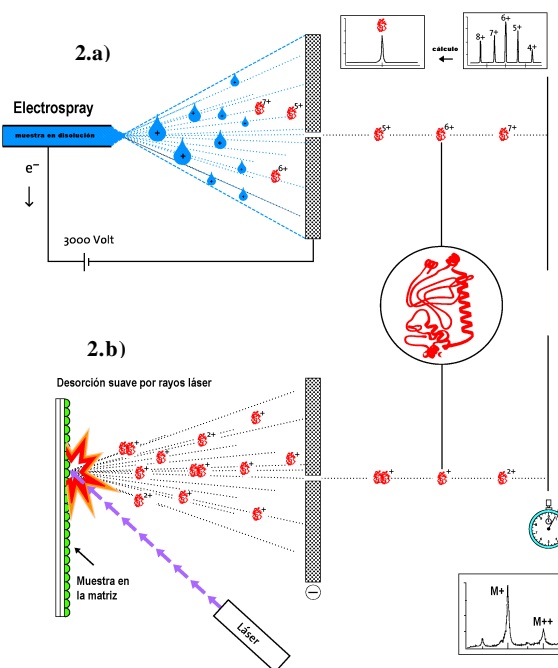


Figura 2. a) Esquema del sistema de electrospray. b) Sinopsis del método de ionización suave por rayos láser. En ambos casos la relación m/z es determinada por tiempo de vuelo y se obtienen iones policargados.



Koichi Tanaka

ción del tiempo que tardan en llegar los iones al detector; a este proceso se le denomina detección por tiempo de vuelo (figura 2a).

Fenn desarrolló una teoría en la cual explica que los estados de diferentes cargas pueden interpretarse como mediciones independientes de la masa molecular. Mediante un proceso de promedios con base en resolución de ecuaciones simultáneas puede determinarse la masa molecular de moléculas grandes con gran precisión.

La sensibilidad de la técnica se encuentra en los atomoles. Este tipo de ionización ha resultado ser el método menos invasivo y permite estudios de complejos moleculares que únicamente tienen interacciones no-covalentes débiles, tales como proteína-proteína, enzima-sustrato o complejos proteína-ligante.

Desorción suave por rayos láser

Durante los años ochenta varios grupos trataron de resolver el problema de volatilización e ionización de la EM usando rayos láser como una fuente de energía. Enfocando un rayo de luz en un pequeño punto de una muestra sólida o líquida, uno podría ser capaz de evaporar una pequeña parte de la muestra, evitando su degradación.

Fue en un congreso en Osaka, cuando Koichi Tanaka [1987], presentó los espectros de masas de la

quimotripsina (25,717 Da), carboxipeptidasa A (34,472 Da) y citocromo C (12,384 Da). Ello lo logró mediante una combinación adecuada de la absorbancia, las propiedades de transferencia de calor de la matriz y la estructura molecular del analito presente en la matriz con la energía y la longitud de onda del láser. Tanaka[1988] mostró que los iones gaseosos macromoleculares pueden formarse usando un láser de baja energía (de nitrógeno). La longitud de onda del láser de nitrógeno, 330 nm, impide que la radiación sea absorbida por los aminoácidos aromáticos, lo cual impide la fragmentación de las proteínas (figura 2b).

Resonancia magnética nuclear

Kurt Wüthrich [1986] tuvo la visión de agrupar a varios investigadores que hicieron posible que la resonancia magnética nuclear (RMN) determinara estructuras de proteínas.

La mayoría de los núcleos atómicos poseen espín, la cual es una propiedad de las partículas que componen a los átomos. Al momento de introducir estos átomos con espín a un campo magnético intenso, el núcleo se comporta como un pequeño imán. El momento magnético del núcleo tiende a orientarse preferentemente a favor del campo magnético aplicado. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación, se dice que el sistema está en resonancia. En este momento es cuando se realiza el fenómeno de resonancia magnética nuclear. La energía aplicada corresponde a radiación electromagnética de la región de las radiofrecuencias.

Cada tipo de núcleo, ^1H , ^{13}C o ^{15}N , absorben en una región específica. Sin embargo, no todos los núcleos de todas las moléculas absorben a la misma energía; existen pequeñas variaciones que dependen preferentemente de la densidad electrónica que lo rodea, o entorno químico. Esta característica, conocida como desplazamiento químico, ayuda a identificar cada protón en una molécula. Si la molécula es muy pequeña, esta caracterización es relativamente sencilla. El problema se incrementa al aumentar el número de núcleos presentes en la molécula. En una proteína de 60 aminoácidos se tiene en promedio 800 núcleos de ^1H , los cuales darían cada uno una señal de RMN.

Existen cuatro niveles estructurales en las proteínas: 1) el primer nivel lo constituye la secuencia de los aminoácidos en la proteína; 2) los aminoácidos por diferentes puentes de hidrógeno se pliegan en

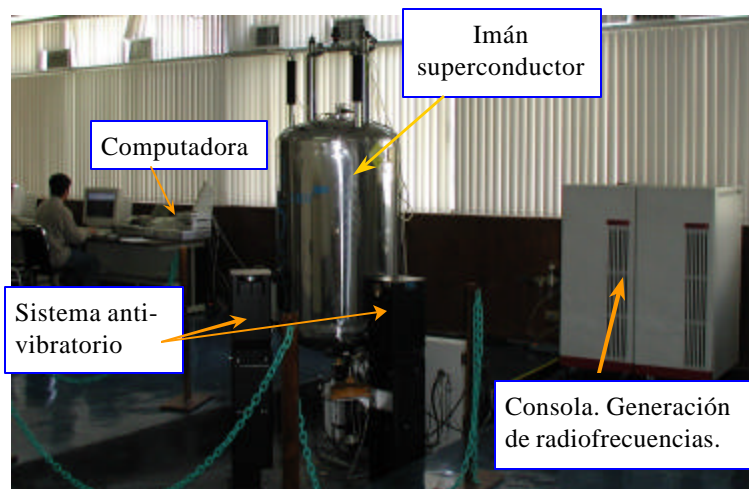


Figura 3. Equipo de resonancia magnética nuclear de 11.25 T, el protón resuena a 500 MHz, de aquí el nombre del equipo. Este campo magnético es el mínimo requerido para poder estudiar macromoléculas bioquímicas.

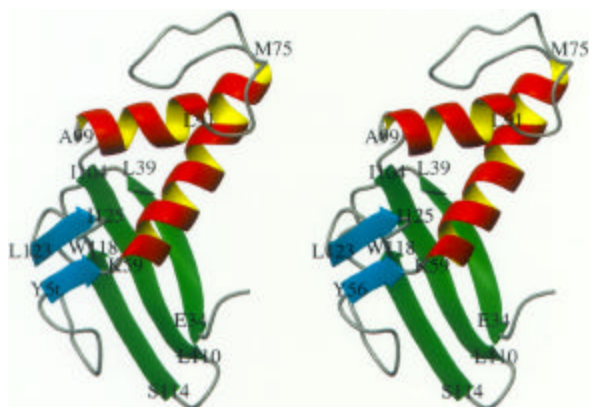


Figura 4. Representación estereográfica de la estructura de la proteína h-RPABC subunidad de la RNA polimerasa humana (Nature Structural Biology, 6 (1999) 1039-1042).

hélices α o en hojas β ; 3) diferentes estructuras secundarias se pueden agrupar por atracciones electrostáticas o fuerzas de van der Waals, y 4) las proteínas se agrupan entre ellas para formar el último nivel conformacional.

La RMN requiere de conocer la secuencia de los aminoácidos en la proteína para poder determinar la estructura secundaria y terciaria [Wagner *et al.*, 1981; Wüthrich *et al.*, 1982; Wagner y Wüthrich, 1982], para lo cual se necesita la asignación de todos protones en la proteína. El efecto nuclear Overhauser, o NOE por sus siglas en inglés, juega un papel fundamental para la determinación de macromoléculas bioquímicas. El NOE se presenta cuando dos núcleos de protón se encuentran a menos de 5×10^{-10} metros, siendo proporcional a la distancia entre los núcleos involucrados. Este efecto se cuantifica y es posible establecer a qué distancia se encuentran los diferentes núcleos. Las distancias se emplean para incluirlos como restricciones en cálculos de dinámica molecular para así obtener la estructura de las proteínas [Havel *et al.*, 1979].

Existen grandes ventajas al poder obtener la estructura de las proteínas por RMN: se determinan en el mismo medio en el cual ejercen su función; se pueden modificar las condiciones con las cuales se obtiene la estructura, como pH, temperatura y fuerza iónica; se pueden determinar cambios conformacionales en presencia de diferentes sustratos, hecho que permite el estudio de diseño de fármacos. El conocimiento de la relación estructura función de las proteínas permite el avance de las ciencias proteómica y genómica, entre otras.

El trabajo fundamental de Kurt Wüthrich consistió en vislumbrar que la RMN era una técnica capaz de dar la información suficiente y promover la aplicación de diferentes técnicas de la RMN para la determinación estructural de proteínas. Estas modificaciones consistieron en la cuantificación de los NOE's, lo que incrementó la sensibilidad de los equipos de RMN, pudiéndose ahora conseguir equipos con campos magnéticos de 21.15 Teslas, la implementación de experimentos de RMN en 2, 3 y 4 dimensiones, los cuales se emplean en la elucidación estructural de cualquier tipo de moléculas y en todos los campos de la Química. ▣



Kurt Wüthrich

Referencias

- Barber, M., M. S. Bordoli, R. D. Sedwick and A. N. Tyler, *J. Chem Soc. Chem. Commun.* (1981) 325-327.
- Cita electrónica: www.nobel.se/chemistry/laureates/index.html
- Dole, M., L. L. Mach, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, *J. Chem. Phys.*, **49** (1968) 2240-2247.
- Fenn, J.B. *et al. Proc. 36th Annual Conference, Am. Soc. for Mass Spectrom.* San Francisco, 5-10 June 1988, p. 773.
- Fenn, J.B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, *Science* **246** (1989) 64.
- Havel, T.F., I. D. Kuntz and G. M. Crippen, *Biopolymers*, **18** (1979) 73-82.
- Larse, B.S. and C.N. McEwen, (editors), *Mass Spectrometry of Biological Materials*, Marcel Dekker Inc., New York, USA, 1998.
- Tanaka, K., Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida. *Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*, Osaka Japan (1987) p. 185-188.
- Tanaka, K., Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida. *Rapid. Común. Mass Spectrom*, **2** (1988) 151-153.
- Wüthrich, K. "NMR of proteins and nucleic acids" A Wiley-Interscience Publication. J. Wiley & Sons Inc., New York, 1986.
- Wagner, G., A. Kumar and K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem*, **114** (1981) 375-384.
- Wagner, G. and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **155** (1982) 347-366.
- Wüthrich, K., G. Wider, G. Wagner and W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **155** (1982) 311-319.