

ARTICULOS DE REVISION REVIEW ARTICLES

METODOS ESPECTROMETRICOS DE MASAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEINAS

Vladimir Besada, Luis J. González y Gabriel Padrón.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana 6, Cuba.

Recibido en mayo de 1995. Aprobado en mayo de 1995.

Key words: Mass spectrometry, ionization, sequencing, proteins, biomolecules, post-translational modifications.

SUMMARY

The development of new ionization methods has allowed the establishment of mass spectrometry as analytical tool for the characterization of biomolecules, becoming an essential technique for the detection of modified amino acids in natural and recombinant proteins. Besides, this technique constitute a promising alternative for peptide and protein sequencing. Here, we describe the development of this technique in the last 20 years and the most advanced equipments nowadays used for protein studies.

RESUMEN

El desarrollo de nuevos métodos de ionización ha permitido a la espectrometría de masas establecerse como técnica de análisis de biomoléculas. Actualmente constituye una técnica insustituible para la detección de aminoácidos modificados en proteínas naturales y recombinantes y una alternativa prometedora para la secuenciación de péptidos y proteínas. En este trabajo se describe el desarrollo de esta técnica en los últimos 20 años y la instrumentación más empleada actualmente para el estudio de proteínas.

Desde la década del 50, la espectrometría de masas (EM) era ya una reconocida herramienta en la elucidación de estructuras de compuestos orgánicos (1), caracterizada por una alta exactitud en las mediciones y una alta sensibilidad.

Sin embargo, hasta la década del 80 la contribución de esta técnica a la elucidación de la estructura primaria de las proteínas fue limitada (2, 3), pues aún para péptidos pequeños se requiere de una extensa derivatización (para conferirles volatilidad) y de sucesivos pasos de extracción o purificación del derivado. Estas razones, hicieron impracticable esta técnica como vía para la secuenciación de proteínas de forma rutinaria.

En los últimos años se han logrado dos avances importantes que permiten la aplicación progresiva de la espectrometría de masas a las biomoléculas y en particular a las proteínas. En primer lugar, el diseño de

novedosos métodos de ionización y en segundo lugar, la introducción de mejoras tecnológicas en los analizadores ya existentes.

METODOS DE IONIZACION

La introducción de nuevos métodos de ionización, que no requieren de la volatilización previa de la muestra, fue el elemento principal que permitió la extensión de la EM al campo de las biomoléculas.

Estos métodos provocan simultáneamente, tanto la ionización como la desorción de las moléculas llevando a fase gaseosa iones pseudomoleculares del tipo $(M+H)^+$ y $(M-H)^-$. Sin embargo, la energía suministrada en estos casos genera una escasa fragmentación del ion molecular, en donde se observa este mayoritariamente, razón por la que se les conoce como métodos **suave** de ionización.

La técnica de **desorción por campo eléctrico** (FD) (4) fue la primera comercialmente disponible y consta de un alambre fino de tungsteno (1-5 μm), previamente activado con carbono o silicio, por formación de microagujas, sobre el cual se deposita la muestra en solución y se somete a un alto voltaje (6-10 kV). El alto campo eléctrico y la temperatura generados provocan la ionización y desorción de las moléculas.

Este método si bien permitió determinar, por primera vez, la masa molecular de péptidos relativamente grandes sin derivatización alguna y secuenciar oligopéptidos posterior a tratamientos con exopeptidasas (5) y ciclos de degradación de Edman (6), no demoró mucho en quedar aventajado por otros métodos, fundamentalmente debido a la trabajosa preparación del filamento.

No es hasta la introducción de los métodos de ionización con haces de partículas que la EM se afianza como técnica de análisis de biomoléculas.

En 1974 MacFarlane y col. (7) emplearon fragmentos de alta energía (MeV), productos de la fisión del ^{252}Cf , para bombardear aminoácidos libres. La fisión del ^{252}Cf produce dos fragmentos con energías de 80 y 100 MeV (8). En este método, conocido por **desorción por plasma** (PD), uno de los fragmentos llega a un detector que marca el inicio de la medición, y el otro, generado en sentido contrario, atraviesa la lámina metálica sobre la que está depositada la muestra, elevando localmente la temperatura en el lugar del impacto, de forma tal que ocurre la desorción e ionización del compuesto (fig. 1A). Los fundamentos del proceso de ionización han sido abordados en diferentes trabajos sobre la técnica (9, 10, 11).

Se han detectado por este método moléculas de hasta casi 50 000 Da (12), con la particularidad de que puede usarse papel de nitrocelulosa como soporte de la muestra (13) entre otras matrices. Esto permite medir directamente proteínas electrotransferidas desde geles de poliacrilamida.

Sin embargo, se ha reportado un fenómeno de supresión de las señales en mezclas de péptidos según la carga neta de cada molécula (en dependencia de la composición de aminoácidos básicos y ácidos), o sea, los péptidos con carga neta positiva predominan en el espectro de iones positivos, cuando se analizan en presencia de péptidos con carga neta negativa y viceversa (14).

Las principales limitantes del método están en su sensibilidad, que no permite detectar cantidades de péptidos inferiores a los cientos de picomoles (15) y en su bajo poder de resolución, dado fundamentalmente por el tipo de analizador que emplea.

De las técnicas de desorción de iones, la que más ha sido empleada hasta el momento es la ionización por **bombardeo con átomos rápidos** (FAB), descrita en 1981 por Barber y col. (16). Esta consiste en el bombardeo de la muestra con átomos de elevada energía cinética (8-10 keV), que provoca la dispersión hacia la fase gaseosa de los iones moleculares preformados o de moléculas neutras que son posteriormente ionizadas (fig. 1B). El mecanismo de formación de los iones ha sido discutido en diversos trabajos (17, 18).

Según algunos investigadores (19, 20) la ionización por bombardeo con un haz primario neutro no fue tan novedosa como la introducción de matrices líquidas de baja tensión de vapor como soporte de la muestra. La ventaja consiste en que la superficie donde incide el haz neutro es constantemente renovada, lo que posibilita ob-

tener iones durante un tiempo prolongado, a diferencia de cuando se emplean matrices sólidas, rápidamente deteriorables en pocos segundos.

El glicerol es la matriz más empleada para la mayoría de las muestras, debido a su baja presión de vapor, alta viscosidad, buena capacidad como solvente y bajo peso molecular (21). La hidrofobicidad de los péptidos influye en el espectro obtenido (22), de modo que se ha considerado un grupo grande de líquidos como matriz o como aditivo del glicerol (23, 24), tales como la tio-glicerina (25) y una mezcla de ditiotreitol y ditioeritritol (26, 27). Sin embargo, el empleo de matrices líquidas trae aparejado un efecto de supresión de señales para mezcla de péptidos de diferente hidrofobicidad (28, 29, 30), lo cual impide generalmente, el empleo de esta técnica para análisis cuantitativos.

Desde la introducción de este método se han reportado la caracterización y secuenciación de numerosas proteínas naturales y recombinantes (31, 32). La EM se convirtió, por primera vez, en una técnica imprescindible para la detección de modificaciones postraduccionales (33, 34).

Esta técnica tiene ventajas sobre las anteriores descritas, por la fácil preparación de la muestra y la capacidad de producir a temperatura ambiente un espectro de señales intensas y estables en el tiempo. Su principal limitante radica en su relativa baja sensibilidad, lo que hace que disminuya bruscamente, al incrementarse la masa.

Si bien las técnicas de ionización por PD y FAB surgieron en la misma etapa y la primera ventaja al FAB en alcance de masas (50 000 Da vs. 20 000 Da), solo esta última logró imponerse como método rutinario en muchos laboratorios del mundo, dado entre otros factores por su fácil introducción en los espectrómetros ya existentes. No obstante, en los últimos 5 años los esfuerzos se han focalizado sobre diseños que permitan incrementos de sensibilidad y de alcance de masas, lo que ha impulsado el desarrollo de nuevos métodos de ionización (tabla 1).

Entre estos métodos se encuentra la desorción por láser, empleada por primera vez por Posthumus y col. (35) para el análisis de moléculas orgánicas no volátiles. Posteriormente se llegó a obtener espectros de masas de moléculas grandes relativamente neutras, como oligosacáridos y glicolípidos, usando láser de CO_2 y de Nd/YAG (36, 37).

El láser, particularmente por pulso, es una fuente energética atractiva para sustancias poco volátiles e inestables térmicamente, pues se conoce que el calentamiento rápido de la muestra lleva con preferencia, a la evaporación y no a la degradación térmica (38).

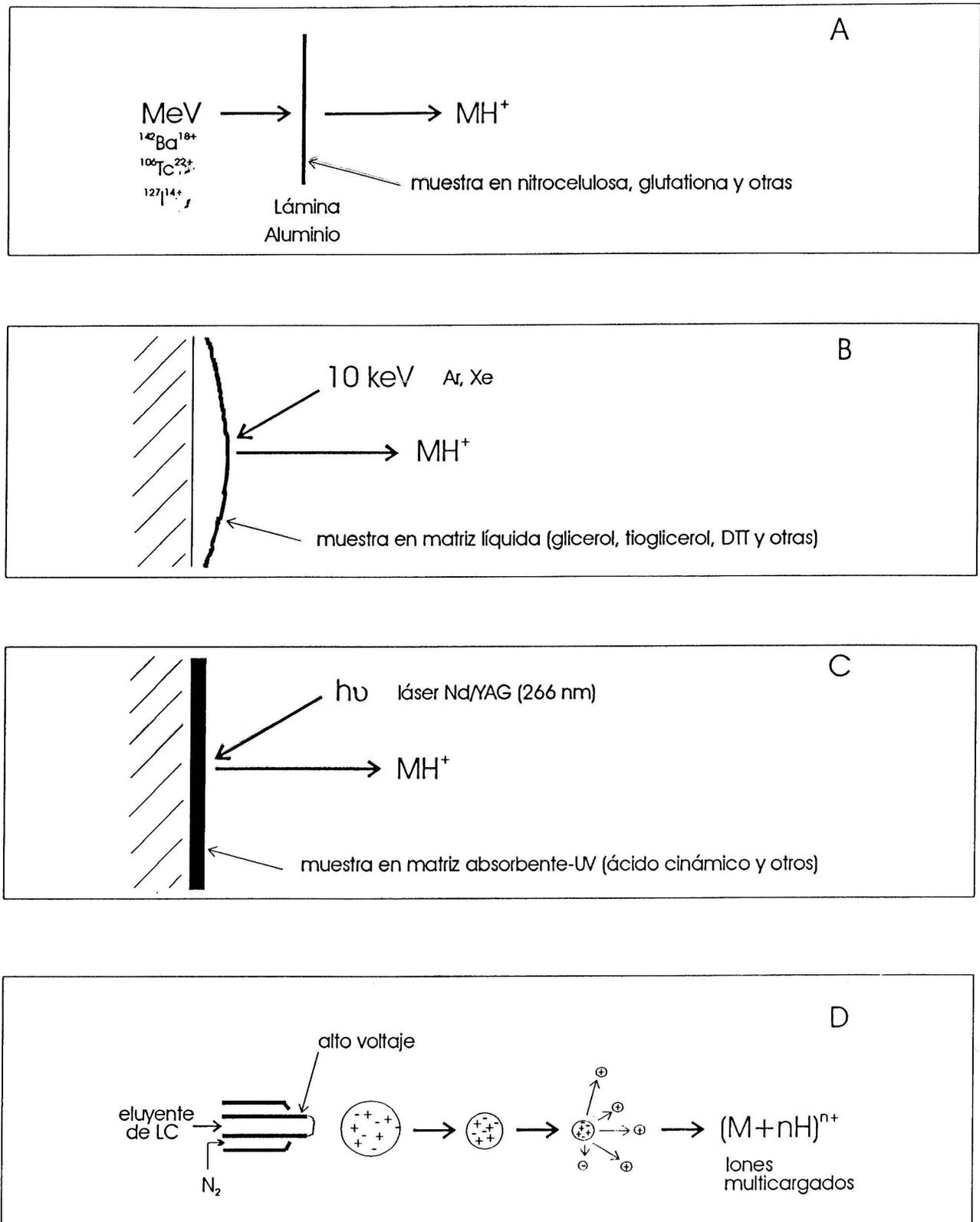


Fig. 1. Métodos de ionización más empleados para el estudio de biomoléculas: A) Desorción por Plasma [PD], B) Bombardeo de átomos acelerados [FAB], C) Desorción por láser auxiliado por matriz [MALDI] y D) Ionización por electronebulización [ESI].

Este método de ionización es de alta sensibilidad y la multiplicidad de las señales en el espectro reduce sustancialmente el error estadístico en la determinación del valor de masa, lo que hace factible mediciones de muy buena exactitud (<0,01%).

Recientemente, se logró con ESI detectar impurezas (mezcla de componentes proteicos minoritarios) por debajo del 3% en proteínas recombinantes (58), como los productos de degradación de los extremos terminales N y C y de oxidación de metionina, entre otras.

Una de las grandes preocupaciones durante el desarrollo de estos métodos para el estudio de biomoléculas, ha sido encontrar la vía adecuada para la introducción de la muestra al espectrómetro. Hasta el momento, la variante más trabajada contempla el desarrollo de interfases entre la cromatografía líquida (HPLC) y el espectrómetro, empleando fundamentalmente FAB (59, 60, 61, 62, 63) y en menor grado MALDI (46, 64) como método de ionización.

Sin embargo, una de las principales ventajas del ESI es que, por diseño, es ya una interfase, lo que permite la caracterización directa de mezclas muy complejas, como es la de 200 péptidos enlazados a moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) (65).

Este método de ionización ha resultado también, de gran interés para los estudios de estructura cuaternaria de las proteínas, pues la energía suministrada al sistema no parece afectar algunas interacciones no covalentes entre moléculas. Todas estas características posibilitan su aplicación en la determinación de cambios conformacionales en las proteínas (66, 67, 68, 69), intermediarios en reacciones enzimáticas (70, 71, 72, 73), mecanismos de inhibición (74), formación de complejos enzimáticos covalentes (75) y no covalentes (76, 77, 78), entre otros muchos.

Tanto MALDI como ESI permiten la determinación fácil de la integridad de las proteínas recombinantes y la obtención de su mapa peptídico, lo que ha posibilitado

su rápida inserción entre las técnicas empleadas para monitorear los procesos biotecnológicos y los productos así obtenidos (79, 80).

Hasta hace diez años el máximo valor de masa detectado no sobrepasaba los 15 000 Da, sin embargo la introducción de estos dos últimos métodos de ionización superó en más de 30 veces ese valor.

ANALIZADORES

Actualmente los espectrómetros que más se comercializan tienen analizadores muy semejantes a los de hace 20 años, con cambios menores en su arquitectura. Estos son los de doble enfoque, los de cuadrupolo y los de tiempo de vuelo (TOF) (81) (tabla 2).

Los analizadores de **doble enfoque** emplean dos sectores, uno eléctrico y otro magnético (fig. 2A). El campo magnético (B) es el encargado de enfocar el haz de iones monoenergético (proveniente del campo eléctrico) hacia el detector según la relación masa/carga: $m/z = B^2 R^2 / 2V$, donde R es el radio de curvatura del imán y V es el voltaje acelerador. Por tanto, el alcance de masas de estos equipos depende de la intensidad máxima del imán. Los nuevos espectrómetros con analizadores de doble enfoque disponen de electroimanes muy potentes (hasta 2,3 Tesla), lo cual representa un alcance de hasta 125 000 Da al menor voltaje de aceleración posible. Las mayores ventajas de estos analizadores están dadas por su alta resolución, su alcance de masas relativamente alto y la exactitud de las mediciones. Sus principales limitantes son la baja sensibilidad, el elevado costo y sus dimensiones.

Por su lado, los analizadores de **cuadrupolo** emplean cuatro electrodos, generalmente de sección transversal hiperbólica (fig. 2B), entre los que se establecen voltajes de corriente directa y de radiofrecuencias (81). Para determinados valores de campo y para energías de traslación menores de 100 eV, los cuadrupolos funcionan como filtros de masas de alta selectividad. Estos analizadores son más populares que los de doble enfoque

Tabla 2

	Doble sector (tándem)	Triple Cuadrupolo	TOF (reflectrón)
Alcance de masas	Depende de V y B, 12 5000 (teórico)	<4 000 Da	Infinito (teórico)
Sensibilidad	Relativamente baja	alta	Alta
Resolución	alta	Media / alta	Baja
Acoplable a:	FAB, ESI, MALDI, CL	ESI, CL	PD, MALDI
Secuenciación	Generalmente permite diferenciar aminoácidos isobáricos	No distingue aminoácidos isobáricos	No totalmente establecido
Costo aprox.	> \$1 500 000	\$350 000	\$300 000

V-voltaje acelerador, B-intensidad de campo magnético, CL-cromatografía líquida

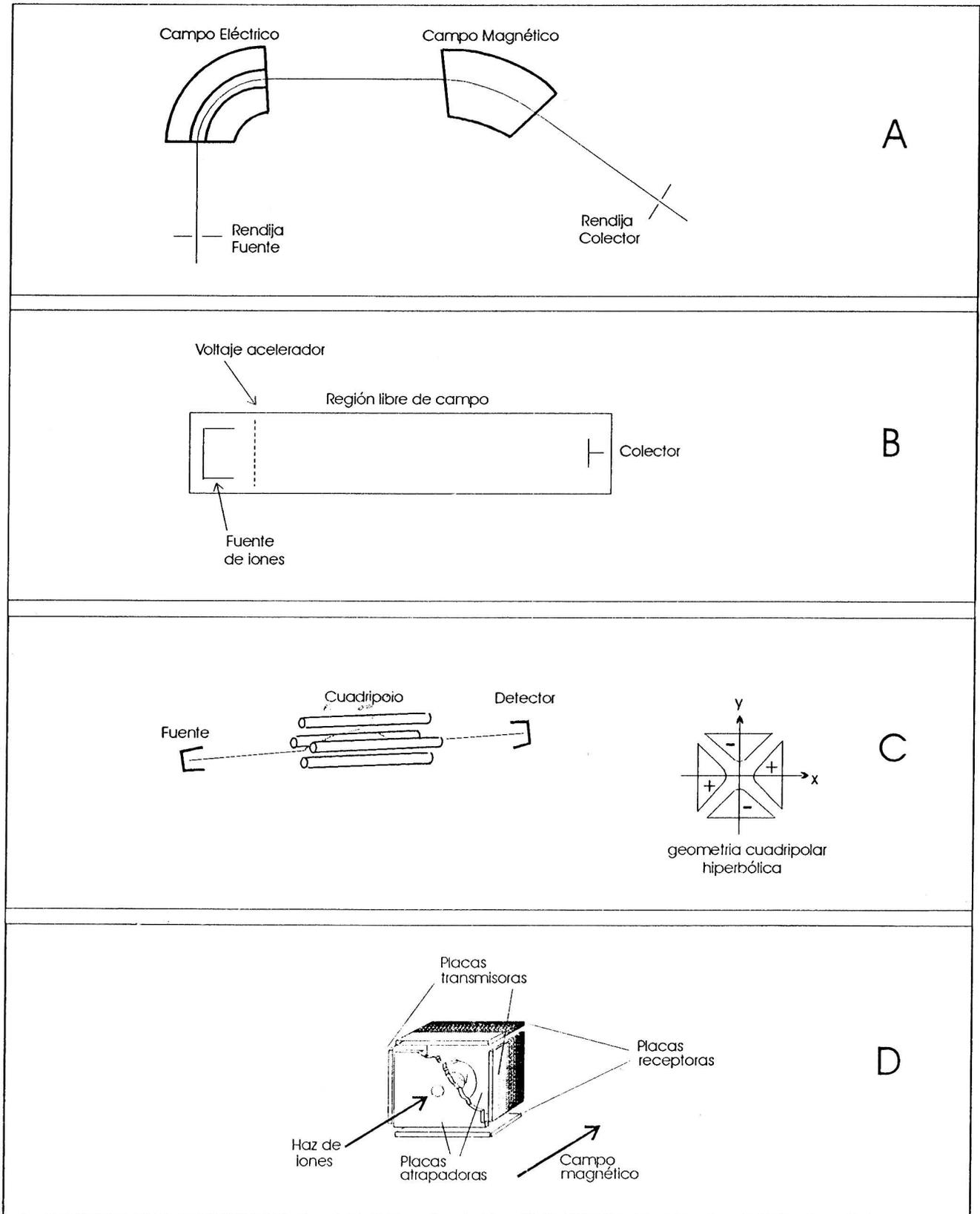


Fig. 2. Analizadores más comunmente empleados: A) Doble sector, B) Tiempo de vuelo, C) Cuadripolos y D) Trampa de iones.

debido a varias razones: son muy compactos, tienen alta velocidad de barrido y de sensibilidad. Sin embargo, comparados con los de doble enfoque, son de menor resolución, alcance de masas y exactitud.

Actualmente, la desventaja relacionada con el alcance de masas ha sido superada, pues la ionización por ESI permite medir directamente masas elevadas de moléculas multicargadas. La introducción del método de ESI posibilitó la incorporación de los analizadores de cuadrupolo al arsenal de instrumentos, utilizados para el estudio de las proteínas.

Los analizadores de tiempo de vuelo son los de arquitectura más sencilla, pues emplean un simple tubo de aproximadamente un metro (fig. 2C), donde los iones son resueltos por el tiempo que demoran en recorrerlo, lo cual está directamente relacionado con la masa de cada ion, según: $t = a(m/z)^{1/2}$, donde a es una constante. Estos analizadores tienen un alcance de masas ilimitado y se caracterizan por su alta sensibilidad y velocidad de barrido. En los últimos años, la resolución de estos analizadores ha mejorado notablemente debido a la introducción de anillas reflectoras y un alargamiento en la trayectoria óptica de los iones.

La combinación de los distintos métodos de ionización con los analizadores anteriormente descritos, ha generado diversidad de espectrómetros entre los que se destacan:

- a) ESI o FAB acoplado al doble sector;
- b) ESI acoplado al cuadrupolo;
- c) MALDI acoplado al analizador TOF; con diversas posibilidades de aplicación.

En dependencia del problema a investigar se selecciona el analizador y el método de ionización, teniendo en cuenta el rango de masas, el poder de resolución, la exactitud en la medición, la sensibilidad y la compatibilidad con otras técnicas (como HPLC), entre otros aspectos.

En la actualidad, se ha revitalizado el empleo de trampas iónicas como analizadores (fig. 2D), pues tiene grandes perspectivas de uso para el trabajo con biomoléculas (82). Existen varias características que hacen superiores estos analizadores a los anteriormente descritos, como son: diseño mecánico muy sencillo (83), alta resolución (84, 85), alta sensibilidad, compatibilidad con los distintos métodos de ionización, capacidad para almacenar iones durante un largo período de tiempo (de mseg hasta minutos) y la detección simultánea de todos los iones presentes, seguido de una transformación de Fourier (FT-MS) de los datos.

Sin embargo a pesar de todas las ventajas mencionadas, aún existen problemas tecnológicos en el diseño de estos equipos que han impedido su comercialización. Entre estos problemas se destaca el relacionado con la manipulación de iones de alta masa molecular.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (MS/MS)

En el caso de las biomoléculas, uno de los grandes retos está en la secuenciación de péptidos y proteínas. Entre las configuraciones de equipos más usadas con este fin están: la disposición en tándem de dos espectrómetros de doble sector, el sistema cuadrupolar triple y las trampas de iones (86, 87, 88) (tabla 2). En general, estos sistemas se diseñan de tal forma que, en una primera etapa se selecciona el ion de interés (EM-1, fig. 3); en una segunda etapa, este ion se hace chocar con gas He o Ar para inducir su fragmentación y los fragmentos de iones así obtenidos se resuelven en una tercera etapa (EM-2).

En el caso de los espectrómetros de doble sector, un ion precursor P_3^+ (fig. 3) resuelto en EM-1 y los iones hijos que de este se deriven (f_1^+ , f_2^+ , f_3^+ , etc.), al ser generados en una región libre de campo, tienen velocidades muy semejantes con diferente energía cinética. Por ello para lograr que tanto el precursor como sus iones hijos atraviesen el campo eléctrico y sean enfocados por el campo magnético, atendiendo a su relación m/z , debe realizarse un barrido simultáneo de los campos magnético (B) y eléctrico (E) (**linked-scan**) (89), manteniendo constante la relación B/E. El espectro así obtenido da información solamente de los fragmentos de iones que se forman a partir de un único ion precursor. Para detectar los fragmentos (hijos) provenientes de otro ion precursor, simplemente se selecciona otra relación B/E, de acuerdo a su masa molecular.

Esta técnica permite la secuenciación completa de péptidos de hasta 2 500 Da, de forma bidireccional (desde los extremos terminales N y C simultáneamente), incluso en mezclas de péptidos. La cantidad de péptido necesaria para obtener la completa información de la secuencia va desde 100 fmol hasta 1 nmol, dependiendo de la propia secuencia del péptido, del método de ionización y del analizador que se use.

La ruptura de un simple enlace a lo largo de la cadena polipeptídica produce un fragmento cuya masa se corresponde con la suma de todas las cadenas laterales, más el número de unidades aminoácidas contenidas en este (90). Por tanto, la interpretación del espectro de masas de un fragmento peptídico (de una molécula des-

conocida) puede ser relativamente sencilla, teniendo en cuenta que las proteínas naturales están compuestas por solo 20 aminoácidos.

En la figura 4 se muestran las distintas series de iones que se forman por fragmentación en el entorno de cada enlace peptídico (91). La diferencia de masas de series consecutivas de un mismo tipo nos brinda información de las masas de los aminoácidos dispuestos en un orden secuencial (92). Además, a diferencia de la secuenciación automática por degradación química, permite detectar e identificar modificaciones químicas en péptidos.

La aparición e intensidad relativa de alguna de las series iónicas con respecto a otras depende, en gran medida, de la propia secuencia de aminoácidos (93), de la energía del haz de xenón (94), del gas de colisión (95) y de los componentes de la matriz, entre otros factores. La presencia de aminoácidos básicos, particularmente arginina, en los extremos terminales N ó C del péptido incrementan la intensidad de las series b, a, d ó yⁿ, w, v, z, respectivamente, fenómeno conocido como *charge-remote fragmentation* (93,96). Las señales correspondientes a la serie yⁿ por corte en el extremo terminal N de Pro y a la serie b por pérdida de Pro, también se intensifican (97).

Por otro lado, es frecuente encontrar fragmentaciones de las cadenas laterales (series w, v, d y m) cuando se usa gas argón en lugar de helio (94). Igualmente se ha

observado que, la adición de ácidos fosfórico o sulfúrico a la matriz, por ejemplo, produce mejor fragmentación del péptido que cuando se usa HCl (98).

En la figura 5 se muestra la secuenciación de un péptido a partir del espectro obtenido en un equipo de doble sector en tándem con FAB acoplado.

En la actualidad, sin embargo, los sistemas de triple cuadrupolo se han impuesto sobre los de sector magnético, por ser mucho más baratos, más sensibles, menos espaciosos y más sencillos de operar. Por otro lado, los espectros obtenidos con el triple cuadrupolo son más sencillos de interpretar, pues al trabajar con iones de baja energía cinética produce menos fragmentaciones que los de doble sector. No obstante, los sistemas de cuadrupolo tienen la desventaja de no permitir la diferenciación entre aminoácidos de igual masa como: leucina/isoleucina.

Por otro lado, el empleo de FT-MS (con trampas iónicas) permite excitar, con pulsos apropiados de radiofrecuencias, un ion o grupo de iones determinado, realizar la fragmentación del péptido de interés al provocar su colisión con He o Ar y registrar los fragmentos obtenidos (99). De esta forma, repitiendo esta secuencia de pasos *n* veces es posible realizar experimentos de MSⁿ (100), de gran utilidad en la elucidación estructural de compuestos.

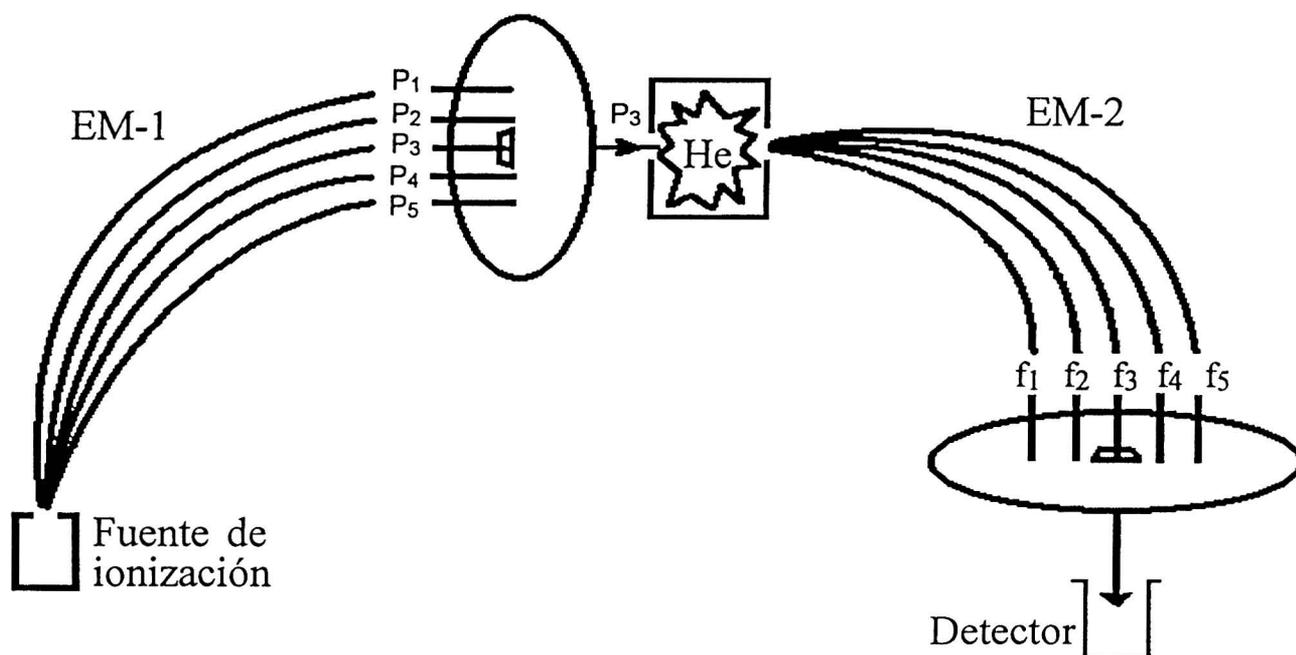
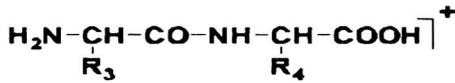


Fig. 3. Representación esquemática de un espectrómetro de masas en tándem empleado para la secuenciación de péptidos. P₁₋₅ denota péptidos separados en EM-1 según su relación m/z; f₁₋₅ son los iones obtenidos por fragmentación del péptido P₃, resueltos en EM-2.

Fragmentos iónicos del esqueleto peptídico

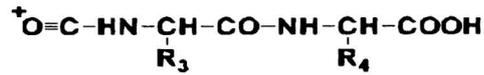
Serie y^m:



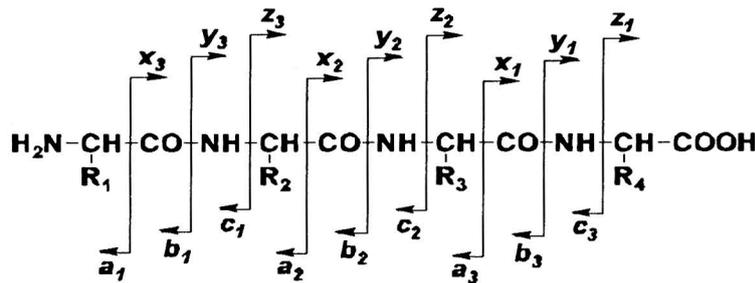
Serie z:



Serie x:



Iones del extremo C (series x, y^m, z)



Iones del extremo N (series a, b, c)

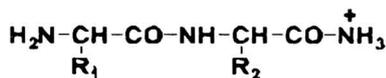
Serie b:



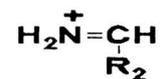
Serie a:



Serie c:

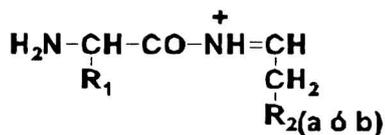


Iones amonio:

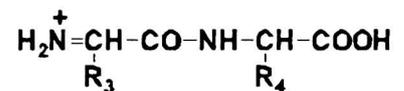


Fragmentos iónicos generados por pérdida de cadenas laterales (series d, v, w)

Serie d:



Serie v:



Serie w(a,b):

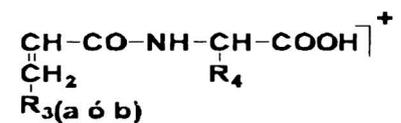


Fig. 4. Fragmentaciones más comunes de los péptidos obtenidos por disociación inducida por colisiones.

Recientemente se ha reportado el empleo de anillas reflectoras en los equipos de MALDI-TOF para eliminar la diferencia energética entre iones de igual masa. Aunque ha habido escasas aplicaciones (43) del método a la secuenciación de péptidos, este promete ser una técnica de amplio uso.

Como se observa, es posible aplicar la EM con disímiles propósitos en el caso de proteínas, sin embargo actualmente la principal dificultad consiste en que no se dispone de un único equipo que permita realizar todas las posibilidades de medición; sino que, según el problema concreto a resolver, se recurre a uno u otro espectrómetro.

APLICACIONES

Las características de los distintos métodos espectrométricos de masas permiten numerosas aplicaciones de la técnica en el caso particular de las proteínas, sean de secuencias desconocidas o recombinantes. Existe una estrategia bien establecida para la caracterización de proteínas (101). Entre los ejemplos de aplicaciones más referidas en la literatura están:

LOCALIZACION DE ENLACES DISULFURO

Los enlaces disulfuro pueden localizarse empleando diferentes estrategias, sin embargo, el uso de la EM (a partir de la introducción de FAB) facilita la manipulación e identificación de los péptidos enlazados por puentes S-S. El primer artículo que destaca la utilidad del FAB para este propósito fue publicado en 1985 (102); desde entonces se ha realizado la localización de enlaces disulfuro en numerosas proteínas.

Los péptidos que contienen enlaces disulfuro se detectan en el espectro de masas por las señales de m/z correspondiente a ambos péptidos unidos y las de cada péptido reducido. En la figura 6 se ejemplifica con el espectro obtenido para un péptido de IFN- α que contiene el puente disulfuro entre las cisteínas 1 y 98. Se observan las señales del péptido original (m/z 2957.4) y la de ambos péptidos reducidos (m/z 1313.6 y 1646.5).

DETECCION DE MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

Posiblemente esta sea la aplicación más importante de la EM en el campo de las proteínas. El conocimiento de la secuencia de ADN que codifica para una proteína no es criterio suficiente para suponer la síntesis correcta, pues se conocen gran número de ellas que se modifican durante o posterior a la traducción del ARN mensajero. Se han reportado cerca de 200 modificaciones postraduccionales (34), por lo que la caracterización detallada tanto de las moléculas naturales como de las correspondientes proteínas recombinantes es absolutamente imprescindible cuando se trata de la producción de fármacos para uso terapéutico (103, 104).

En estos casos, la EM juega un papel esencial pues define directamente la estructura química de la modificación.

Una de las modificaciones más frecuentes es la acetilación del extremo terminal N de las proteínas, lo cual impide su secuenciación. En la figura 6B se muestra la detección del IFN- α acetilado en el grupo amino terminal, por desplazamiento del valor de masa en 42 Da con respecto al IFN normal (fig. 6A).

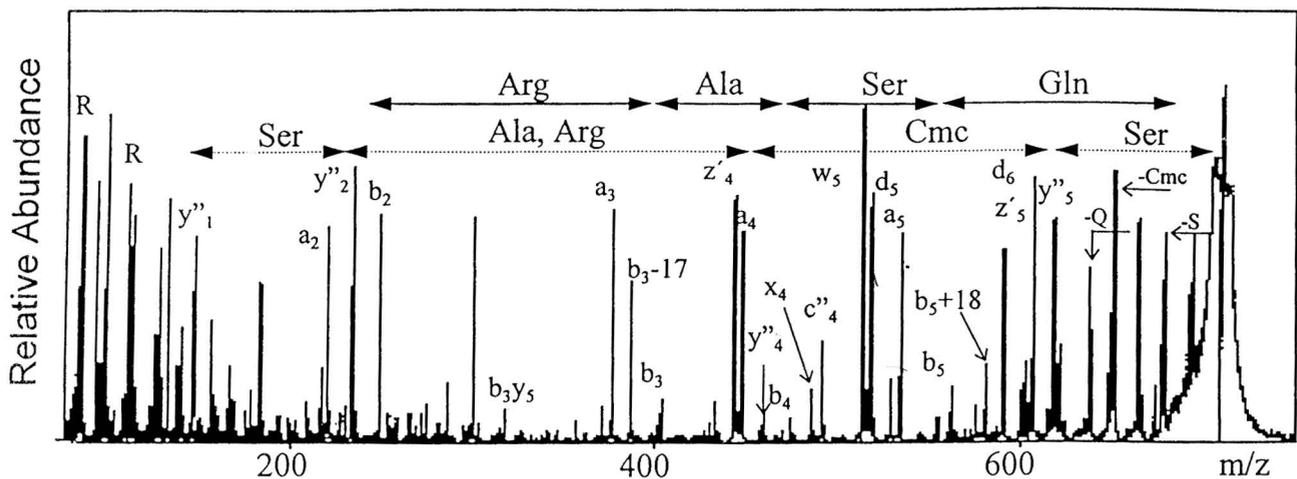


Fig. 5. Secuenciación por EM en tándem de un péptido de m/z 709.3 (Ser-cmC-Arg-Ala-Ser-Gln) perteneciente a la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-IFN- α .

SECUENCIACION DE PROTEINAS

Si bien existe una metodología para la secuenciación de las proteínas por vía química desde su extremo terminal N, es también conocido que ésta no es viable en moléculas con el grupo amino bloqueado (105)

La secuenciación por EM en tándem muestra algunos rasgos que aventajan a la vía química, estos son:

- permite la secuenciación bidireccional de los péptidos;
- permite la detección de aminoácidos modificados;

- la velocidad de secuenciación es mucho mayor;
- mayor sensibilidad;
- no requiere de una purificación exhaustiva de la muestra, por lo que permite trabajar con mezclas de péptidos (90).

Existen numerosos ejemplos de proteínas secuenciadas por espectrometría de masas. No obstante, la EM no sustituye a la técnica de secuenciación automática por vía química, sino que la complementa; de modo que el uso combinado de ambas facilita la caracterización estructural de la proteína (106).

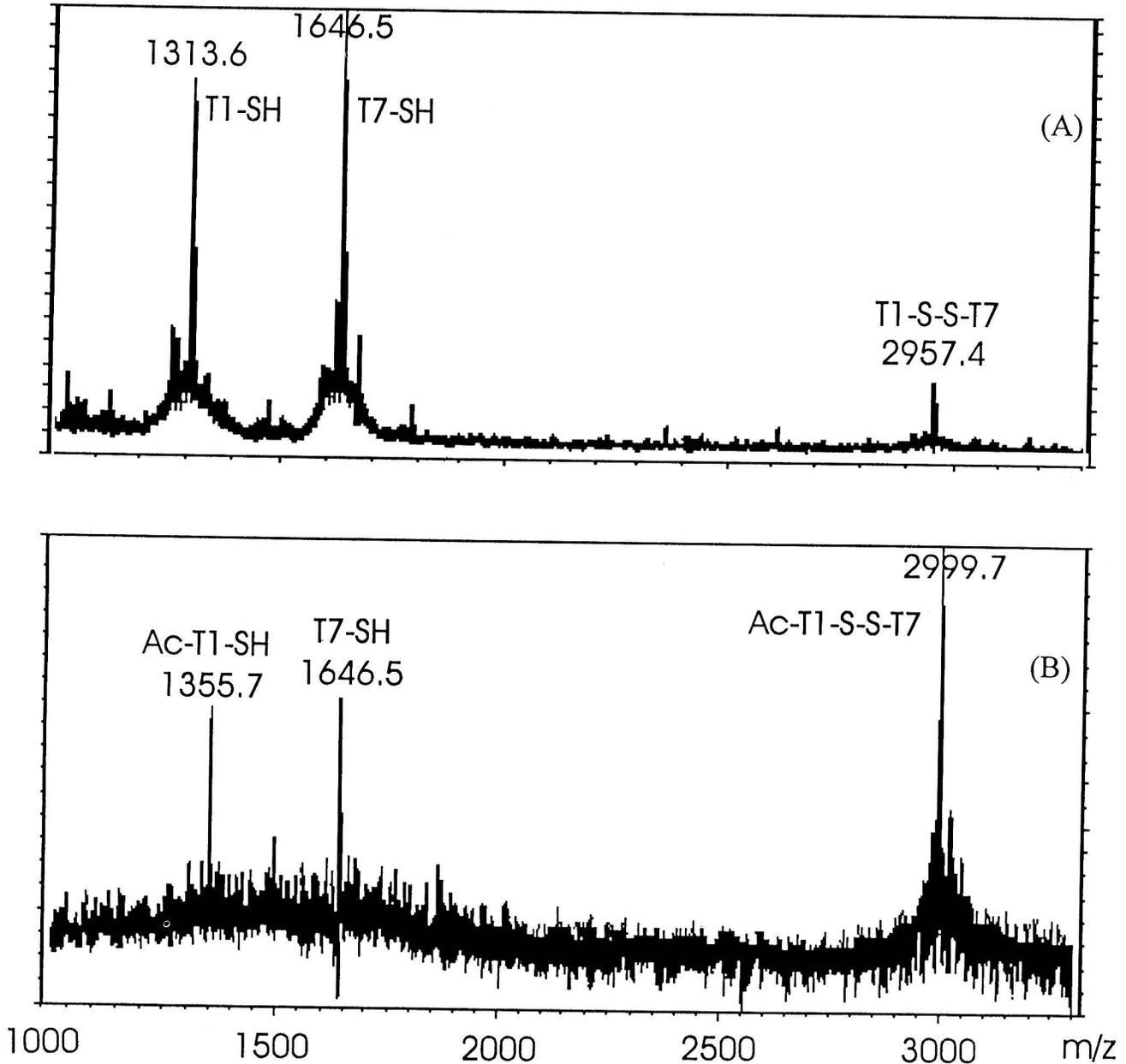


Fig. 6. Espectros FAB obtenidos para un péptido obtenido por digestión con tripsina y endoproteinasa Glu-C del IFN- α humano, que contiene el puente disulfuro entre las cisteínas 1 y 98 (péptidos T1 y T7); a) normal y b) N-acetilado.

MAPEO PEPTIDICO

Este se realiza normalmente por HPLC en columnas de fase inversa y constituye uno de los ensayos que se exige a los productos farmacéuticos para definir su identidad (107).

Actualmente, la introducción de los métodos de ionización por ESI y MALDI, permiten con relativa facilidad, un análisis más completo de la muestra, al generar no solo el mapa peptídico sino también, la masa molecular de cada péptido.

DETERMINACION DEL EXTREMO TERMINAL C

Aún no existe una metodología establecida que permita la secuenciación de las proteínas por su extremo terminal C, aunque sí se han reportado varios procedimientos para la detección del último aminoácido o del péptido correspondiente al extremo C. En el primer caso, se detecta el aminoácido libre posterior a hidrazinólisis (108) o tritización (109) de la proteína. La vía enzimática empleando diversas carboxipeptidasas también ha sido reportada (110), sin embargo funciona preferiblemente en péptidos y resulta poco útil para proteínas. Mientras en el segundo caso, se detecta el péptido liberado del extremo C, por afinidad de las enzimas anhidrotripsina y anhidroquimotripsina (111) a los péptidos con lisina. Otra vía que se emplea, considera la función de transpeptidación de la carboxipeptidasa Y para marcar el péptido correspondiente, luego de eliminar el último aminoácido (112).

Otra alternativa lo constituye el empleo de agua enriquecida con ^{18}O durante la digestión enzimática de la proteína. Esto permite la detección por EM del péptido correspondiente por aparición de una señal con distribución isotópica normal (113, 114), a diferencia de la observada para los péptidos marcados.

IDENTIFICACION DE PROTEINAS

La identificación de proteínas en extractos naturales es extremadamente laboriosa y compleja. La EM juega un papel muy importante en el caso de proteínas bloqueadas en el extremo terminal N. Existen diferentes procedimientos para lograr la identificación, que incluyen:

- 1) mapeo peptídico con enzimas específicas y búsqueda en el banco de secuencias por comparación de los valores de masas observados (115, 116).
- 2) búsqueda en el banco de secuencias a partir de las fragmentaciones observadas en el espectro MS/MS (117)
- 3) secuenciación de un péptido interno por MS/MS, determinación de la masa molecular de la proteína intacta y búsqueda de semejanza en el banco de secuencias.

DETERMINACION DE LA MASA MOLECULAR DE PROTEINAS INTACTAS CON GRAN EXACTITUD

La técnica de electroforesis (SDS-PAGE) continúa siendo la más empleada para la determinación de la talla molecular de las proteínas, por su fácil instrumentación en cualquier laboratorio. Con esta se alcanza sensibilidad del orden de los picomoles y exactitud nunca menor del 10%.

Sin embargo, la EM usando MALDI y ESI permite realizar mediciones con sensibilidad (depende del analizador también) sub-femtomolar y exactitud de 0.1% y menos de 0.01%, respectivamente (118). En la figura 7 se muestra el espectro ESI del IFN- α humano recombinante. Este espectro permitió demostrar la integridad de la proteína recombinante con una exactitud del 0.005%.

La determinación de la masa molecular con tal exactitud posibilita la detección directa de algunas modificaciones en la proteína intacta.

CONCLUSIONES

La instrumentación lograda en los nuevos espectrómetros de masas, ha colocado a esta técnica entre las herramientas más poderosas del químico, para el estudio de las proteínas naturales y recombinantes. Entre sus rasgos más característicos están su alta sensibilidad, alcance de masas, exactitud y amplio espectro de aplicaciones.

Masa Promedio:
Calc.: 19265
Obs.: 19264 \pm 1

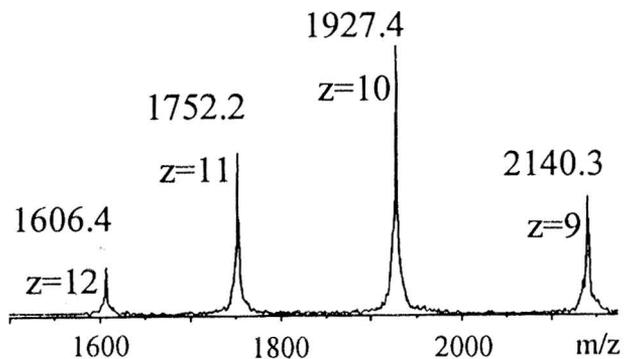


Fig. 7 Espectro ESI del IFN- α humano intacto. Cada señal pertenece a la misma molécula conteniendo un número de cargas creciente. La exactitud de la medición es de 0.005%.

Su principal limitante está en que no se dispone de un sistema único que permita todas las variantes de aplicación. Por este motivo, en los próximos años se prevé el desarrollo de equipos que combinen las distintas características de los instrumentos actuales, tales como: alta resolución, buena sensibilidad, sencilla manipulación y posibilidades de acoplamiento con métodos de extracción/purificación como HPLC y electroforésis capilar.

REFERENCIAS

- BIEMANN, K.; F. GAPP and J. SEIBL (1959). *J. Am. Chem. Soc.* **81**: 2274.
- BIEMANN, K. (1972) in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, Walker, G.R., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 405.
- BIEMANN, K. (1980). in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, First Supplementary Vol. Walker, G. R. and O. C. Dermer, Eds.; John Wiley & Sons: New York, 469.
- BECKEY, H. and D. SCHUELTE (1960). *Z. Instrum.* **68**: 302.
- SHIMONISHI, Y.; Y.-M HONG; T. MATSUO; I. KATAKUSE and H. MATSUDA (1979). *Chem. Lett.*, 1369.
- SHIMONISHI, Y.; Y.-M HONG; T. KITAGISHI; T MATSUO; H. MATSUDA and I. KATAKUSE (1980). *Eur. J. Biochem.* **112**: 251.
- TORGERSON, D.; R. SKOWRONSKI and R. MACFARLANE (1974). *Biophys. Res. Comm.* **60**: 616.
- SUNDQVIST, B.; I. KAMENSKY; P. HAKANSSON; J. KJELLBERG; M. SALEHPOUR; S. WIDDYASEKERA; J. FOHLMAN; P. PETERSON and P. ROEPSTORFF (1984). *Biomed. Mass Spectrom.* **11**: 242.
- MACFARLANE, R. (1982). *Acc. Chem. Res.* **15**: 268.
- SUNDQVIST, B. and R. MACFARLANE (1985) *Mass Spectrom. Rev.* **4**: 421.6.
- COTTER, R. (1988). *Anal. Chem.* **60**: 781A.
- JONSSON, G.; A. HEDIN; P. HAKANSON; B. SUNDQVIST; H. BENNICKE and P. ROEPSTORFF (1989). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**: 190.
- JOHNSSON, G.; A. HEDIN; P. HAKANSON; B. SUNDQVIST; B. SAVE; P. NIELSEN; P. ROEPSTORFF; K. JOHANSEN; I. KAMENSKY and M. LINDBERG (1986). *Anal. Chem.* **88**: 58, 1084.
- NIELSEN, P. and P. ROEPSTORFF (1989). *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **18**: 131.
- TSARBOPOULOS, A.; M. KARAS; K. STRUPAT; B. PRAMANIK; T. NAGABHUSHAN; F. HILLENKAMP (1994). *Anal. Chem.* **66**: 2062.
- BARBER, M.; R. BORDOLI; R. SEDGWICK and A. TYLER (1981). *J. Chem. Comm.*, 325.
- FENSELAU, C. and R. COTTER; (1982). en IUPAC, *Frontiers of Chemistry*, K. Laidler, Ed.; Pergamon: New York, 207.
- SCHRONK, L. and R. COTTER (1986). *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **13**: 395.
- LEE, T. (1986). en *Methods of Protein Microcharacterization*, Shively, J., Ed.; Humana Press: New Jersey, 403.
- BIEMANN, K. (1990). *Methods in Enzymology*, **193**: 351.
- BARBER, M.; R. BORDOLI; G. ELLIOT; R. SEDGWICK and A. TYLER (1983). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **79**: 1249.
- DE PAUW, E.; G. PELZER; D. DAO VIET and J. MARIEN; (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**: 127.
- BARBER, M.; R. BORDOLI; G. ELLIOT; R. SEDGWICK and A. TYLER (1982). *Anal. Chem.* **54**: 645A.
- LEVESON, J. (1985). *Biomed. Mass Spectrom.* **12**: 191.
- BARBER, M.; R. BORDOLI; G. ELLIOT; R. SEDGWICK; A. TYLER and B. GREEN (1982). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 936.
- LEHMANN, W.; M. KESSLER and W. KONIG (1984). *Biomed. Mass Spectrom.* **11**: 217.
- WITTEN, J.; M. SCHAFFER; M. O'SHEA; J. COOK; M. HEMLING and K. RINEHART (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **124**, 350.
- LIGON, W. and S. DORN (1984). *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **57**, 75.
- CLENCH, M.; G. GARNER; D. GORDON and M. BARBER (1985). *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **12**: 355.
- NAYLOR, S.; F. FINDEIS; B. GIBSON and D. WILLIAMS (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**: 6359.
- BIEMANN, K. and S. MARTIN (1987). *Mass Spectrom. Rev.* **6**: 1.
- MORRIS, H. and F. GREER (1988). *Trends in Biotechnol.* **6**: 140.
- BIEMANN, K. and H. SCOBLE (1987). *Science* **237**, 992.
- AITKEN, A. (1990). en *Identification of Protein Consensus Sequences*, A. Wiseman, Ed. Ellis Horwood Ltd., England, 11.
- POSTHUMUS, M.; P. KISTAMAKER; H. MEUZELAAR and M. TEN NOEVER DE BRAUW (1978). *Anal. Chem.* **50**: 985.
- COATES, M. and C. WILKINS (1985). *Macromolecules* **19**: 1255.
- TAKAYAMA, K.; N. QURESHI; K. HYVER; J. HONOVICH; R. COTTER; P. MASCAGNI and H. SCHNEIDER (1986). *J. Biol. Chem.* **261**: 10624.
- HILLENKAMP, F. and M. KARAS (1990). *Methods in Enzymology*, 193-280.
- KARAS, M.; D. BACHMANN; U. BAHR and F. HILLENKAMP (1987). *Int. J. Mass Spectr. Ion Proc.* **78-53**.
- KARAS, M and F. HILLENKAMP (1988). *Anal. Chem.* **60**: 2299.
- KARAS, M.; U. BAHR; A. INGENDOH and F. HILLENKAMP (1989). *Angew. Chem.* **28**: 760.
- BEAVIS, R. AND B. CHAIT (1989). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**: 233.
- SPENGLER, B.; D. KIRSCH; R. KAUFMANN AND E. JAEGER (1992). *Rapid Commun. in Mass Spectrometry* **6**: 105.
- STRUPAT, K.; M. KARAS and F. HILLENKAMP (1991). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process* **111-189**.
- CORNETT, D.; M. DUNCAN and I. AMSTER (1992). *Organic Mass Spectrom.* **27**: 831.
- LI, L.; A. WANG and L. COULSON (1993). *Anal. Chem.* **65**: 493.
- BEAVIS, R. and B. CHAIT (1989). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **3**: 432.
- BEAVIS, R.; T. CHAUDHARY and B. CHAIT (1992). *Organic Mass Spectrom.* **27**: 156.
- VORM, O.; P. ROEPSTORFF and M. MANN (1994) *Anal. Chem.* **66**: 3281.
- MOCK, K.; M. DAVEY and J. COTTRELL (1991). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **177-644**.
- NORDHOFF, E.; A. INGENDOH; R. CRAMER; A. OVERBERG; B. STAHL; M. KARAS; F. HILLENKAMP and P. F. CRAIN (1992). *Rapid Commun. in Mass Spectr.* **6**: 771.
- ECKERSKORN, C.; K. STRUPAT; M. KARAS; F. HILLENKAMP and F. LOTTSPREICH (1992). *Electrophoresis* **13**: 664.
- STRUPAT, K.; M. KARAS; F. HILLENKAMP; C. ECKERSKORN and F. LOTTSPREICH (1994). *Anal. Chem.* **66-464**.
- VESTLING, M. and C. FENSELAU (1994). *Anal. Chem.* **66-471**.
- FENN, J.; M. MANN; C. MENG; S. WONG and C. WHITEHOUSE (1989). *Science* **246-264**.

56. LOO, J.; H. UDSETH and R. SMITH (1989). *Anal. Biochem.* **179**: 404.
57. FENG, R. and Y. KONISHI (1992). *Anal. Chem.* **64**: 2090.
58. GREEN, B. and R. OLIVER (1991). *Biological Mass Spectrom.* **19**: 929.
59. CAPRIOLI, R. (1990). *Anal. Chem.* **62**: 477A.
60. ITO, Y.; T. TAKEUCHI; D. ISHI and M. GOTO (1985). *J. Chromatogr.* **346**: 161.
61. CAPRIOLI, R.; W. MOORE; M. MARTIN; B. DAGUE; K. WILSON and S. MORING (1989). *J. Chromatogr.* **480**: 247.
62. MOSELEY, M.; L. DETERDING; J. DE WIT; K. TOMER; R. KENNEDY; N. BRAGG and J. JORGENSEN (1989). *Anal. Chem.* **61**: 1577.
63. SUTER, M. and R. CAPRIOLI (1992). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**: 198.
64. MURRAY, K.; T. LEWIS; M. BEESON and D. RUSSELL (1994). *Anal. Chem.* **66**: 1601.
65. Hunt, D.; R. Henderson; J. Shabanowitz; K. Sakaguchi; H. Michel; N. Serviliri; L. Cox; E. Apella and V. Engelhard (1992). *Science* **255**: 1261.
66. CHOWDHURY, S.; V. KATTA; and B. CHAIT (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**: 9012.
67. KATTA, V. and B. CHAIT (1991). *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 8534.
68. LOO, J.; R. OGORZALEK LOO; H. UDSETH; C. EDMONDS and R. SMITH (1991). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**: 101.
69. LE BLANC, J.; D. BEUCHEMIN; K. SIU; R. GUEVREMONT and S. BERMAN (1991). *Org. Mass Spectrom.* **26**: 831.
70. STEVENSON, D.; R. FENG and A. STORER (1990). *FEBS Lett.* **277**: 112.
71. STEVENSON, D.; R. FENG; F. DUMAS; D. GROLEAU; A. MIHOC and A. STORER (1992). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**: 283.
72. APLIN, R.; J. BALDWIN; C. SCHOFIELD and S. WALEY (1990) *FEBS Lett.* **277**: 212.
73. SHNEIER, A.; C. KLEANTHOUS; R. DEKA; J. COGGINS and C. ABELL (1991). *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 9416.
74. MENARD, R.; R. FENG; A. STORER; V. ROBINSON; R. SMITH and A. KRANTZ (1991). *FEBS Lett.* **295**: 27.
75. FENG, R. and Z. YUAN (1990) Proceedings of the 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry: East Lansing MI, 998.
76. GANEM, B.; Y.-T. LI; and J. D. HENION (1991). *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 6294.
77. GANEM, B.; Y.-T. LI and J. D. HENION (1991). *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 7818.
78. BACA, M. and S. KENT (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 3992.
79. BESADA, V.; W. ANTUCH; A. CINZA; I. ROJAS; M. QUINTANA and G. PADRON (1990). *Anal. Chim. Acta.* **239**: 301.
80. PADRON, G.; V. BESADA; A. AGRAZ; Y. QUIÑONES; L. HERRERA; Y. SHIMONISHI and T. TAKAO (1989). *Anal. Chim. Acta* **223**: 361.
81. JENNINGS, K. and G. DOLNIKOWSKI (1990). *Methods in Enzymology* **193**: 37.
82. MCCRERY, D.; T. SACK and M. GROSS (1984). *Spectros. Int. J.* **3**: 57.
83. LEDFORD, E.; S. GHADERI; C. WILKINS and M. GROSS, (1980). *Adv. Mass Spectrom.* **8B**: 1707.
84. WHITE, R.; E. LEDFORD; S. GHADERI; C. WILKINS, and M. GROSS (1980). *Anal. Chem.* **52**: 1525.
85. CASTORO, J.; C. WILKINS (1993). *Anal. Chem.* **65**: 2621.
86. GROSS, M. (1990). *Methods in Enzymology* **193**: 131.
87. YOST, R.; R. BOYD (1990). *Methods in Enzymology* **193**: 154.
88. BEAN, M.; S. CARR; G. THORNE; M. REILLY and S. GASKELL (1991). *Anal. Chem.* **63**: 1473.
89. MILLINGTON, D. and J. SMITH (1977). *Organic Mass Spectr.* **12**: 264.
90. BIEMANN, K. (1986). *Anal. Chem.* **58**: 1289A.
91. BIEMANN, K. and S. MARTIN (1987). *Mass Spectrom. Reviews* **6**: 1.
92. HUNT, D.; P. GRIFFIN; J. YATES III; J. SHABANOWITZ; J. FOX and L. BEGGERLY (1989). *Techniques in Protein Chemistry*, Hugli, T., ed.; Academic: San Diego, 580.
93. JOHNSON, R.; S. MARTIN; K. BIEMANN; J. STULTS and J. WATSON (1987). *Anal. Chem.* **59**: 2621.
94. BIEMANN, K. (1988). *Biomed. Env. Mass Spectr.* **16**: 99.
95. BORDAS-NAGY, J.; D. DOMINIQUE, and K. JENNINGS (1992). *J. Am. Soc. Mass Spectrometry* **3**: 502.
96. DOWNARD, K. and K. BIEMANN (1994). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**: 966.
97. BIEMANN, K. (1992). *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 977.
98. NAYLOR, S. and G. MONETI (1989). *Biomed. Env. Mass Spectr.* **18**: 405.
99. CODY, R. and B. FREISER (1982). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **41**: 199.
100. CODY, R. and B. FREISER (1982). *Anal. Chem.* **54**: 1433.
101. BESADA, V.; W. ANTUCH; R. RODRIGUEZ; L. GONZALEZ; G. CHINEA, G. PADRON (1992) *Biotecnologia Aplicada* **9**: 1.
102. MORRIS, H. and P. PUCCI (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 1122.
103. GARNICK, R.; N. SOLLI and P. PAPA (1988). *Anal. Chem.* **60**: 2546.
104. GRIFFITHS, E. (1994). *Biotecnologia Aplicada* **11**: 1.
105. GEISOW, M.; A. AITKEN (1989). en *Protein Sequencing*. Finlay, J., Geisow, J., Eds.; IRL Press: Oxford, 85.
106. STULTS, J.; W. HENZEL; J. BOURELL and P. GRIFFIN (1990). en *Biological Mass Spectrom.*, Burlingame, A., McCloskey, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 599.
107. Food and Drug Administration. Points to consider in the production and testing of new drugs and biologicals produced by recombinant DNA technology (1985). Office of Biologics Research and Review.
108. NARITA, K.; H. MATSUO and T. NAKAJIMA (1975). en *Protein Sequence Determination*. Needleman, S. B., Ed. Springer-Verlag: Berlin, 30.
109. MATSUO, H.; Y. FUJIMOTO and T. TATSUNO (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 69.
110. YARWOOD, A. (1989). en *Protein Sequencing*. Finlay, J.; Geisow, M.; Eds. IRL Press: Oxford, 119.
111. KUMAZAKI, T.; T. NAKAKO; F. ARISAKA and S. ISHII (1986). *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1**: 100.
112. BUCKLER, D.; E. HAAS and H. SCHERAGA (1993). *Anal. Biochem.* **209**: 20.
113. ROSE, K.; L. A. SAVOY; M. G. SIMONA R. E. OXFORD and P. WINGFIELD. (1988). *Biochem. J.* **250**: 253.
114. TAKAO, T.; J. GONZALEZ; H. HORI; K. YOSHIDOME, K. SATO; Y. KAMMEI and Y. SHIMONISHI. presentado en The 40th ASMS conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Washington (Mayo 1992).
115. HENZEL, W.; T. BILLECI; J. STULTS and S. WONG (1993). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**: 5011.
116. PAPPIN, D.; P. HOJRUP and A. BLEASBY (1993). *Current Biology* **3**: 327.
117. MANN, M.; M. WILM (1994). *Anal. Chem.* **66**: 24.
118. CARR, S., M. HEMLING; M. BEAN and G. ROBERTS (1991). *Anal. Chem.* **63**: 2802.