

**ELS PREMIS NOBEL
DE L'ANY 2002
SOBRE EL
PREMI NOBEL DE QUÍMICA
CONCEDIT A
JOHN B. FENN,
KOICHI TANAKA
I KURT WÜTHRICH,
A CÀRREC DE
DAVID ANDREU,
DE LA UNIVERSITAT
POMPEU FABRA**

UN NOBEL PER A LA QUÍMICA BIOANALÍTICA DE PROTEÍNES

La Reial Acadèmia Sueca de Ciències ha atorgat el Premi Nobel de Química d'enguany a tres científics que han impulsat avenços tecnològics amb aplicacions importants en el camp de les biomolècules. El text oficial de l'Acadèmia diu que el Premi s'ha concedit «pel desenvolupament de mètodes per a la identificació i anàlisi estructural de macromolècules biològiques». Més específicament, la meitat del Premi (5.000.000 de corones sueques) ha correspost a 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 John B. Fenn i Koichi Tanaka «per haver desenvolupat mètodes d'ionització suau per desorció que permeten l'anàlisi per espectrometria de massa de macromolècules biològiques». En aquesta recensió posarem l'accent en l'impacte que les metodologies enguany guardonades tenen en el camp específic de la química de proteïnes. Aquest enfocament obeeix, d'una banda, a la pròpia especialització de l'autor, però també, d'altra banda, al fet que les proteïnes han estat no tan sols el primer i principal camp de prova d'aquestes metodologies, sinó que són àmpliament reconegudes com les biomolècules on de manera més fascinant es combinen la diversitat estructural amb la rellevància biològica.

RMN DE PROTEÍNES

El Premi Nobel a Kurt Wüthrich (1938) ha estat poc sorprenent, atès l'amplíssim consens sobre la importància dels seus treballs per a l'anàlisi conformacional de proteïnes en solució per ressonància magnètica nuclear (RMN). Wüthrich (figura 1)



FIGURA 1. Kurt Wüthrich.

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'Institut Scripps aconsegueix una fita molt inusual: repetir dos anys seguits com a institució guardonada.

Fins fa uns anys, l'única tècnica disponible per a determinar l'estructura tridimensional de les proteïnes era la cristal·lografia de raigs X que, com el seu nom indica, requereix que la proteïna a estudiar es trobi en estat cristal·lí. Els treballs de Wüthrich 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.

El paper fonamental de la RMN en la determinació d'estructures moleculars és ja ben conegut. Bona part de l'èxit de la seva aplicabilitat a la majoria de molècules orgàniques i inorgàniques de mida 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 polsos 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 mida gran com les proteïnes. Els centenars, per no dir milers de protons d'aquestes donaven lloc a veritables jungles de pics, l'assignació dels quals, a cadascun dels protons de la proteïna, constituïa a primera vista un trencaclosques insoluble. A partir dels anys vuitan-

ta, Wüthrich va encarar aquest repte formidable desenvolupant els anomenats *mètodes d'assignació seqüencial*, que constitueixen la pedra angular de la moderna RMN de proteïnes. Aquests mètodes, basats en la RMN bidimensional, fan possible correlacionar no tan sols els protons de cadascun dels residus de la proteïna entre ells, sinó també amb els dels residus veïns i, d'aquesta manera, anar progressivament establint a quin senyal dóna lloc cada protó. L'assignació seqüencial, completada amb informació sobre distàncies espacials entre determinats protons i amb altres paràmetres, permet definir un conjunt de distàncies interprotòniques que serveixen com a punt de partida per a determinar l'estructura tridimensional de la proteïna, utilitzant algorismes de geometria de distàncies. Una visió molt simplista de com té lloc aquest procés la podem trobar a la figura 2.

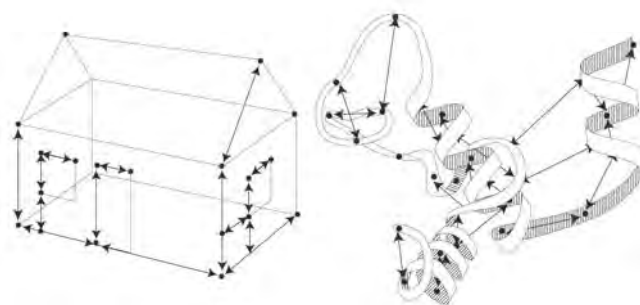


FIGURA 2. Coneixent totes les mides d'un objecte (p. ex., una casa), hom pot deduir-ne l'estructura en tres dimensions. De la mateixa manera, mesurant un gran nombre de distàncies entre els protons d'una proteïna és possible crear una imatge tridimensional de la seva estructura.

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 prop d'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 com a complementària de la difracció (també anomenada *crystal·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. D'altra banda, la cristal·lografia de raigs X permet determinar a molt elevada resolució estructures de mida molt gran (p. ex., complexos entre diverses proteïnes) que, ara per ara, no són fàcilment accessibles per RMN. En contrapartida, la RMN fa possible explorar parts d'una proteïna no estructurades o molt mòbils 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 boges. Wüthrich i els seus col·legues van provar, mitjançant la RMN, que la proteïna (figura 3) es pot considerar composta per dues regions molt ben diferenciades, una ordenada i una altra pràcticament gens.

Molt recentment, el mateix grup de Wüthrich ha introduït una sèrie d'innovacions metodològiques, com ara la RMN de relaxació transversal optimitzada (TROSY) o les tècniques CRINEPT (transferència de polarització millorada per la correlació creuada), que, unides a la utilització de mostres enriquides isotòpicament, permeten augmentar notablement la franja de talles assolibles 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'estructura tridimensional del complex de *chaperonines* GroEL-GroES d'*Escherichia coli*, de 900 kDa.

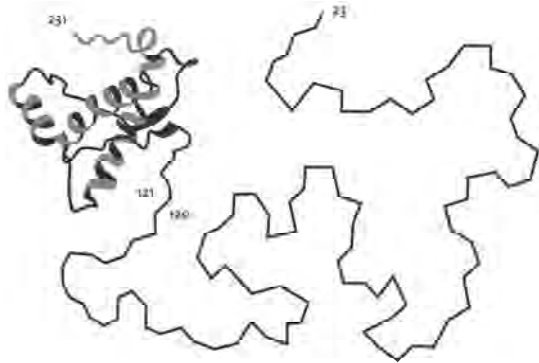


FIGURA 3. Representació de l'estructura tridimensional de la forma normal («saludable») de la proteïna prionica, determinada per RMN en solució aquosa pel grup de Wüthrich. La cadena d'aminoàcids s'estructura predominantment en forma helicoidal a la zona C-terminal (residus 121-231), mentre que la regió N-terminal (residus 23-120) és desordenada i flexible.

72

ESPECTROMETRIA DE MASSES DE PROTEÏNES

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 enguany comparteixen, i novament amb les proteïnes com a principal àrea d'aplicació.

Recordem que l'espectrometria de masses (EM) és una tècnica analítica que ens 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 4): convertir la mostra a analitzar en ions i separar-los d'acord amb les seves diferents relacions massa/càrrega (m/z). Totes les varietats d'EM es caracterit-

zen també per la rapidesa d'adquisició de dades i per una elevada sensibilitat. Avui dia, l'EM s'utilitza de manera 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 ful·lerens 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 mida petita o mitjana i, per tant, relativament fàcils d'ionitzar. Amb tot, el repte de poder ionitzar i analitzar macromolècules biològiques atreïa els científics des de feia temps. L'elevada grandària d'aquestes biomolècules —en relació amb els analits habituals en EM— no ha de fer oblidar que, de fet, segueixen essent estructures extraordinàriament petites, amb masses consegüentment minúscules. La molècula d'hemoglobina, per exemple, pesa 10^{-19} g (!). L'objectiu de l'EM és «pesar» molècules com aquestes, i el primer pas en aquest sentit és el que anomenem *ionització per desorció*: aconseguir que les molècules individuals de proteï-

73

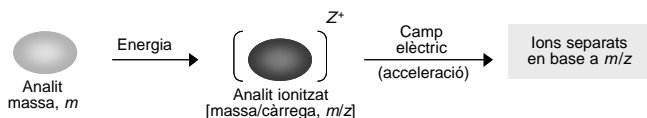


FIGURA 4. Fonament de l'espectrometria de masses. Comunicant l'energia apropiada a una molècula, hom aconsegueix ionitzar-la, la qual cosa permet separar-la en el si d'un camp elèctric, on experimenta una acceleració determinada per la relació massa/càrrega.

na passin d'associar-se les unes amb les altres (i amb el dissolvent) a una fase dispersa, formant un núvol de molècules ionitzades. Un cop assolit això, els ions podran separar-se aprofitant l'acceleració que la relació massa/càrrega els permet adquirir: els més lleugers i/o de càrrega més alta seran més ràpids que els més pesants i/o de càrrega inferior, la qual cosa farà possible l'anàlisi.

Als anys setanta es van aconseguir els primers èxits en la transformació de biomolècules (pèptids, principalment) en els seus ions en fase gasosa. 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 ara proteïnes o àcids nucleics. El descobriment que l'Acadèmia sueca ha considerat mereixedor de la meitat del Premi Nobel d'enguany és precisament el d'aquests mètodes d'ionització per desorció, en particular dels dos actualment més utilitzats: electroesprai i MALDI.

IONITZACIÓ PER ELECTROESPRAI



FIGURA 5. *John B. Fenn.*

John B. Fenn (figura 5) ha estat premiat per la seva contribució fonamental al desenvolupament de la ionització per electroesprai. 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 i, uns anys després, s'involuà en programes de recerca ae-

roespacial. 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 que 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), ara com a catedràtic d'enginyeria química (Fenn plantejaria 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 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 6), queden carregades. La primera descripció de l'efecte electroesprai va fer-la Dole (1968), que va proposar també el model fisicoquímic (*charge residue model*), que avui continua essent acceptat com a explicació per a aquest encara força enigmàtic procés. Segons aquest model, les gotes tendeixen a perdre volum —a causa de l'expansió brusca que comporta el procés de nebulització i de 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 provocant l'anomenada *explosió de Rayleigh*, en la qual es generen microgotes encara més petites. En última instància, les gotes acaben alliberant ions que, gràcies al camp elèctric, es poden dirigir cap a un analitzador de massa.

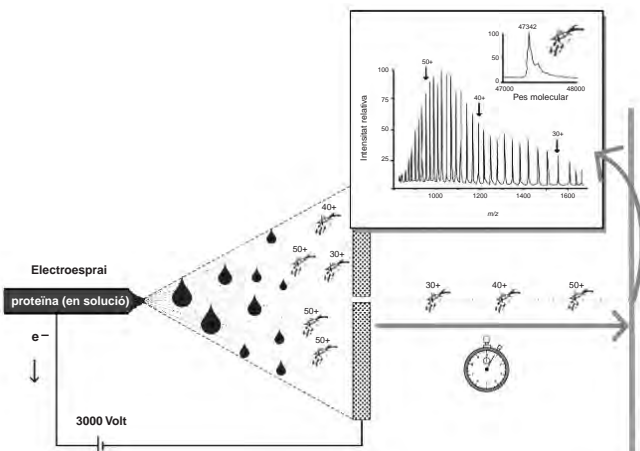


FIGURA 6. Representació esquemàtica de la ionització per electroesprai d'una proteïna. La solució de proteïna, injectada per un capil·lar (p. ex., un sistema de nano-HPLC) a la cambra d'ionització, genera un aerosol en expandir-se bruscament. El camp elèctric que hi ha entre el capil·lar i les parets de la cambra provoca la ionització de les microgotetes generades, que progressivament van perdent volum (vegeu el text) i acaben donant ions amb càrrega múltiple, separables en un analitzador de massa en funció de les seves relacions m/z .

76

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 poc atractius. 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, 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 6) que resulta de les diverses espècies multicarregades de l'anàlit (part superior

del requadre, figura 6) per un sistema d'equacions simultànies. En l'exemple de la figura 6, 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 20 i 60, 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'electroesprai 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, que, com que es pot implementar en plataformes instrumentals relativament senzilles, resulta assequible a costos notablement inferiors als de la major part de la instrumentació d'EM.

77

IONITZACIÓ INDUÏDA PER LÀSER I ASSISTIDA PER MATRIU (MALDI)



FIGURA 7. *Koichi Tanaka.*

L'altra meitat de la meitat del Nobel d'enguany destinada a EM ha estat per a Koichi Tanaka (1959), vinculat amb Shimadzu Corporation, una companyia japonesa d'instrumentació científicomèdica, al llarg de tota la seva vida professional (figura 7). Així com el Nobel a Fenn ha estat poc sorprenent, el de Tanaka ha suscitat potser una mica més d'enrenou entre

els experts pel seu perfil «atípic» (enginyer, sense doctorat; industrial, sense vincles acadèmics; jove) i, sobretot, pel fet que la seva contribució al desenvolupament de la tècnica MALDI fos relativament primerenca, sense gaire 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, el que hom pot afirmar és que, amb la distinció atorgada a Tanaka, l'Acadèmia sueca ha volgut, com en altres ocasions, premiar per sobre de tot la idea primigènia (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, Tanaka va presentar per primera vegada l'anàlisi d'una proteïna intacta per EM. En dues publicacions de l'any següent va ampliar aquest 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 poder demostrar que en aquestes condicions la mostra es volatilitzava formant ions amb m/z corresponent a la massa de la proteïna.

Abans de Tanaka hi havia hagut ja intents infructuosos d'utilitzar el làser per tal de solucionar el problema de la volatilització/ionització de proteïnes. Per exemple, un grup rus havia aconseguit ionitzar aminoàcids per bombardeig amb làser, i n'havia evitat la degradació química. El 1985, a la universitat de Múnster (Alemanya), Michael Karas i Franz Hillenkamp (més mereixedors que Tanaka del viatge a Esto-

colm, 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, com a resultat, s'ionitzaven. Karas i Hillenkamp havien aconseguit així 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 en 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) a la qual les cadenes laterals d'aminoàcids aromàtics com *Phe*, *Tyr* o *Trp*, no absorbién, la qual cosa resultava essencial per a 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 8) és una fusió d'ambdues aproximacions: fa servir, com Tanaka, un làser de nitrogen amb longitud d'ona encara més baixa ($\lambda = 336$ nm), i utilitza, com Karas i Hillenkamp, 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 pulsativa, unes vint vegades per segon. 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 corres-

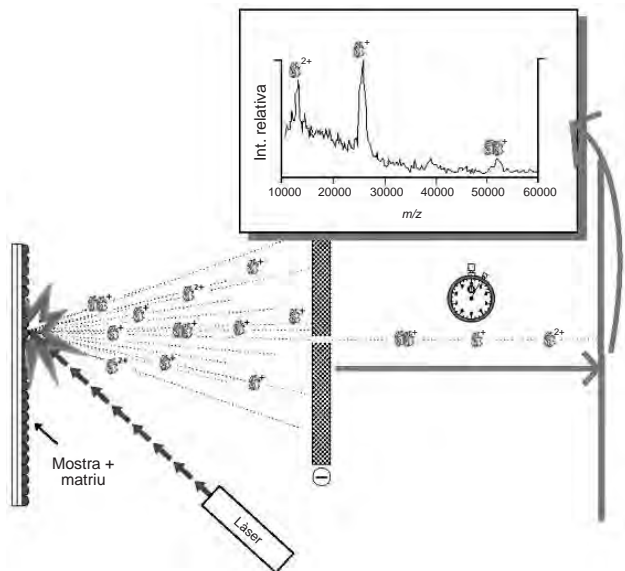


FIGURA 8. Representació esquemàtica de la ionització per desorció amb làser assistida per matriu (MALDI) d'una proteïna. La irradiació amb làser d'una matriu (un cromòfor amb $\lambda_{m\grave{a}x}$ coincident amb la del làser), on s'ha dispersat prèviament la proteïna, provoca la volatilització/ionització de la matriu, que permet la ionització de l'anàlit 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 monomoleculares amb càrrega +1 ($m/z \approx 25\,700$) i +2 ($m/z \approx 12\,800$), així com un dímer no covalent amb càrrega +1 ($m/z \approx 51\,500$).

ponents valors m/z mitjançant una senzilla expressió: $T = k(m/z)^{1/2}$, on k és una constant de l'instrument. 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, de retruc, en un pilar fonamental en els estudis de proteòmica.

Tot i la sensible millora en exactitud que comporta respecte als mètodes convencionals, l'EM de proteïnes no hauria assolit el seu 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'analit i l'aprofita per a extreure'n informació estructural, les tècniques que acabem de veure no indueixen nivells de fragmentació substancials i permeten accedir, almenys en primera instància, tan sols a la massa global de la proteïna, una informació valuosa, però totalment insuficient per a identificar-la de manera inequívoca.

Ben poc després que Fenn, Tanaka i altres introduïssin l'EM de biomolècules que acabem de veure, emperò, 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 mapatge peptídic clàssic.

Els procediments clàssics de determinació d'estructura primària de proteïnes (que encara perviuen, en forma d'exercicis, a la majoria de texts de bioquímica) solien 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 d'ací les estructures primàries de les corresponents proteïnes, recopilades en bases de dades informàtiques. Aquest veritable tresor d'informació, junt amb la sen-

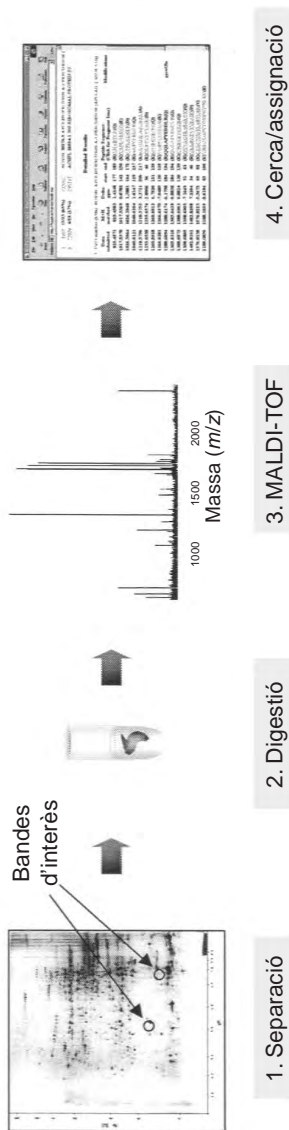


FIGURA 9. Etapes principals en la identificació d'una proteïna per PMF. 1) L'electroforesi bidimensional d'un proteoma permet (per comparació amb el de referència) identificar bandes d'expressió diferencial que se seleccionen per a l'anàlisi; 2) la proteïna es digereix sobre la banda, retallada del gel; 3) els pèptids, producte de la digestió, s'anàlizen per EM MALDI-TOF; i 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.

sibilitat, exactitud i —sobretot— rapidesa amb què es poden determinar les masses de pèptids per MALDI-TOF, fan possible identificar proteïnes amb molta fiabilitat i, sobretot, notable estalvi de temps i esforç respecte als procediments convencionals. Tot això ha suposat 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, considerem breument una de les tècniques proteòmiques més habituals, l'anàlisi de perfils proteolítics per EM MALDI-TOF, també conegut com a PMF (*peptide mass fingerprint*) (figura 9). En aquesta aproximació, una proteïna d'una determinada espècie biològica (p. ex., d'*Homo sapiens*) es digereix amb una proteasa (habitualment tripsina) i la barreja de pèptids resultants, sense ulterior separació, s'analitza tot seguit per EM MALDI-TOF. El caràcter únic de cada seqüència proteica (és a dir, el fet que el nivell de degeneració d'una seqüència respecte a la resta de proteïnes d'una mateixa espècie sigui molt baix) 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 (del conjunt de pèptids produïts en la digestió) amb cadascun dels espectres de massa teòrics que s'obtidrien en digerir *in silico* el proteoma complet d'*H. sapiens* disponible a la base de dades. Aquesta comparació permetrà detectar proteïnes amb un perfil proteolític *in silico* més o menys coincident amb l'experimental. Això permetrà ordenar, de millor a pitjor encaix amb les dades experimentals, les diverses proteïnes i identificar-ne la

més plausible. Tot i el seu caràcter probabilístic, el mètode és d'elevada fiabilitat.

En altres modalitats d'anàlisi proteòmica per EM, hom arriba a efectuar una seqüenciació real de la proteïna, a còpia de fragmentar —en un compartiment especialitzat de l'instrument— algun dels pèptids obtinguts en la digestió anterior. Novament, el caràcter únic de les seqüències a què fèiem referència, fa possible una identificació inequívoca (en contrast amb el caràcter probabilístic de l'assignació a partir del PMF), a partir d'un segment relativament curt (al voltant de vuit aminoàcids) de la seqüència. Tècniques com aquesta i altres de relacionades han fet augmentar espectacularment la fiabilitat, sensibilitat i rapidesa amb què poden avui analitzar-se les proteïnes. En aquest sentit, la proteòmica ha esdevingut ràpidament una eina fonamental en els estudis biològics i biomèdics.

En resum, els dos processos d'ionització suau premiats amb el Nobel de Química del 2002 i que aquí hem ressenyat succintament han protagonitzat, per la seva eficàcia i complementarietat, un veritable canvi de paradigma —en termes kuhnians— 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 paral·lela a l'experimentada per la RMN, gràcies a les aportacions de Wüthrich i altres. En definitiva, 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 d'enguany, ha volgut reconèixer adequadament.