

# Premio Nobel 2002

## La chimica e la spettrometria di massa

di Lorenza Operti e Francesco De Angelis

*John B. Fenn (New York, 1917) ha ottenuto il PhD in Chimica nel 1940 alla Yale University dove ha svolto la sua attività fino al 1994. Dal 1994 opera presso la Virginia Commonwealth University di Richmond. Ha messo a punto la sorgente "electrospray" (ESI) per la ionizzazione di macromolecole. Koichi Tanaka (Toyama, 1959) si è laureato alla Tohoku University e lavora presso la Shimadzu Corp. a Kyoto. È stato il primo a utilizzare la ionizzazione per desorbimento laser "soft" (SLD) per macromolecole biologiche.*

Nel sito della Reale Accademia Svedese delle Scienze si legge che il Premio Nobel per la Chimica 2002 è stato conferito "per lo sviluppo di metodi di identificazione e di analisi strutturale di macromolecole biologiche" con metà premio assegnato congiuntamente a J.B. Fenn e K. Tanaka "per il loro sviluppo di metodi di ionizzazione per desorbimento soft per analisi spettrometriche di massa di macromolecole biologiche".

La spettrometria di massa è una metodica nata alla fine del diciannovesimo secolo e i primi spettri di piccole molecole vennero riportati nel 1912 da J.J. Thomson (Premio Nobel in Fisica, 1906). Alcuni Premi Nobel in Chimica si basano su analisi spettrometriche di massa come, ad esempio, la scoperta di isotopi di elementi non-radioattivi (F.W. Aston, 1922); ma è la prima volta che la spettrometria di massa ed il suo sviluppo vengono citati tra le motivazioni per l'attribuzione del Premio Nobel per la Chimica.

Da decenni gli scienziati stanno cercando risposte a quesiti fondamentali che riguardano i processi biochimici coinvolti nelle cellule viventi, la comunicazione tra molecole biologiche per produrre cellule sane e il modo in cui i processi si deteriorano nelle cellule malate. Dalla determinazione della struttura del DNA ai raggi X nel 1953 alla recente scoperta della sequenza del genoma umano, gli studiosi hanno compiuto progressi significativi anche grazie

L. Operti, Presidente della Divisione di Spettrometria di Massa/SCI, Università di Torino; F. De Angelis, Vice-Presidente della SCI, Università de L'Aquila.

all'impiego di strumentazione sempre più sofisticata, perfezionata ed adeguata alle macromolecole biologiche. L'integrazione delle informazioni ottenute dalla 'genomica', e dai campi in rapida evoluzione della 'proteomica' (studio delle proteine espresse da un genoma) e della 'metabonomica' (studio dei metaboliti cellulari) è la chiave per comprendere le complesse interazioni biologiche ed i meccanismi delle malattie. Negli ultimi vent'anni, l'uso della spettrometria di massa ha permesso a chimici e biologi di analizzare strutture e funzioni di complesse combinazioni di molecole e di studiare proteine, carboidrati, membrane cellulari ed altre biomolecole. Come è noto, lo spettrometro di massa è uno strumento che permette di misurare la massa di molecole trasformandole dapprima in



Koichi Tanaka

ioni in fase gassosa e misurandone poi le traiettorie sotto l'effetto di campi magnetici o elettrici. La condizione necessaria è, quindi, la conversione di molecole neutre in ioni gassosi e tale condizione ha rappresentato per lungo tempo un ostacolo all'utilizzo della spettrometria di massa in campo biologico. Infatti, il campione da analizzare deve essere volatile per venire ionizzato secondo i metodi classici di interazione con elettroni o fotoni o altri ioni, mentre le molecole biologiche sono fragili, termicamente instabili e polari.

### Ionizzazione Electrospray

La sorgente ESI è stata ideata da J. Zeleny già nel 1917 e venne poi sviluppata nel laboratorio di Fenn a partire dal 1984, quando venne collegata ad uno spettrometro di massa. I primi risultati sono stati presentati nel 1988 alla Conferenza dell'ASMS (American Society for Mass Spectrometry) e riguardavano l'identificazione di polipeptidi e proteine con massa molecolare maggiore di 40.000 Da. Già nell'anno successivo, Fenn pubblicò su *Science* lo spettro di massa, ottenuto mediante ionizzazione elettrospray, del dimero dell'albumina bovina, con massa molecolare di 133.000 Da. Il funzionamento della sorgente ESI può essere brevemente descritto come segue: l'analita in soluzione passa attraverso un ago cui è applicato un potenziale di alcuni kV: si forma una nebbia di goccioline cariche

### Bibliografia utile

"Liquid Chromatography - Mass Spectrometry", W.M.A. Niessen (Ed.), Marcel Dekker, 1999.

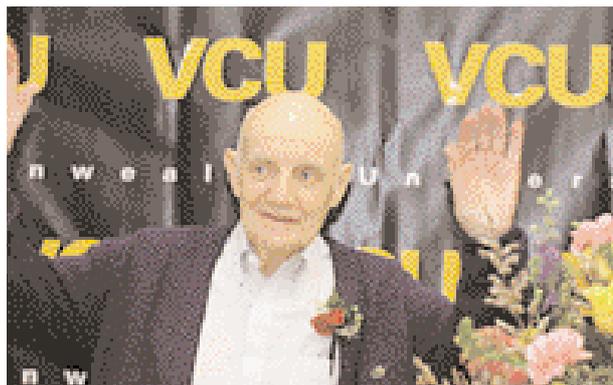
"Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics", M.R. Wilkins *et al.* (Eds.), Springer, 1997.

"Measuring Mass: from Positive Rays to Proteins", M.A. Grayson (Ed.) for ASMS, Chemical Heritage Press, 2002.

"Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules", J.B. Fenn *et al.*, *Science*, 1989, **246**, 64.

"Protein and Polymer Analysis up to m/z 100.000 by Laser Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry", K. Tanaka *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1988, **2**, 151.

che si muovono verso la fenditura di ingresso dello spettrometro di massa. Un flusso di gas in direzione contraria fa evaporare il solvente, diminuendo le dimensioni delle goccioline finché la densità di carica diventa tale da provocarne l'esplosione in ioni multicarica in fase gassosa. Le cariche positive sono tipicamente dovute alla protonazione dei siti accessibili della macromolecola e variano da 2 a 40 o più. Poiché nello spettro di massa compare il rapporto massa/carica, si osserva una serie regolare di picchi dovuti a ioni riferiti alla stessa massa, ma con carica diver-



John B. Fenn

sa. Con un'opportuna deconvoluzione matematica si ottiene infine la massa molecolare del campione con un'altissima accuratezza, perché basata sull'analisi simultanea di numerose specie ioniche. Tra le applicazioni di maggiore interesse è lo studio di complessi non-covalenti quali proteina-proteina, proteina-legante ed enzima-substrato.

#### *Desorbimento laser soft*

La luce laser come sorgente di energia per la ionizzazione è stata provata da numerosi gruppi di ricerca negli anni Ottanta; nel 1985 M. Karas e F. Hillenkamp di Münster ne mostrarono un perfezionamento che prevedeva la dissoluzione del campione, specie a bassa massa molecolare, in una matrice opportuna. Tanaka è stato il primo a trovare una giusta combinazione tra energia e lunghezza d'onda del laser e le proprietà di assorbimento e trasferimento di calore della matrice e della struttura molecolare dell'analita. Nel 1987, infatti, presentò ad un Congresso ad Osaka spettri di massa di proteine intere. Attualmente la ionizzazione SLD più diffusa per l'analisi di proteine è il desorbimento laser assistito da matrice (MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), che permette di trasferire in fase gassosa macromolecole intere con poche cariche, messo a punto da Karas e Hillenkamp poco dopo gli esperimenti di Tanaka. L'accoppiamento della sorgente MALDI con un rivelatore a tempo di volo (TOF) ha permesso la determinazione della massa molecolare di numerosissime macromolecole biologiche e rappresenta una pietra miliare nel campo della proteomica.

E per concludere, citando J.B. Fenn: *“La spettrometria di massa è l'arte di pesare atomi e molecole per misurarne la massa. Tale informazione è a volte sufficiente, frequentemente necessaria, e sempre utile per determinare l'identità di una specie”.*