

# Factibilidad, a través de una nueva interfase, de la espectrometría de masas de lipopolisacáridos separados en geles de poli(acrilamida)

Elder Pupo,  Eugenio Hardy

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)  
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba  
Fax: 271-4764; 271-8070; 33-6008; E-mail: ehardy@cigb.edu.cu

## RESUMEN

Por vez primera se evidenció que es factible el análisis estructural mediante espectrometría de masas (MS) de especies de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas, que han sido separados con muy alta resolución, mediante electroforesis en gel plano de poli(acrilamida) (slab-PAGE). En particular, se demuestra el impacto directo de este resultado en cuatro direcciones relacionadas con el análisis de LPS: análisis espectrométrico de las especies microaisladas, preparación de muestras para MS, análisis de la separación bidimensional y heterogeneidad del LPS, y la caracterización estructural de lipopolisacáridos de interés médico (p. ej., LPS de la cepa RM.118 [Rd] de *Haemophilus influenzae*) y biológico (p. ej., LPS de la cepa HMK de *Vibrio fischeri*). Para lograr la interfase entre la separación altamente resolutoria por slab-PAGE y el análisis por MS, fue necesario desarrollar un nuevo método con características únicas que permitió el microaislamiento de las especies de LPS: eficiencia de recuperación elevada, alta precisión, no modificación del material microaislado y generalidad (aplicable a LPS de naturaleza y fuentes diferentes). De esta manera quedan sustentadas las bases para el análisis fino estructural de la naturaleza altamente compleja, en especies moleculares, de los LPS bacterianos. Los experimentos que demuestran este resultado se divulgaron en cinco publicaciones, en las revistas líderes de bioquímica analítica.

## Introducción

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gramnegativas. El estudio de estas biomoléculas es de gran importancia desde el punto de vista médico, debido, fundamentalmente, a que: (i) los LPS desempeñan un papel mediador clave en los procesos de infección, la sepsis, y el shock séptico provocados por las bacterias gramnegativas en el hombre, lo cual está asociado a una elevada tasa de morbilidad y mortalidad; (ii) los LPS constituyen el blanco primario de la respuesta inmune contra las bacterias gramnegativas en los seres humanos y son antígenos importantes para el desarrollo de vacunas contra estos agentes patógenos; y (iii) debido a su elevada capacidad inmunoestimuladora, los LPS y sus derivados sintéticos son adyuvantes potentes que se están desarrollando para la vacunación de los seres humanos.

Un problema fundamental que enfrenta la investigación de los LPS en estos momentos, tanto en los estudios de su estructura como en los de su función biológica, es la gran heterogeneidad de estas macromoléculas y la inexistencia de métodos que permitan la separación completa de sus especies moleculares individuales para el posterior análisis y uso. En esta investigación se establecieron, por vez primera, un conjunto de nuevos métodos que posibilitaron el microaislamiento de las especies moleculares intactas de LPS y su posterior caracterización estructural, mediante espectrometría de masas.

## Resultados

El principal aporte de esta investigación es que, por vez primera se logró el análisis estructural, mediante espectrometría de masas, de especies de LPS que han sido separadas con muy alta resolución, por medio de

electroforesis en gel plano de poli(acrilamida) (slab-PAGE) (vea un resultado típico en la Figura 1). Ello sienta las bases para el análisis fino estructural de la naturaleza altamente compleja, en especies moleculares, de los LPS bacterianos.

En particular, este resultado tuvo un impacto directo en cuatro direcciones relacionadas con el análisis de LPS:

### Análisis espectrométrico

Se demostró mediante espectrometría de masas por electronebulización (ESI-MS), que es posible estimar la abundancia relativa de las especies moleculares contenidas en cada fracción de LPS, separadas mediante slab-PAGE, y determinar la secuencia de sus oligosacáridos defosforilados y permetilados [1].

Se demostró que el análisis directo por espectrometría de masas basada en la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS), permite determinar la abundancia relativa de las especies moleculares contenidas en cada fracción de LPS separada por slab-PAGE. Además, se puede determinar la masa molecular exacta de las especies de LPS *O*-desaciladas o la de sus oligosacáridos intactos, y la presencia o no en estas de diferentes estados de fosforilación del lípido A [2].

### Preparación de muestras para espectrometría de masas

Se demostró que es posible mejorar la sensibilidad de los análisis de los LPS mediante ESI-MS y MALDI-TOF-MS, con el empleo de las especies de LPS microaisladas. Los espectros de masas de las especies microaisladas son mucho más simples, tienen una mayor intensidad y una mejor relación señal-ruido [1, 2].

1. Gulín S, Pupo E, Schweda EK, Hardy E. Linking mass spectrometry and slab-polyacrylamide gel electrophoresis by passive elution of lipopolysaccharides from reverse-stained gels: analysis of gel-purified lipopolysaccharides from *Haemophilus influenzae* strain Rd. *Anal Chem* 2003;75:4918-24.

2. Pupo E, Phillips NJ, Gibson BW, Apicella MA, Hardy E. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry of lipopolysaccharide species separated by slab-polyacrylamide gel electrophoresis: high-resolution separation and molecular weight determination of lipooligosaccharides from *Vibrio fischeri* strain HMK. *Electrophoresis* 2004;25:2156-64.

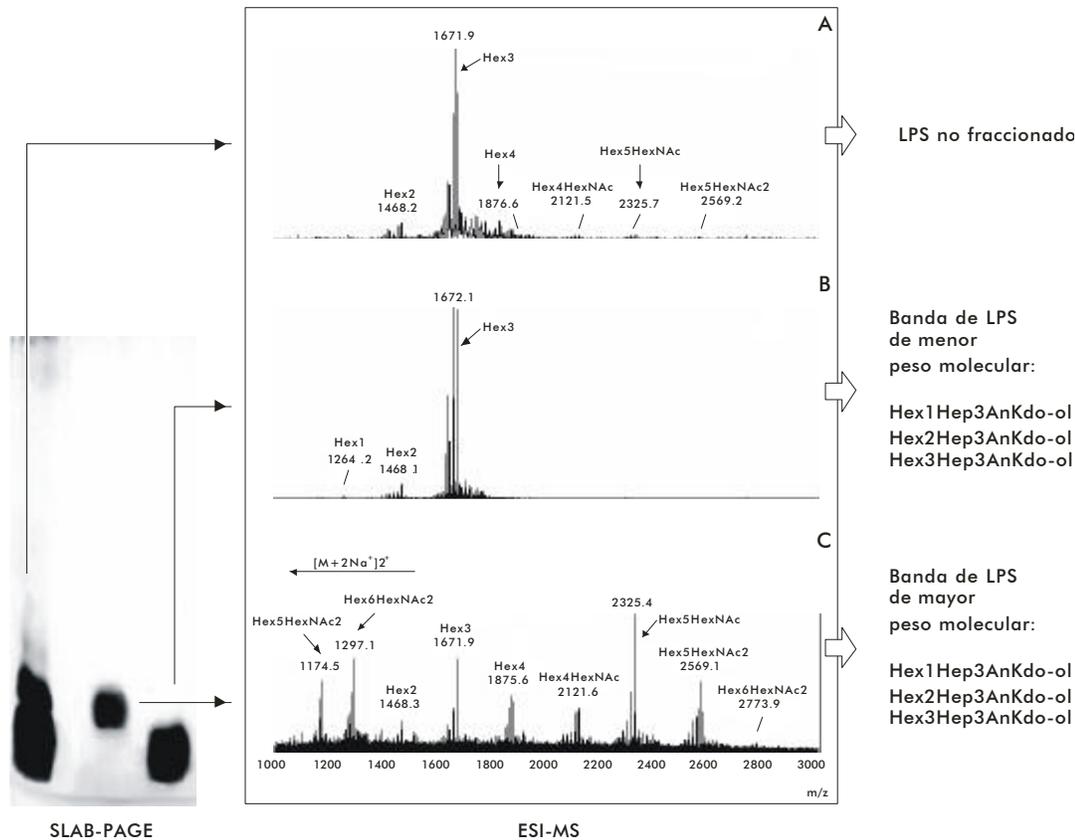


Figura 1. Análisis mediante ESI-MS de los lipopolisacáridos de la cepa Rd de *H. influenzae* separados por slab-PAGE [1]. Observe, en la columna derecha de la figura, las especies moleculares contenidas en cada banda separada por slab-PAGE.

### Separación y heterogeneidad de LPS

La separación en una segunda dimensión por espectrometría de masas de las especies microaisladas demostró, de forma inequívoca, que las fracciones de LPS separadas mediante slab-PAGE no son homogéneas. Las fracciones realmente no están constituidas por una, sino por varias especies moleculares diferentes [1, 2].

### Análisis de LPS de interés

La mayor sensibilidad del análisis permitió la detección e identificación, mediante ESI-MS, de especies moleculares minoritarias del LPS de *Haemophilus influenzae* cepa Rd, isoméricas o de mayor peso molecular, no antes descritas en la literatura [1].

Por primera vez se realiza la separación altamente resolutive, la detección y la determinación precisa de la masa molecular de las especies moleculares del LPS de *Vibrio fischeri* cepa HMK. El espectro de masas del LPS *O*-desacilado mostró que esta biomolécula está constituida por 6 especies moleculares. Las especies de mayor peso molecular, con la mayor abundancia relativa, mostraron una relación  $m/z$  de 3767.1 y 3890.1, mientras que las especies de menor peso molecular tuvieron una  $m/z$  de 2522.5, 2645.4, 2725.7, y 2848.7. Estas especies de LPS no solo difirieron en la masa molecular de sus oligosacáridos sino también en el estado de fosforilación del lípido A (bifosforilado o bifosforilado con un sustituyente de fosfoetanolamina) [2].

Para lograr la interfase entre la separación altamente resolutive mediante slab-PAGE y el análisis por espectrometría de masas, fue necesario encontrar y establecer un método que permitiera el microaislamiento de especies de LPS. En este sentido los aportes son los siguientes:

Por primera vez se logró recuperar especies individuales de LPS, a partir de geles de poliácridamida. Las características del nuevo método de recuperación fueron únicas: elevada eficiencia, precisión y generalidad (aplicabilidad a LPS de naturaleza y fuentes diferentes) [3, 4].

Mediante ensayos bioquímicos (determinación de la actividad de lisis de amebocitos de *Limulus*, inducción de factor de necrosis tumoral alfa, y generación de anticuerpos policlonales anti-LPS) [3-5] y por espectrometría de masas [1, 2], se demostró que las especies de LPS microaisladas son funcionales y estructuralmente intactas.

### Perspectivas

La disponibilidad de la nueva metodología establecida en este trabajo para el aislamiento y la caracterización, por primera vez, de especies individuales de LPS será de gran utilidad para el entendimiento de la estructura y la actividad biológica de las mezclas complejas de LPS. Asimismo, permitirá el estudio, a nivel molecular, de la interacción de los LPS con los animales y los seres humanos.

3. Hardy E, Pupo E, Santana H, Guerra M, Castellanos-Serra LR. Elution of lipopolysaccharides from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1998;259:162-5.

4. Pupo E, Lopez CM, Alonso M, Hardy E. High-efficiency passive elution of bacterial lipopolysaccharides from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2000;21:526-30.

5. Pupo E, Aguila A, Santana H, Nunez JF, Castellanos-Serra L, Hardy E. Mice immunization with gel electrophoresis-micropurified bacterial lipopolysaccharides. *Electrophoresis* 1999;20:458-61.

Este conocimiento puede brindar nuevas estrategias útiles para: (i) el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas gram-negativas y el shock séptico, (ii) el diseño racional de las vacunas que emplean LPS como antígeno, y (iii) el diseño racional de nuevas formulaciones de vacunas que emplean LPS como adyuvante.

### **Agradecimientos**

Al resto de los autores de este trabajo: Lila Castellanos-Serra, Cruz M López, Mabel Alonso, Héctor Santana, Maribel Guerra, Juan F Núñez, Antonio Águila, Elke K.H. Schweda, Sofia Gulin, Michael A. Apicella, Bradford W. Gibson, Nancy J. Phillips.