Título del trabajo

Análisis del perfil de dispersión de la relajación magnética del protón en soluciones de hemoglobina intracelular: modelo de tres sitios de intercambio

Manuel Arsenio Lores Guevara1   
Carlos alberto Cabal Mirabal 2  
Robert N. Muller3

Sophie Laurent3   
Fabian Tamayo Delgado1  
Juan Carlos García Naranjo1

1 Centro de Biofísica Médica, Santiago de Cuba, Cuba

2 Facultad de Física Universidad de la Habana, La Habana, Cuba

3 Laboratoire de RMN et d’Imagerie Moléculaire. Service de Chimie Générale, Organique et Biomédicale. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université de Mons. Mons, Belgique

RESUMEN

Introducción:

El modelo de intercambio de tres sitios (3SEM) se utilizó correctamente para describir la dispersión de relajación magnética de protones () () en muestras intracelulares de hemoglobina A (HbA) y hemoglobina S (HbS) a 310 K.

Métodos:

Las muestras de HbA y HbS se obtuvieron de sangre total de donantes voluntarios y de pacientes, respectivamente, y procesada por métodos clásicos (centrifugación, decantación y ciclos de congelación-descongelación). Los perfiles 1HMRD (20 kHz–60 MHz) se obtuvieron utilizando un Relaxómetro de RMN de Ciclo Rápido de Campo (Stelar FFC 2000 Spinmaster) y relaxómetros Minispec (Mq20, Mq60).

Resultados:

El 3SEM utilizado incluye el aporte de protones lábiles de la estructura de la proteína; y la contribución de la relajación cruzada a la dispersión se estimó como: al menos un orden de magnitud menor que la dispersión total. Se encontraron dos dispersiones: una describiendo adecuadamente el tiempo de correlación rotacional de la hemoglobina y otra probablemente relacionada con moléculas de agua interna y/o hidratada con tiempos de correlación efectivos mayores a 1 ns y tiempos de residencia principal menores al tiempo de correlación rotacional de la proteína. El uso del 3SEM crea las condiciones para explicar adecuadamente la relajación magnética de protones durante el proceso de polimerización de HbS.

INTRODUCCIÓN

La relajación magnética de protones () se ha utilizado con éxito para desarrollar aplicaciones médicas [1–4] en la enfermedad de células falciformes (ECF) [5-10]. El comportamiento de los tiempos de relajación transversal () y longitudinal () en soluciones de hemoglobina intracelular (Hb) ha permitido determinar el tiempo de retardo del proceso de polimerización de la hemoglobina S (HbS) [1, 2]; dando la posibilidad de diferenciar la crisis y el estado estacionario en pacientes con ECF [2], así como evaluar un tratamiento potencial [1, 2, 4]. Para explicar estos comportamientos de y , se ha utilizado un modelo de intercambio de agua de dos sitios (2SWEM) [11–17] considerando un aumento del tiempo de correlación rotacional de Hb () de 50 a 98 ns [1, 2] . Sin embargo, los valores de obtenidos para soluciones de Hb intracelular no coinciden con los valores esperados según los modelos de Debye y Mooney (~ 172 ns) [18], además, este análisis no considera el comportamiento de la fracción de agua enlazada () durante la polimerización de HbS [15]. Por otro lado, el 2SWEM ha recibido muchas críticas relacionadas con su capacidad reducida para describir la relajación de protones en soluciones de proteínas debido al bajo número de sitios disponibles para la unión de agua a la proteína () obtenida mediante este enfoque; y debido a que este modelo predice una dispersión lorentziana que no se reproduce experimentalmente [15, 19]. Además, el análisis realizado no tiene en cuenta la contribución a la relajación magnética de debido a la relajación cruzada ni la contribución de los protones lábiles en la estructura de la proteína que se intercambian con el solvente.

De acuerdo a lo discutido anteriormente, para explicar los comportamientos de y durante la polimerización de HbS necesitamos otro método experimental para determinar y, al menos, estimar el comportamiento de . También necesitamos otro enfoque físico para describir la relajación, que debe incluir la relajación cruzada y las contribuciones de protones lábiles.

En este trabajo hemos utilizado el experimento de Dispersión de Relajación Magnética () para evaluar , y otros parámetros directamente relacionados con , en muestras de Hb intracelular. Se utilizó un modelo de intercambio de tres sitios (3SEM), que incluye las contribuciones de protones lábiles y la relajación cruzada, como enfoque físico para describir la relajación magnética de . Los resultados obtenidos crean las condiciones para realizar un análisis adecuado durante la polimerización de HbS.

# **método**

Se obtuvieron muestras de sangre total de donantes voluntarios sanos y pacientes con AHF (muestras residuales del Hospital Universitario ULB de Bruselas obtenidas después de que se terminaron los análisis de sangre de rutina). Las muestras de hemoglobina A (HbA) y HbS se prepararon a partir de sangre total utilizando métodos clásicos [11, 12, 18, 20, 21] y se transfirieron 500 μl de solución de Hb a un tubo de RMN para las mediciones. Se utilizó un relaxómetro de RMN de ciclo rápido de campo (Stelar FFC 2000 Spinmaster), en el rango de 20 kHz a 10 MHz, para obtener los perfiles de a 310 K, que se representaron como gráficos semilogarítmicos de R1 () contra la frecuencia de resonancia de Larmour () dividida por 2π. Se agregaron puntos adicionales a 20 MHz y 60 MHz después de medir las muestras en los analizadores Mq20 y Mq60 NMR (Minispec) de Bruker. Para cada muestra se midieron al menos cinco perfiles 1HMRD y los valores de los parámetros obtenidos se informaron como: . Aquí ū y SD representan el valor medio y la desviación estándar de las mediciones realizadas.

# **Resultados**

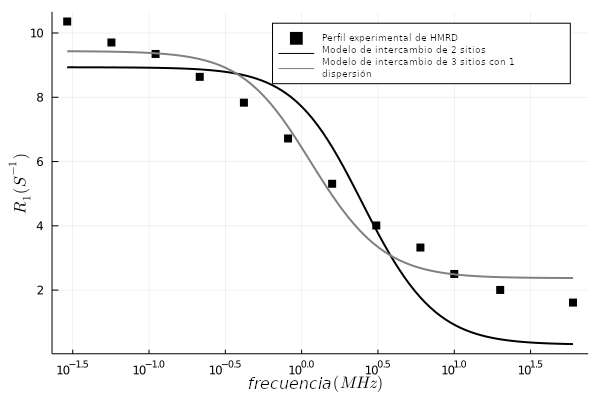
La figura 1 muestra el perfil característico obtenido para soluciones intracelulares de hemoglobina a 310K. Los resultados experimentales han sido ajustados mediante las ecuaciones (1) y (2) de acuerdo a los modelos 2SWEM y 3SEM respectivamente:

Aquí es la tasa de relajación magnética longitudinal del en el solvente, es la relación giromagnética , es la constante de Dirac, es la permeabilidad magnética del vacío y es la distancia entre protones. En la ecuación. (2) (caracteriza la zona de meseta de la tasa de relajación de alta frecuencia) se atribuye a las moléculas de agua hidratadas en la superficie de la proteína y (que caracteriza la magnitud de la dispersión de la relajación) se atribuye a las moléculas de agua internas y los protones lábiles en la proteína estructura [22]. Los parámetros resultantes del ajuste mediante la ecuación (2) de los datos experimentales para los perfiles de se resumen en la tabla (1).

**Tabla 1**. Parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales del perfil (310K) mediante el 3SEM en muestras intracelulares de HbA y HbS

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Muestra | α (s−1) | β (108 s−2) | τR (ns) | Adjusted r square |
| HbA-1 | 2.17 ± 0.07 | 0.93 ± 0.04 | 75.3 ± 2.6 | 0.96 ± 0.01 |
| HbA-2 | 2.42 ± 0.25 | 1.09 ± 0.20 | 49.3 ± 9.2 | 0.95 ± 0.01 |
| HbA-3 | 5.52 ± 0.05 | 1.27 ± 0.68 | 66.8 ± 3.5 | 0.94 ± 0.003 |
| HbA-4 | 3.84 ± 0.11 | 1.05 ± 0.04 | 67.0 ± 2.1 | 0.95 ± 0.01 |
| HbA-5 | 4.85 ± 0.10 | 1.12 ± 0.05 | 73.4 ± 3.6 | 0.93 ± 0.01 |
| HbA-6 | 5.01 ± 0.01 | 1.03 ± 0.04 | 74.0 ± 3.0 | 0.93 ± 0.003 |
| HbA-7 | 5.72 ± 0.06 | 1.16 ± 0.04 | 86.4 ± 4.3 | 0.95 ± 0.003 |
| HbS-1 | 1.79 ± 0.06 | 0.76 ± 0.04 | 65.9 ± 2.7 | 0.94 ± 0.003 |
| HbS-2 | 2.20 ± 0.05 | 0.85 ± 0.05 | 60.1 ± 5.5 | 0.93 ± 0.01 |

El 2SWEM claramente no se ajusta a los perfiles experimentales de (ver Fig. 1, r cuadrado ajustado ~ 0.7–0.8). Para resolver este inconveniente, Lindstrom y Koenig (LK) [15] y Hallenga y Koenig (HK) [19] desarrollaron modelos matemáticos adecuados para el ajuste. El modelo HK es el enfoque más utilizado y se conoce comúnmente como expresión de Cole-Cole [19, 27]. A pesar de su muy buena descripción de los perfiles experimentales de 1HMRD (r cuadrado ajustado ~ 0,99), los métodos LK y HK han recibido muchas críticas debido a que esos modelos no se basan correctamente en la teoría de la relajación magnética de protones [27] .



**Figura 1**: Perfil de dispersión típico de para soluciones intraceluláres de Hb a 310 K. Los datos experimentales han sido ajustados mediante los modelos de dos y tres sitios de intercambio

A pesar de la mayor calidad del ajuste logrado con el 3SEM, está claro que debe mejorarse. Para ello sugerimos considerar dos dispersiones como sigue:

## Aquí los subíndices 1 y 2 se refieren a cada dispersión y es el tiempo de correlación efectivo de la población de agua ligada que provoca la dispersión de la magnitud . La Figura 2 muestra los perfiles típicos de obtenidos en soluciones de Hb intracelular a 310 K, las cuales fueron ajustadas usando el 3SEM con dos dispersiones (ecuación 3), los parámetros resultantes de estos ajustes aparecen resumidos en la tabla 2.

## 

**Figura 2:** Perfil de dispersión típico de 1HMRD para soluciones intraceluláres de Hb a 310 K. Los datos experimentales han sido ajustados mediante los modelos de tres sitios de intercambio con uno y dos términos dispersivos

**Tabla 2**. Parámetros obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales del perfil (310K) mediante el 3SEM con dos términos dispersivos en muestras intracelulares de HbA y HbS

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Muestra | α (s−1) | β1 (108 s−2) | τc1 (ns) | β2 (108 s−2) | τc2 (ns) | Adjusted r square |
| HbA-1 | 1.32 ± 0.02 | 0.32 ± 0.03 | 156.3 ± 9.3 | 2.38 ± 0.14 | 13.5 ± 0.9 | 0.99 ± 0.001 |
| HbA-2 | 1.89 ± 0.07 | 0.24 ± 0.04 | 141.2 ± 28.5 | 2.17 ± 0.39 | 14.6 ± 3.3 | 0.99 ± 0.002 |
| HbA-3 | 4.24 ± 0.04 | 0.33 ± 0.02 | 171.5 ± 9.0 | 3.75 ± 0.15 | 12.3 ± 0.5 | 0.98 ± 0.004 |
| HbA-4 | 2.85 ± 0.03 | 0.28 ± 0.04 | 167.1 ± 15.0 | 2.96 ± 0.43 | 12.2 ± 1.2 | 0.98 ± 0.006 |
| HbA-5 | 3.40 ± 0.03 | 0.30 ± 0.03 | 193.0 ± 14.0 | 4.18 ± 0.35 | 11.0 ± 0.8 | 0.98 ± 0.004 |
| HbA-6 | 3.90 ± 0.07 | 0.22 ± 0.03 | 230.0 ± 33.1 | 3.03 ± 0.17 | 14.1 ± 1.0 | 0.98 ± 0.004 |
| HbA-7 | 4.44 ± 0.07 | 0.4 ± 0.04 | 180.5 ± 10.1 | 3.39 ± 0.36 | 13.6 ± 2.0 | 0.98 ± 0.002 |
| HbS-1 | 1.17 ± 0.05 | 0.15 ± 0.02 | 202.1 ± 21.1 | 1.82 ± 0.20 | 16.2 ± 1.4 | 0.98 ± 0.003 |
| HbS-2 | 1.70 ± 0.04 | 0.08 ± 0.01 | 321.0 ± 31.0 | 1.74 ± 0.26 | 20.3 ± 2.7 | 0.98 ± 0.003 |

**DISCUSIÓN**

Claramente, el 3SEM con dos dispersiones se ajustaba mejor a los perfiles experimentales de 1HMRD que el 3SEM con una sola dispersión. Se encontraron dos dispersiones: una de ellas en el intervalo de frecuencias de 0,3 MHz a 0,6 MHz y con tiempos de correlación en el rango de 141,2 ns a 321,0 ns; y otra dispersión en el intervalo de frecuencias de 4,6 MHz a 8,4 MHz y con tiempos de correlación en el rango de 11,0 ns a 20,3 ns. Los tiempos de correlación asociados a la primera dispersión realmente coinciden con la predicción teórica para según los modelos de Mooney y Debye (~ 172 ns), sin embargo, el origen de la segunda dispersión no está claro. En los perfiles 1HMRD obtenidos en soluciones concentradas de proteína, se suelen asociar dos dispersiones a las interacciones proteína-proteína [13], sin embargo, estas interacciones deben dar lugar a un tiempo de correlación mayor y no a un valor menor como es el caso en el segundo dispersión. El oxígeno disuelto también podría dar lugar a una dispersión adicional en 1HMRD [13], pero esta dispersión suele aparecer alrededor de los 20 MHz y requiere una sensibilidad mejorada para ser observada. Sugerimos que la segunda dispersión podría estar relacionada con moléculas de agua internas con , donde domina el tiempo de correlación efectiva de la dispersión.

Algo similar podría ocurrir con una pequeña población de moléculas de agua hidratada en la superficie de la proteína: enlaces de hidrógeno más extensos que la mayoría de las moléculas de agua hidratada [16], con tiempos de correlación efectivos superiores a 1ns y dispersándose (cuando estas moléculas están presentes) en nuestro rango de frecuencia de estudio. En cualquier caso, se requieren análisis experimentales y teóricos más profundos para definir el origen de esta segunda dispersión y esto debe ser objeto de futuros trabajos.

La ecuación. (2), incluyendo o no la modificación sugerida en la ecuación (3), es más adecuada para analizar la relajación magnética de 1H durante la polimerización de HbS que la ecuación. (1) utilizado en trabajos previos [1, 2, 11, 12]. Este enfoque físico describe más adecuadamente la solución de Hb + agua y la relajación magnética en su interior, particularmente el 3SEM con dos dispersiones permite la evaluación adecuada de . Por otro lado, los valores de α y β podrían ser útiles para estimar el comportamiento del .

**CONCLUSIONES**

El modelo de intercambio de tres sitios, que incluye la contribución de protones lábiles de la estructura de la proteína, mostró ser más adecuado que el modelo de intercambio de agua de dos sitios para describir los perfiles de en soluciones de hemoglobina intracelular; la contribución de la relajación cruzada a la magnitud de la dispersión fue, al menos, un orden de magnitud menor que la magnitud de la dispersión total. Se encontraron dos dispersiones: una describiendo adecuadamente el tiempo de correlación rotacional de la hemoglobina y otra probablemente relacionada con moléculas de agua interna y/o hidratada con tiempos de correlación efectivos superiores a 1ns y tiempos de residencia principal menores que el tiempo de correlación rotacional de la proteína. El uso del modelo de intercambio de tres sitios crea las condiciones para explicar adecuadamente la relajación magnética de protones durante la polimerización de HbS.

**REFERENCIAS**

1. M.A. Lores-Guevara, J.C. García-Naranjo, C.A. Cabal-Mirabal, Appl. Magn. Reson. 50, 541 (2019). https://doi.org/10.1007/s00723-018-1104-0
2. C.A. Cabal-Mirabal, A. Fernández-García, M.A. Lores-Guevara, E. González-Dalmau, L. Oramas Díaz, Appl. Magn. Reson. 49, 589 (2018). https://doi.org/10.1007/s00723-018-0985-2
3. C.A. Cabal-Mirabal, M.A. Lores-Guevara, V.I. Chizhik, S.O. Rabdano, J.C. García-Naranjo, Appl Magn Reson. (2020). https://doi.org/10.1007/s00723-020-01241-x
4. N. Archer, F. Galacteros, C. Brugnara, Am. J. Hematol. 90, 934 (2015). https://doi.org/10.1002/ajh.24116
5. L. Gravitz, S. Pincock, Nature (2014). https://doi.org/10.1038/515S1a
6. F.B. Piel, M.H. Steinberg, D.C. Rees, N. Engl, J. Med. 376, 1561 (2017). https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865
7. E.A. Ajjack, H.A. Awooda, S.E. Adalla, Int. J. Hematol. Disord. 1, 8 (2014). https://doi.org/10. 12691/ijhd-1-1-2
8. L.V. Parise, N. Berliner, Blood 127, 789 (2016). https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-674606
9. E.I. Obeagu, K.C. Ochei, B.N. Nwachukwu, B.O. Nchuma, Sch. J. App. Med. Sci. A3, 2244 (2015)
10. A. Nowogrodzki, Nature 596, S13 (2021). https://doi.org/10.1038/d41586-021-02143-z
11. M.A. Lores-Guevara, C.A. Cabal-Mirabal, Appl. Magn. Reson. 28, 79 (2005). https://doi.org/10. 1007/BF03166995
12. Y. Cabrales, M.A. Lores-Guevara, Y. Machado, Appl. Magn. Reson. 33, 207 (2008). https://doi.org/10.1007/s00723-008-0074-z
13. S. Kiihne, R.G. Bryant, Biophys. J. 78, 2163 (2000). https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76763-4”
14. I.R. Kleckner, M.P. Foster, Biochim. Biophys. Acta 1814, 942 (2011). https://doi.org/10.1016/j.bba-pap.2010.10.012
15. T.R. Lindstrom, S.H. Koenig, J. Magn. Reson. A15, 344 (1974)
16. B. Halle, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 359, 1207 (2004). https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1499
17. M.A. Lores-Guevara, Y. Mengana-Torres, J.C. García-Naranjo, N. Rodríguez-Suárez, L.C. Suáres Beyries, M.A. Marichal-Feliu, T. Simón-Boada, I.C. Rodríguez-Reyes, J.Phillipé, Appl. Magn. Reson. 49, 1075 (2018). https://doi.org/10.1007/s00723-018-1026-x
18. M.A. Lores-Guevara, C.A. Cabal-Mirabal, O. Nascimento, A.M. Gennaro, Appl. Magn. Reson. 30, 121 (2006). https://doi.org/10.1007/BF03166986
19. K. Hallenga, S.H. Koenig, Biochemistry A15, 4255 (1976)
20. M.A. Lores-Guevara, Y.M. Mengana-Torres, J.C. García-Naranjo, A. Ramírez-Aguilera, L.C. Suáres-Beyries, M.A. Marichal-Feliu, T. Simón-Boada, J. Philippé, J. Biosci. Med. 4, 152 (2016). https://doi.org/10.4236/jbm.2016.412019
21. M.A. Lores-Guevara, J.C. García-Naranjo, Y.M. Mengana-Torres, J. Pereira, Adv. Biol. Chem. 4, 388 (2014). https://doi.org/10.4236/abc.2014.46044
22. K. Venu, V.P. Denisov, B. Halle, J. Am. Chem. Soc. 119, 3122 (1997). https://doi.org/10.1021/ja963611t
23. V.P. Denisov, B. Halle, Faraday Discuss. 103, 227 (1996). https://doi.org/10.1039/FD9960300227
24. V.P. Denisov, J. Peters, H.D. Hōrlein, B. Halle, Nature Struct. Biol. 3, 505 (1996). https://doi.org/10. 1038/nsb0696-505
25. K. Modig, E. Liepinsh, G. Otting, B. Halle, J. Am. Chem. Soc. 126, 102 (2004). https://doi.org/10. 1021/ja038325d
26. B. Halle, V.P. Denisov, Meth. Enzymol. 338, 178 (2001). https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)38220-x
27. B. Halle, H. Johanneson, K. Venu, J. Magn. Reson. 135, 1 (1998). https://doi.org/10.1006/JMRE.1998.1534