

ESTUDIO DE LA HIDRATACION DE GANGLIOSIDOS POR RMN DE DEUTERIO. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y RELACION MOLAR AGUA/LIPIDO

C. ARNULPHI#, P. LEVSTEIN#, M. RAMIA#, C. MARTÍN# Y G. FIDELIO*

#Grupo de RMN, Lanais de RMN, Famaf, UNC
Ciudad Universitaria, 5000- Córdoba
*CIQUIBIC, Fac. Ciencias Químicas, UNC.
e-mail: cristina@famaf.fis.uncor.edu

Resumen

En este trabajo se estudian las características dinámicas del agua de hidratación de una mezcla normal de gangliósidos utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear. Mediciones de tiempos de relajación espín-espín permiten identificar dos microambientes bien diferenciados para el agua, cuyos tiempos de correlación rotacional están en el rango 10^{-9} - 10^{-8} s y 10^{-11} - 10^{-10} s a temperatura ambiente. Para una relación agua/gangliósido 200:1 (mol:mol) se determina que aproximadamente 30 moléculas de agua están fuertemente ligadas a cada gangliósido y que las propiedades dinámicas del resto están alteradas respecto de las del agua libre.

Abstract

Dynamical properties of water in samples of gangliosides aggregates hydrated at different water/lipid ratios are studied by using Nuclear Magnetic Resonance of deuterium (^2H NMR). Interpretation of spin-spin relaxation time data (T_2) evidences the existence of at least two kinds of water environments at room temperature: one in which the rotational correlation time is in the range of 10^{-9} to 10^{-8} s and the second one in which the range is between 10^{-11} to 10^{-10} s. For a $^2\text{H}_2\text{O}$ /ganglioside relation of 200:1 (mol:mol) an approximate amount of 30 water molecules are tightly bound to the polar headgroup of each ganglioside molecule. The dynamical properties of the rest of water molecules are still influenced by the biomolecules, being different to that observed in the free liquid state.

Introducción

Las moléculas de agua próximas a una macromolécula en muestras biológicas se ubican en sitios y orientaciones preferenciales y experimentan movimientos anisotrópicos que las diferencian de aquellas más alejadas [1].

Las macromoléculas de interés en nuestro trabajo se denominan gangliósidos. Son moléculas glicolípicas, anfipáticas, cuya porción hidrofílica - de tamaño similar a la de sus cadenas hidrocarbonadas- le confiere una gran capacidad para ligar iones y moléculas de agua a su alrededor (fig. 1). Desempeñan importantes y diversas funciones en células de tejido neuronal [2,3].

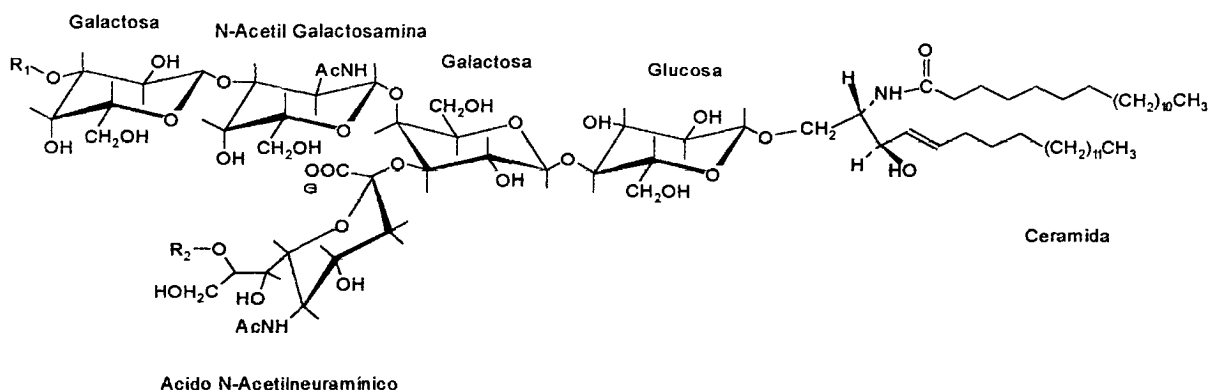


FIG 1: Estructura química del gangliósido GMI. El tamaño de su cabeza polar es semejante a la cadena hidrocarbonada

Nuestro propósito es estudiar el estado dinámico del agua de hidratación de los gangliósidos. Estos fueron hidratados con agua deuterada a distintas relaciones molares y se estudió la dependencia con temperatura de parámetros dinámicos obtenidos por resonancia magnética nuclear (RMN) de deuterio. Por otro lado la interpretación de los espectros de RMN de ^2H se ve facilitada pues, una vez desacoplada la interacción dipolar con los ^1H , sólo un mecanismo de relajación -el cuadrupolar- es dominante [4].

El deuterio, por poseer momento cuadrupolar nuclear distinto de cero es sumamente sensible a los gradientes de campo eléctrico de su entorno, reflejando la anisotropía de movimientos de las moléculas de agua.

Adicionalmente, la frecuencia de resonancia del deuterio es distinta a la del hidrógeno, lo cual permite diferenciar las moléculas de agua de la capa de hidratación de los hidrógenos no intercambiables propios del gangliósido.

Por otro lado la interpretación de los espectros de RMN de ^2H se ve facilitada pues, una vez desacoplada la interacción dipolar con

los ^1H , sólo un mecanismo de relajación -el cuadrupolar- es dominante [4].

En el régimen de $T_1 \gg T_2$:

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{3\pi^2}{100} \right) \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \chi^2 (1 + \eta^2 / 3)$$

$$\left[\frac{2\tau_c}{(1 + \omega_0^2 \tau_c^2)} + \frac{8\tau_c}{(1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2)} \right]$$

$$\frac{1}{T_2} = \left(\frac{3\pi^2}{100} \right) \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \chi^2 (1 + \eta^2 / 3)$$

$$\left[3\tau_c + \frac{5\tau_c}{(1 + \omega_0^2 \tau_c^2)} + \frac{2\tau_c}{(1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2)} \right]$$

donde $\chi = (e^2 q_{zz} Q) / h$ es la constante de acoplamiento cuadrupolar, tomada como 240 KHz en este trabajo, q_{zz} es la componente principal del tensor gradiente de campo, η es el parámetro de asimetría para el gradiente de campo eléctrico, Q es el momento cuadrupolar nuclear. Estas expresiones permiten, una vez medidos los tiempos de relajación, calcular τ_c , el tiempo de correlación de reorientación molecular.

Materiales y Métodos

Estudios preliminares en nuestro laboratorio (fig. 2) y de otros autores sobre fosfolípidos [8] y proteínas [9] mostraron que el número de moléculas de agua influenciadas por la presencia de la macromolécula no es constante sino que depende de la relación molar agua/lípido. En consecuencia, utilizamos muestras de distintas relaciones molares para el estudio en función de temperatura.

Se hidrataron muestras de gangliósidos totales (constituida por 21% GM1, 42% GD1a, 12% GD1b, 19% G_{T1b}) de cerebro bovino con agua deuterada (99.9 % D) en relación molar 100:1 y 200:1 (mol:mol) de ²H₂/gangliósido. Las muestras obtenidas fueron sometidas a un proceso de enfriamiento gradual en un rango de temperatura 220-300K.

A las concentraciones indicadas los gangliósidos se auto organizan formando micelas (número de agregación 300) que exponen hacia el solvente sus porciones polares, ofreciendo sitios apropiados para la fijación de moléculas de agua.

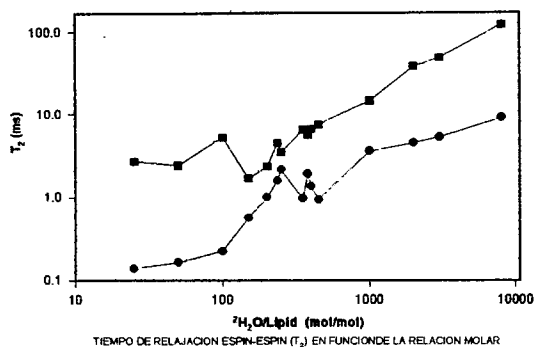


FIG 2: Tiempos de relajación espín-espín de cada microambiente en función de la relación molar agua/lípido. Los valores de T₂ menores corresponden a los tiempos de correlación más largos y se asocian a la capa de hidratación próxima al gangliósido,

Las mediciones se realizaron en un equipo de RMN Bruker 300 MSL, operando a la frecuencia de resonancia de deuterio (46.073 MHz) con desacople de protones (300 MHz) a alta potencia.

En la muestra 200:1 se analizó la forma de línea del espectro en frecuencias obtenido por transformada de Fourier de la FID resultante de la aplicación de un pulso único de $\pi/2$. Los parámetros experimentales fueron: ancho de pulso: 8 μ s, tiempo entre ciclos: 4s, tiempo muerto: 22 μ s, tiempo de adquisición: 25 ms, número de promediaciones: 100, velocidad de muestreo: 6 μ s. Los espectros fueron ajustados satisfactoriamente por medio de curvas lorentzianas cuyo ancho espectral ΔH está relacionado con el tiempo de relajación T₂ mediante la expresión: $\Delta H = 1/\pi \cdot T_2$

Sobre la muestra 100:1 se efectuó un estudio más detallado analizando las curvas del decaimiento de la magnetización longitudinal T₁ mediante la secuencia de inversión recuperación π - τ - $\pi/2$, y transversal T₂ con la secuencia de espín-eco ($\pi/2$ - τ - π).

Resultados

Las mediciones efectuadas dieron por resultado, en todos los casos, valores de T₁ >> T₂, lo cual permite suponer largos tiempos de correlación para alguna componente de la muestra [1]. La existencia de dos decaimientos bien diferenciados para las amplitudes de magnetización resultantes del experimento de espín-eco (fig. 3), o la necesidad de utilizar dos lorentzianas para el ajuste de la línea de resonancia en el experimento de pulso único (fig.4), muestran que estamos en presencia de dos microambientes, en el régimen de intercambio lento. Esto es:

$$\frac{1}{\tau_a} + \frac{1}{\tau_b} \ll \frac{1}{T_{2b}} - \frac{1}{T_{2a}}$$

donde τ_a , τ_b son los tiempos de residencia y T_{2a}, T_{2b} los tiempos de relajación espín-espín en los

microambientes a y b respectivamente. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de nuestro trabajo no pueden distinguirse en el microambiente de las moléculas fuertemente ligadas aquellos núcleos de ^2H que pueden intercambiarse por ^1H en la molécula de gangliósido.

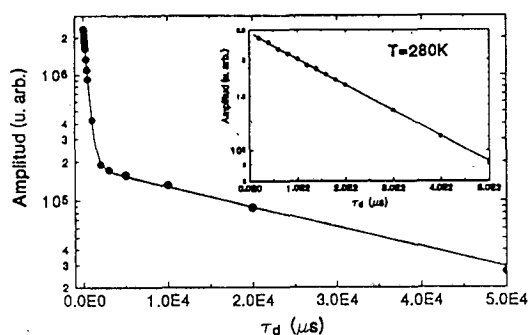


FIG. 3: Amplitud del eco de espín en función del tiempo del eco en un experimento de IR sobre la uuestra 100:1 mol:mol (agua:lipido) a 280K. El ajuste de los puntos experimentales corresponde a una curva bi-exponencial. $T_{2a} = 30.417\text{ms}$, $T_{2b} = 453\ \mu\text{s}$

Si estuviéramos en el régimen de intercambio rápido, como muchas veces se asume en sistemas biológicos, observaríamos un promedio ponderado de la velocidad de relajación de los distintos microambientes de la forma [5]:

$$\frac{1}{T_2} = \frac{\rho_a}{T_{2a}} + \frac{\rho_b}{T_{2b}}$$

Las curvas de decaimiento de la magnetización resultantes del experimento ($\pi/2 - \tau - \pi$) fueron ajustadas satisfactoriamente (fig.3) mediante funciones bi-exponenciales del tipo:

$$M(\tau_d) = P_a \exp(-\tau_d/T_{2a}) + P_b \exp(-\tau_d/T_{2b}) \quad [\text{ec.1}]$$

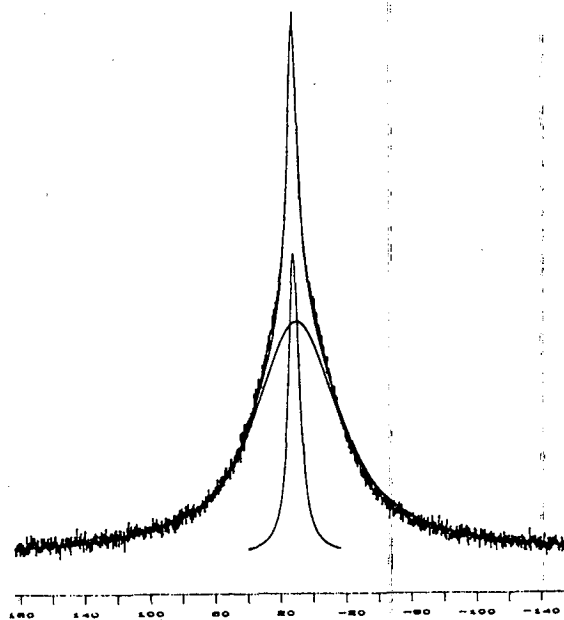


FIG 4: Espectro en frecuencias obtenido por TF de la FID en un experimento de un único pulso de 900 (100 adquisiciones), sobre la muestra 200:1 (mol:mol) gua:lipido a 249K. Se observa un muy buen ajuste con dos curvas lorentzianas. (a) 319 Hz, 11.5 % area (b) 646 Hz, 88% area.

confirmando la existencia de por lo menos dos microambientes distinguibles - en la ventana temporal de la RMN- caracterizados por sus tiempos de relajación transversal T_{2a} y T_{2b} . Los factores P_a y P_b permiten cuantificar el número de moléculas en cada entorno.

Los tiempos de correlación rotacional calculados son del orden de 10^{-9} - 10^{-8} s para las moléculas fuertemente ligadas y de 10^{-11} s - 10^{-10} s para las menos ligadas, en buen acuerdo con resultados publicados en la literatura para macromoléculas biológicas [6,7,9].

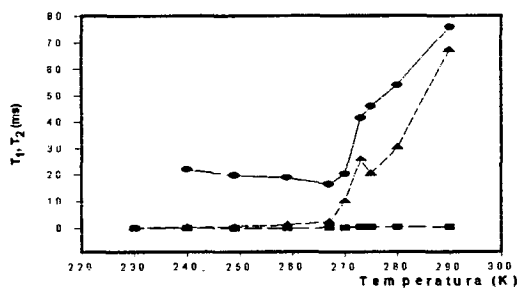


FIG 5: Tiempos de relajación espín-espín de cada microambiente en función de la temperatura. Muestra 100:1 mol:mol agua:lípido. T2b se asigna a los átomos en la zona de hidratación próxima a la molécula de gangliósido.

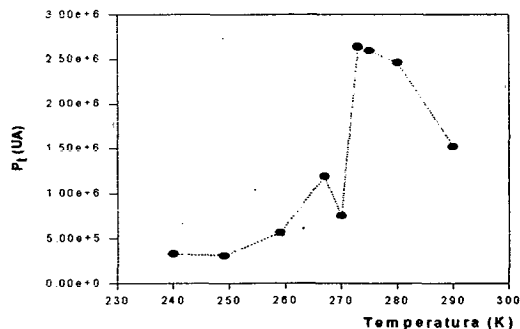


FIG 6: Población total de espines observada en la muestra 100:1 mol:mol agua:lípido, en función de la temperatura. Explicación en el texto.

En la fig.5 puede observarse la evolución de T_1 de todo el sistema y de T_2 de cada microambiente en la muestra 100:1 obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales a la ec.(1), en función de la temperatura. Los valores de T_2 del grupo de moléculas asociadas a la primera capa de hidratación, son muy poco sensibles a la variación de temperatura en el rango medido, mientras que el grupo cuyos tiempos de correlación son menores, - en nuestro modelo corresponden a las menos ligadas- experimentan un cambio notable disminuyendo en forma aproximadamente exponencial hasta la temperatura de fusión del agua. Para este experimento la fig.6 muestra la población total de espines. La aparente desaparición de espines del sistema al bajar la temperatura se explica por el drástico acortamiento de T_2 al pasar de agua líquida a hielo. En este estado la FID decae casi completamente durante el tiempo muerto del equipo. Bajo estas condiciones no es posible (para esta muestra en particular) cuantificar el número de espines asociado a cada microambiente.

Por otro lado, en la muestra 200:1 D_2O /gang. nuevamente se observa que la porción más móvil a temperatura ambiente es la

más sensible a la temperatura, volviéndose más rígida que la otra fracción por debajo de 270 K (ver cruce en la fig.7). Las áreas de las lorentzianas (fig.8) permiten calcular que aproximadamente un 16% de los 2H corresponden a la fracción de ΔH (ó T_2) menos sensible a temperatura, es decir permite determinar que hay en promedio unas 32 moléculas de agua fuertemente ligadas a cada gangliósido, o más en detalle que hay 64 átomos de 2H formando parte de agua fuertemente ligada o constituyendo los propios grupos hidroxilo y amino del gangliósido. Estas fracciones son indistinguibles en nuestro experimento.

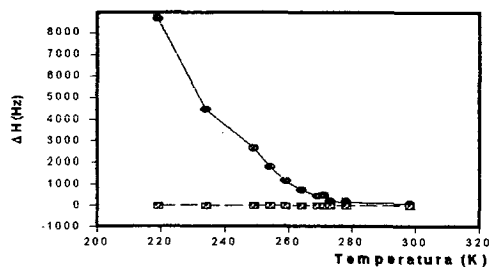


FIG 7: Ancho de línea espectral en función de la temperatura. Muestra 200:1 (mol:mol) agua:lípido.

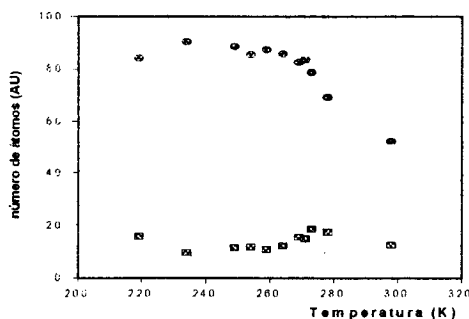


FIG 8: Poblaciones relativas de átomos en cada microambiente en función de la temperatura. Muestra 200:1 (mol: mol) agua: lípido. Pb (□) es el número - relativo al total- de átomos en la zona de hidratación próxima al gangliósido.

Conclusiones

Los resultados anteriores son compatibles con un modelo de dos zonas de hidratación alrededor de la micela de gangliósido: una constituida por moléculas de agua relativamente inmóviles fuertemente ligadas a sitios de adsorción específicos sobre la macromolécula y/o por átomos de ^1H que originalmente formaban parte de grupos aminos e hidroxílicos del gangliósido reemplazados por ^2H . La otra zona de hidratación está constituida por moléculas más móviles, que no alcanzan, sin embargo, las condiciones dinámicas para ser consideradas agua "bulk", inexistente a las relaciones molares de nuestras muestras.

Las moléculas de agua se intercambian entre las capas de hidratación antes definidas por difusión traslacional a una velocidad tal que no se alcanza la condición de rápido intercambio que generalmente se asume en sistemas biológicos.

Los resultados obtenidos al disminuir la temperatura de la muestra parecen indicar que la primera capa está constituida por moléculas de agua cuyo comportamiento dinámico es similar al hielo.

Agradecimientos

Agradecemos a la FUNDACIÓN ANTORCHAS, CONICET, CONICOR, y SeCyT-UNC por el apoyo financiero para la ejecución de este proyecto.

Referencias

1. D.E. Woessner en: *NMR: Principles and Applications to Biomedical Research*, Ed. J.W. Pettegrew, Springer Verlag, p.37 (1990)
2. M.Corti, L. Cantú, S. Sonino and G. Tettamanti, en *New Trends in Ganglioside Research: Neurochemical and Neuroregenerative Aspects*, (R W Ledeen, E L Hogan, G Tettamanti, A. J Yates, R K Yu; editores Fidia Research Series . Vol 14, pag 79-91 (1988)
- 3 B. Maggio, G. Fidelio, F. Cumar and R Yu, *Chem Phys.Lipids* **42**, pag 49-63 (1986)
4. C.R. Sanders y M.D. Tsai en: *Methods in Enzimology*, Ed. N.J.Oppenheimer y T.L. James **177**, pag. 317 (1989).
5. J R Zimmerman, W E Brittin, *J. Phys. Chem.*, **67**, pag 1328-1333 (1957)
6. I. Kuntz, W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* **28**, pag 239-345 (1974)
7. R Mathur -De Vré, *Prog. Phy. molec. Biol.*, Vol **35** pp 103-134 (1979)
8. E. G. Finer y A . Darke, *Chemistry and Physics of Lipids*, **12**, 16 (1974).
9. J. R. Grigera, *J Phys. Chem.*, **83** (16), 2145 (1979).