

PRISCILLA TOSQUI

O papel das Argininas α -92 e α -141 na regulação
da função de hemoglobinas por íons cloreto.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

Co-orientador: Dr Chien Ho

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP 2010

PRISCILLA TOSQUI

O papel das Argininas α -92 e α -141 na regulação
da função de hemoglobinas por íons cloreto.

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Biofísica, junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biofísica Molecular do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo

Co-orientador: Dr Chien Ho

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcelo Fossey
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Assistente Doutor
USP- Ribeirão Preto

Prof. Dr. Marcelo M. Santoro
Professor Associado Doutor
UFMG – Belo Horizonte

São José do Rio Preto, 14 de maio de 2010

Os meus mais sinceros agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo, pela confiança em meu trabalho e pela orientação desta tese;

Aos professores Dr. Valmir Fadel e Dr. Marinonio Lopes Cornélio, pela colaboração prestativa e sugestões proferidas no exame de qualificação;

Aos colegas de laboratório que estiveram comigo ao longo dos anos pela amizade e companheirismo, fazendo de nosso laboratório um ambiente de união e pela discussão de resultados;

Aos funcionários da seção de pós-graduação, especialmente Sílvia e Rosemar pelo auxílio a todo instante;

Ao Dr. Chien Ho, pela confiança e receptividade com que me recebeu em seu laboratório, assim como pelas contribuições científicas e ensinamentos;

Aos colegas e amigos do "Ho Lab", em especial Nancy, Vick, Yue, Natalie, Prya, Dr. Shen, Kevin e Virgil pelo apoio sempre presente, receptividade e amizade que jamais serão esquecidos;

A todos os queridos amigos de Pittsburgh, em especial Elvira, Beata, Grant, Tim, Mumtaz, Tassi e Nara por tornar tão mais fácil a minha estadia nessa cidade;

A toda a minha família, em especial minha querida avó Florença, que me acompanha em todos os momentos com seu apoio e suas orações;

A todos os meus amigos que sempre me incentivaram e compreenderam;

Aos meus queridos pais José Carlos e Maria Inês e minha querida irmã Patrícia, pelo apoio e compreensão, amor e carinho que me acompanham por toda a vida;

Ao meu marido Eurico "Kikô" pelo apoio, carinho e amor sempre presentes e por escolher ser meu companheiro na jornada da vida;

A CAPES pelo apoio financeiro no programa PDDE processo: 158708-0

Ao CNPq pelo apoio financeiro processo: 140182/2006-3;

A Deus pela vida.

“Equilibrio”

RESUMO

A influência de ânions sobre as características estruturais e funcionais de hemoglobinas (Hb) vem sendo alvo de pesquisas de nosso laboratório nos últimos anos. Estudos anteriores mostraram que a ligação preferencial de ânions como o Cl^- e fosfatos orgânicos (2,3-DPG, IHP) entre outros à desoxi-Hb humana (HbA), modula o equilíbrio entre dois estados alostéricos desoxigenados possíveis, estados To e Tx, livre e complexado com ânions, respectivamente. Medidas funcionais utilizando o método de estresse osmótico, que determina o número de moléculas de água que se liga a superfície da Hb, acompanhando a oxigenação, mostraram que o estado To é um estado com hidratação e afinidade ao oxigênio intermediárias ao Tx e ao oxi-R. Assim, a oxigenação da Hb demanda um modelo considerando estes três estados, To, Tx e R, modulados pela presença de ânions em solução.

O íon cloreto é um dos ânions de maior importância fisiológica. A presença de sítios específicos para sua ligação, bem como seu sistema de ligação para a Hb, contudo, são controversos. Evidências estruturais e funcionais apontaram os resíduos arginina 141 e 92 da cadeia alfa como possíveis sítios de ligação de cloreto à Hb. Para investigar essa hipótese, realizamos estudos funcionais variando atividade de água e pH (efeito Bohr), em função da presença de cloreto com hemoglobinas mutantes para essas posições.

As hemoglobinas selecionadas foram Chesapeake (R92L), J-Cape Town (R92Q), desArg (141 Δ) e Chesapeake desArg (R92L,141 Δ). Aspectos estruturais dessas Hbs foram obtidos através de espectroscopia ^1H RMN.

Todas as Hbs estudadas apresentaram afinidade maior ao oxigênio quando comparadas à HbA, para todas as condições experimentais. Estudos de variação da atividade de água em função da concentração de cloreto mostraram que a única Hb modificada que tem sua oxigenação descrita pelo modelo de três estados é a Hb desArg. As demais Hbs modificadas estudadas neste trabalho não apresentam a estrutura Tx na presença de cloreto, fato observado

pelo número de moléculas de água que se liga a cada Hb na transição oxi-desoxi. Esse comportamento sugere que o resíduo 92 seria responsável pela ligação de cloreto, uma vez que as Hbs mutantes dessa posição não podem ter sua oxigenação ajustada pelo modelo de três estados.

Resultados de efeito Bohr mostraram que, diferentemente da HbA, que libera ~1 e ~2 prótons na presença e ausência de cloreto, respectivamente, todas as Hbs estudadas liberam ~1 próton nas duas condições, o que também indica o papel da Arg 92 na ligação de cloreto. O fato de a Hb desArg também apresentar esse mesmo valor pode indicar a influência do resíduo 141 no efeito Bohr terciário e quaternário na presença de cloreto.

Espectros obtidos por ^1H RMN mostraram que a modificação na posição $\alpha 92$ (na subunidade $\alpha 1\beta 2$), responsável por mudanças na cooperatividade, afeta diferentemente cada proteína. Modificações observadas em regiões distintas daquelas da mutação indicaram efeitos diretos e indiretos transmitidos pelas subunidades de cada proteína. Os resultados mostraram ainda que a modificação estrutural recapitula aspectos funcionais das Hbs que perdem a Arg 141, tendo um considerável aumento na afinidade. Outros aspectos, como cooperatividade, também puderam ser analisados funcional e estruturalmente.

A caracterização estrutural das histidinas de superfície, relacionadas ao efeito Bohr, das HbA e Hb Chesapeake, mostrou que existe influência da presença de cloreto nos deslocamentos químicos. No entanto, essas modificações podem ser devidas às modificações eletrostáticas do meio. Esse resultado demonstrou que o efeito Bohr é uma soma de contribuições da molécula como um todo e que a influência do cloreto sobre ele ocorre como uma soma de pequenas modificações a um grande número de grupos.

ABSTRACT

The influence of anions on structural and functional properties of hemoglobins (Hb) has been studied by our research group for the last few years. Former studies have shown that the preferential binding of anions, such as Cl and organic phosphates (2,3-DPG, IHP) among others to human deoxy-Hb (HbA), modulates the equilibrium between two possible deoxy states: To and Tx, free and complexed with anions respectively. Functional measurements using the osmotic stress method, which allows the determination of the number of water molecules that binds to the protein surface upon the change in protein conformation induced by oxygenation, showed that To state has intrinsic affinity and hydration intermediate of those of Tx and oxy-R. Hence, Hb oxygenation requires a three state model, considering To, Tx and R, modulated by the presence of anions in solution.

Chloride is one of the most important physiological ions and the presence of specific binding sites of this anions is controversial. Structural and functional evidence have pointed to Arginines 141 and 92 as possible binding sites for chloride to Hb. To investigate this hypothesis, we have performed functional studies, changing the water activity and pH (Bohr effect), in function of chloride concentration with recombinants Hbs for these positions.

The selected hemoglobins are Chesapeake (R92L), J-Cape Town (R92Q), desArg (141 Δ) and Chesapeake desArg (R92L,141 Δ). Structural features were obtained through ¹H NMR spectroscopy.

All Hbs studied have higher affinity than HbA for all experimental conditions. Water activity studies in function of chloride concentration showed that the only Hb that can be adjusted with the three state model is Hb desArg, whereas the other Hbs don't present the Tx state, fact confirmed by the number of water molecules bound to each Hb in the deoxy-oxy transition. This behavior suggests that Arg 92 site could be responsible for the chloride

binding to Hb, since Hbs with 92 mutation can not have the oxygenation adjusted by the three state model.

Bohr effect results show that, alike HbA that releases ~1 and ~2 protons in the absence and presence of chloride respectively, all Hbs release ~1 proton on both conditions. This fact could also confirm the role of 92 site and moreover indicate a role of 141 residue in the tertiary and quaternary Bohr effect in the presence of chloride.

¹H RMN, showed that the modification on 92 position ($\alpha 1\beta 2$ subunit), responsible for cooperativity, affects differently each protein. Changes in the spectra of different regions of the molecule show the indirect transmission of information through subunits. Results show also that structural change represents functional aspects of Hbs that lose Arg 141, have a significant rise in affinity. Another features, such as cooperativity could also be analyzed.

Characterization of surface histidines of HbA and Chesapeake shows influence of chloride on chemical shifts. Nevertheless, these changes might be due to electrostatic changing in the bulk, demonstrating that Bohr Effect is, in fact, a sum of many individual contributions of residues of the entire molecule and that the chloride influence happens as a large number of residues with small changes in each value.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,3 DPG	2,3-Bifosfoglicerato
\bar{Y}	Saturação fracional da hemoglobina com oxigênio
λ	Comprimento de onda
μM	Micromolar
Δn_w	Número total de moléculas de água ligadas à Hb durante a transição oxi-desoxi
a_L	Atividade do ligante L
a_w	Atividade de água
ATP	Adenosine triphosphate
BIS TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
DSS	2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate
FPLC	Aparelho utilizado para cromatografia líquida de baixa pressão
f_{T_o}	Fração de hemoglobina no estado T_o
f_{T_x}	Fração de hemoglobina no estado T_x
Hb	Hemoglobina
HbA	Principal componente da hemoglobina de humano adulto
Hb CO	Carbomonoxi hemoglobina
Hb desArg	Hemoglobina sem o resíduo $\text{Arg}\alpha 141$
HEPES	Ácido (2 Hidroxietil) Piperazina - N - (2 Etano Sulfônico)
IHP	Inositol hexaphosphate
kDa	Kilodalton
metaHb	Meta hemoglobina
mV	Milivolt
MWC	Monod, Wyman e Changeux
N_2	Nitrogênio
n	Número de sítios de ligação da hemoglobina à oxigênio
n_{50}	Inclinação do gráfico de Hill em 50% de saturação pelo O_2
nm	Nanômetro
n_w^{desoxi}	Número de moléculas de água ligadas à estrutura da desoxi-Hb
n_w^{oxi}	Número de moléculas de água ligadas à estrutura da oxi-Hb
O_2	Oxigênio

OD	Densidade óptica
ON	Overnight
Osm	Osmolaridade
p₅₀	Pressão de oxigênio necessária para saturar 50% da Hb
PAGE	Eletroforese em Gel de Poli-acrilamida.
PI	Ponto isoelétrico
pO₂	Pressão parcial de oxigênio.
R	Estrutura relaxada da hemoglobina (oxigenada)
rHb	Hemoglobina recombinante
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
T	Estrutura tensa da hemoglobina (desoxigenada)
To	Estrutura desoxigenada da hemoglobina isenta de ânions
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano.
Tx	Estrutura tensa da hemoglobina ligada a ânions
V	Volt
V/V	Volume por volume.
V_i	Voltagem na <i>inésima</i> etapa da oxigenação/desoxigenação.
V_{max}	Voltagem máxima (solução oxigenada)
V_{min}	Voltagem mínima (solução desoxigenada)

LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

Ala	Alanina	A
Asp	Aspartato	D
Cys	Cisteína	C
Glu	Ácido glutâmico	E
Phe	Fenilalanina	F
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Lys	Lisina	K
Leu	Leucina	L
Met	Metionina	M
Asn	Asparagina	N
Pro	Prolina	P
Gln	Glutamina	Q
Arg	Arginina	R
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Val	Valina	V
Trp	Triptofano	W
Tyr	Tirosina	Y

Sumário

I	Introdução	1
1.1)	A molécula de hemoglobina e a ligação do oxigênio	1
1.2)	Um novo estado alostérico “T” da Hb	6
1.3)	Efeito Bohr e efeito de cloreto	9
1.4)	Hemoglobinas estudadas no trabalho	14
1.5)	Breves considerações sobre 1H RMN aplicada ao estudo de Hemoglobinas	15
II	Objetivos	19
III	Materiais e Métodos	
3.1)	Obtenção das amostras de hemoglobina	20
3.1.1)	Obtenção da HbA	20
3.1.2)	Obtenção das rHbs	21
3.2)	Determinação da concentração protéica	24
3.3)	Oxigenando e desoxigenando as amostras de hemoglobina no estado CO	25
3.4)	Obtenção das curvas de oxigenação	26
3.4.1)	Hemox	26
3.4.2)	Tonometria	28
3.4.3)	Obtenção dos dados de p ₅₀	29
3.5)	Medidas de Osmolaridade	31
3.6)	Equação do modelo de três estados	32
3.7)	Medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	34

IV	Resultados	36
	4.1) Atividade de água	36
	4.2) Efeito Bohr	42
	4.2.1) Efeito Bohr em função da concentração de cloreto	46
	4.2.2) Estudo de IHP	50
	4.3) Aspectos Estruturais das Hbs obtidos por RMN	53
	4.3.1) Estado Desoxigenado	53
	4.3.2) Estado Ligado	57
	4.4) Efeito Bohr e efeito de cloreto na Hb Chesapeake	62
	4.4.1) Diferenças estruturais entre as duas Hbs no estado desoxigenado	63
	4.4.2) Demarcação de histidinas no espectro de Hba e Chesapeake no estado desoxigenado	64
	4.4.3) Estado ligado	66
	4.4.4) Demarcação de histidinas no espectro de Hba e Chesapeake no estado ligado	67
	4.4.5) Efeito de cloreto nas Hbs no estado desoxigenado	68
	4.4.6) Efeito de cloreto no estado ligado a CO	70
V	Discussão	74
	5.1 - Aspectos funcionais das Hbs	74
	5.2 – Aspectos estruturais das Hbs	77
VI	Conclusões	80

VII	Referências Bibliográficas	82
VIII	Apêndice	89
IX	Anexos	92
	1- Artigo publicado durante o doutorado	92

I - INTRODUÇÃO

1.1 – A molécula de hemoglobina e a ligação do oxigênio

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular, transportadora, existente principalmente nos eritrócitos de vertebrados, cuja principal função fisiológica é o transporte de oxigênio (O_2) dos órgãos respiratórios para os tecidos. Estruturalmente, a Hb humana (HbA) tem um diâmetro de 6,4 nm e massa molecular de aproximadamente 62 KDa, sendo constituída por quatro cadeias polipeptídicas: duas α com 141 resíduos de aminoácidos e duas β com 146 resíduos. Cada cadeia organizada com igual estrutura terciária, se divide em 8 hélices, nomeadas de A a H. (BALDWIN, J. M., 1975)

A figura 1 traz uma representação da Hb.



Figura 1: Hemoglobina humana (HbA). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias α (rosa claro e rosa escuro) e duas cadeias β (amarelo claro e amarelo escuro) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada uma, respectivamente. Figura extraída de Stryer, L. et.al., 2008. (STRYER, L., et.al., 2008)

Em cada uma dessas cadeias existe um grupo prostético heme, formado por uma protoporfirina IX e um átomo de ferro no centro, onde a molécula de oxigênio liga-se reversivelmente. O grupo heme encontra-se firmemente encaixado em uma região hidrofóbica denominada bolsão do heme, entre as hélices E e F. Em seu complexo com a Hb o átomo de ferro está ligado a quatro nitrogênios dos anéis pirrólicos que formam a protoporfirina, e a um átomo de nitrogênio da cadeia lateral da histidina F8 (isto é, o oitavo resíduo da hélice F), chamada de histidina proximal, sendo penta-coordenado. A molécula de oxigênio é o sexto ligante do ferro e faz uma ponte de hidrogênio com a histidina E7 (isto é, o sétimo resíduo da

hélice E), chamada de histidina distal, que ajuda a estabilizar a ligação, como mostrado na figura 2. (VAN HOLDE, K. E., 1998)

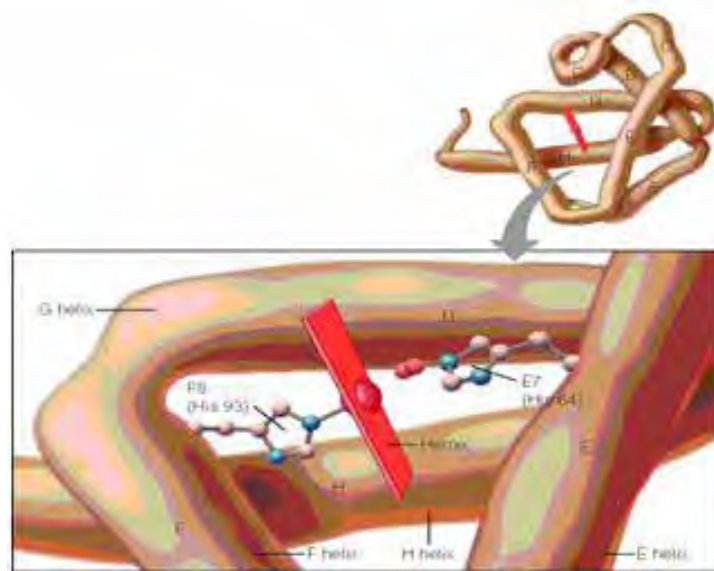


Figura 2: Detalhes do bolsão do heme, mostrando a ligação de oxigênio. (VAN HOLDE, K. & MATHEWS, C. K., 2000)

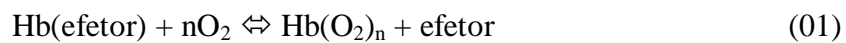
A ligação da primeira molécula de oxigênio causa modificações estruturais que facilitam a ligação das moléculas de oxigênio subsequentes caracterizando interações alostéricas homotrópicas. Assim, em condições fisiológicas, a ligação das quatro moléculas de O_2 à Hb tem um comportamento sigmoidal, sendo, portanto, um processo cooperativo. A ligação de oxigênio à Hb é regulada também por interações alostéricas heterotrópicas: a presença de moléculas como cloreto, fosfatos orgânicos, prótons e água em solução influencia a ligação de oxigênio à proteína. (ANTONINI, E. & BRUNORI, M., 1971, WYMAN, J., 1964)

A oxigenação da Hb é acompanhada, por exemplo, pela liberação de prótons H^+ e ligação de um número de moléculas de água. Em condições fisiológicas, o aumento de pH aumenta a afinidade da Hb por O_2 , e a diminuição da atividade de água em solução diminui a afinidade da Hb por oxigênio. Ânions como Cl^- , DPG, IHP e ATP diminuem a afinidade da Hb pelo oxigênio, pois se ligam preferencialmente a estrutura desoxigenada, estabilizando a conformação alostérica de menor afinidade por O_2 .

Nos eritrócitos humanos, o ânion 2,3-DPG é o principal efetor alostérico e está presente em uma razão DPG:Hb de 2:1. O DPG liga-se com alta afinidade à desoxi-Hb humana, em um sítio de ligação específico, constituído por 8 resíduos catiônicos das cadeias beta, localizados na entrada da cavidade central da proteína. Em hemoglobinas de aves e

répteis, os ânions de maior importância são o IHP e o ATP, respectivamente, que se ligam à Hb com altíssima afinidade. (VOET, D. & VOET, J. C., 1995). O IHP pode se ligar à HbA com altíssima afinidade, travando a proteína no estado desoxigenado., uma vez que a constante de associação . Estudos *in vitro* mostram que o IHP é um efetor alostérico da Hb humana muito mais eficaz que o DPG, pois sua constante de associação à Hb é da ordem de 10^6M^{-1} (GRAY, R. D.; GIBSON, Q. H., 1971), enquanto que a do DPG é algo em torno de 10^5M^{-1} (BENESCH,R., et al, 1971).

O esquema abaixo exemplifica essa ligação entre o efetor e a hemoglobina:



Archibald Hill, em 1913, descreveu o grau de saturação da Hb como uma função da pressão de oxigênio ($p\text{O}_2$.) Sendo \bar{Y} a saturação fracional da Hb, em um gráfico de $\log [\bar{Y}/(1-\bar{Y})]$ contra $\log (p\text{O}_2)$, chamado de “gráfico de Hill”, a região central da curva de oxigenação aproxima-se de uma reta. Sua inclinação n_{50} no ponto médio de ligação ($\bar{Y} = 0,5$) é definida por coeficiente de Hill. Neste ponto, o valor de n_{50} , reflete o grau de cooperatividade da ligação, que é um valor menor que o número total de sítios. Um valor de $n_{50} = 1$ representa ausência de cooperatividade; se $n_{50} > 1$, a reação é considerada positivamente cooperativa. Em ambiente fisiológico, a Hb humana tem este valor entre 2 e 3, o que indica a cooperatividade positiva.

Através do gráfico de Hill podemos obter também o parâmetro p_{50} , que é a pressão de O_2 necessária para saturar 50% dos sítios de ligação de oxigênio da Hb, e define a afinidade da Hb pelo oxigênio: um valor de p_{50} maior indica uma proteína com menor afinidade ao oxigênio (HILL, A. V., 1913). A figura 3 ilustra um exemplo do gráfico de Hill.

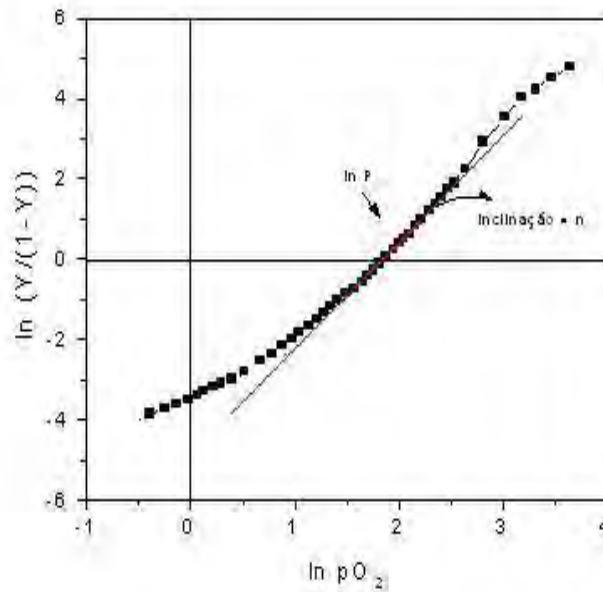


Figura 3: Gráfico de Hill para HbA (60 μ M heme), HEPES 10mM e 25°C. O valor da afinidade $p_{50} = 6,48 \pm 0,32$ mm Hg e a cooperatividade ($n_{50} = 2,43 \pm 0,06$).

A cooperatividade da proteína aparece das interações inter e intra subunidades da molécula. Mudanças destas interações provindas por mutações nos aminoácidos alteram, portanto tanto a afinidade quanto a cooperatividade da proteína. (HO, C. & PERUSSI, J. R., 1984)

Para descrever o mecanismo de ligação cooperativa de ligantes a proteínas, alguns modelos estruturais foram propostos. O modelo mais popular é o proposto por Monod, Wyman e Changeaux em 1965 (MONOD, J, et.al, 1965). Este modelo sugere que proteínas cooperativas são formadas por mais de uma subunidade, cada uma com um sítio de ligação para um ligante. A molécula deve ter dois estados oligoméricos com estruturas quaternárias diferentes, cujo equilíbrio é regulado pela saturação do ligante.

Em uma dessas estruturas, interações moleculares não covalentes entre as subunidades estabilizariam determinada estrutura terciária e quaternária da proteína, impondo restrições energéticas às mudanças estruturais necessárias a ligação do ligante. Este estado é caracterizado como estado T, proveniente do termo “tenso”, de baixa afinidade pelo ligante. Na outra estrutura, estas interações estariam relaxadas, facilitando a ligação de ligante. Este estado de alta afinidade pelo ligante é caracterizado como estado R, proveniente do termo “relaxado”.

No caso da Hb, essas duas conformações estruturais quaternárias extremas seriam: a tensa (T) desoxigenada e a relaxada (R) oxigenada, sendo que a conformação R é a mais hidratada e tem maior afinidade com o oxigênio (LESK, A. M., et.al., 1985).

O equilíbrio entre os estados seria dado pelo esquema:



Devido a natureza de alta cooperatividade da oxigenação da HbA, existe um pequeno número de moléculas com oxigenação intermediária, sendo que o equilíbrio está deslocado entre proteínas totalmente oxigenadas (R) e totalmente desoxigenadas (T). Esse fato, em conjunto com a dificuldade de técnicas de identificação de estruturas intermediárias, fez com que o modelo MWC prevalecesse descrevendo a oxigenação da Hb por muitos anos. Um dos fatores que contribuíram para a popularização do modelo MWC foi a determinação de estruturas cristalográficas da hemoglobina desoxigenada e oxigenada em duas estruturas quaternárias distintas. (PERUTZ, M.F., et. al., 1968)

Embora o modelo de dois estados descreva muitas características de ligação de O_2 à Hb, ele não descreve a ligação de ligantes heterotrópicos à Hb. É cada vez maior o número de evidências experimentais de que o mecanismo de oxigenação da Hb seja mais complexo envolvendo intermediários estruturais, necessitando de um modelo que considere mais estados.

Em 1992, Mercedes Silva e colaboradores cristalizaram em baixa concentração de sal e na forma CO uma nova estrutura da Hb, denominada R2. (SILVA, M. M., et.al., 1992). A afinidade entre as duas estruturas R e R2 ao oxigênio são praticamente idênticas, e ainda se discute se a Hb totalmente oxigenada assumiria a conformação R ou R2. (LUFKIN J. A. & HO, C, 2004)

Existem atualmente no banco de dados PDB (Protein Data Bank) diversas estruturas cristalográficas possíveis para Hb tanto para o estado oxigenado, quanto para o estado desoxigenado, obtidas em diferentes condições de cristalização, temperatura, pH e concentração de sal. No entanto, estruturas cristalográficas não necessariamente representam uma única forma possível de cada estrutura: em solução a proteína poderia assumir diversos estados intermediários durante sua regulação alostérica. Além disso, as propriedades funcionais da Hb no estado cristalino são muito diferentes daquelas em solução: nos cristais há ausência de cooperatividade, diferenças no efeito Bohr e na ligação de ânions. (EATON, W.A. et.al., 1999).

Baseados nesses resultados diversos autores, estudaram em que situações cada estrutura cristalográfica representaria a molécula em solução assim como a plasticidade da Hb para assumir diferentes conformações em solução. Esses autores concluíram que pode haver uma predominância de uma ou outra conformação R e T durante a transição oxi-desoxi regulada pelos efetores alostéricos em solução. Porém, uma vez que mais de uma

conformação R ou T são possíveis, reiteram-se evidências de que o modelo MWC não é suficiente para explicar a oxigenação da Hb. (SAHU, et.al., 2007; YONETANI, T et.al., 2002).

1.2 – Um novo estado alostérico “T” da Hb

Conforme citado anteriormente a água é como um efetor alostérico heterotrópico da Hb: a diminuição da atividade de água em solução diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio. (COLOMBO, M.F., et.al., 1992) Isso ocorre porque a estrutura da oxi-Hb é mais hidratada que a estrutura da desoxi-Hb (SALVAY, A.G., 2002; LESK, A. M., et.al, 1985). Portanto, a oxigenação é acompanhada pela ligação de um número extra de moléculas de água que se ligam à superfície protéica exposta ao solvente na transição conformacional. Como resultado destas mudanças, a afinidade da Hb por oxigênio, é controlada pelas atividades deste ligante em solução. (COLOMBO, M. F. & SANCHES, R., 1990; COLOMBO, M. F.; et.al., 1992, COLOMBO, M. F., et.al., 1994).

Quantitativamente, o efeito de efetores heterotrópicos na afinidade da Hb por O₂ é medido através das equações de *linkage* de Wyman. (WYMAN, J., 1964) . A equação de *linkage* que determina o número diferencial de moléculas de um ligante L que se liga à Hb com a ligação de oxigênio é expressa da seguinte forma:

$$-\left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_L} \right|_{a_i} = \frac{\Delta n_L}{4} = \frac{(n_L^{\text{oxi}} - n_L^{\text{desoxi}})}{4} \quad (03)$$

onde p_{50} tem o significado antes citado; a_L é a atividade do ligante L, a_i corresponde a atividade de outros ligantes que não L, Δn_L é o número diferencial de moléculas de L ligados entre as estruturas oxi e desoxi da Hb e 4 é o número de sítios de ligação de O₂ existentes na proteína. Esta análise é correta apenas quando a atividade de um ligante varia e a atividade de qualquer outro ligante presente na solução é mantida constante (COLOMBO, M.F. et.al.,1994,1996).

Colombo e colaboradores em 1992 (COLOMBO, M. F., et.al. 1992), demonstraram que a dependência entre a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e a atividade de água pode ser analisada utilizando as equações de *linkage*, de Wyman. Esta dependência fornece a

variação de hidratação que acompanha as mudanças conformacionais induzidas na Hb pela ligação sucessiva de oxigênio

Quando o ligante alostérico **L** for água, esta relação pode ser escrita como:

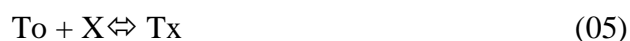
$$-4 \left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = (n_w^{oxi} - n_w^{desoxi}) = \Delta n_w \quad (04)$$

Onde n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas às estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, respectivamente; a_i é a atividade de um ligante **i** diferente da água e Δn_w o número diferencial de águas ligadas no estado totalmente oxigenado em relação ao totalmente desoxigenado. (COLOMBO, M. F., et.al. 1992).

Para estudar o papel do efeito de água na afinidade da proteína por O_2 foi utilizado o método de estresse osmótico. Esse método consiste em utilizar solutos neutros, que são excluídos da superfície de hidratação protéica, como substância que reduz a atividade de água da solução, a_w , e assim medir como a afinidade da Hb pelo O_2 varia com a diminuição desta atividade. Colombo e Bonilla-Rodriguez, mostraram evidências extras que a mudança de p_{50} pela adição de osmólitos à solução não se deve à interação preferencial do soluto com a Hb, nem a efeitos de mudanças dielétricas na solução, mas sim com a diminuição da atividade de água da solução. (COLOMBO, M. F. & BONILLA-RODRIGUEZ, G. O., 1996)

Através deste método, mais recentemente foi demonstrado um novo estado da desoxi-Hb estabilizado na ausência de ânions. Esta transição estrutural foi observada por medidas funcionais de variação de hidratação em função da concentração de ânions presentes em solução, bem como por estudos de difração de Raios-X e medidas diretas de hidratação. (COLOMBO, M. F. & SEIXAS, F. A.V., 1999, SALVAY, A. G., et.al., 2003, SEIXAS, F. A.V., et.al., 1999)

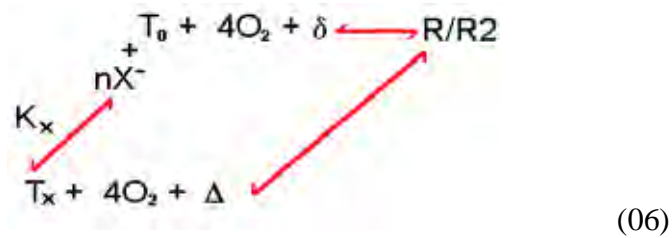
Este novo estado, chamado de T_o , tem afinidade por O_2 e hidratação intrínseca, intermediárias aos extremos T_x (a desoxi-Hb ligada a ânions) e R. Para descrever a oxigenação da Hb, um novo modelo foi proposto conciliando os dois estados clássicos da proteína (T e R) com o novo estado intermediário T_o . O modelo considera que o equilíbrio entre os estados T_o e T_x , é determinado pela atividade de X, sendo:



Na presença de ânions (X), um caminho possível para a transição do estado T para R passaria pelo estado intermediário, T_o , no qual estes ânions são liberados da estrutura

conforme ocorre a oxigenação. Já na ausência de ânions, o estado T_0 é estabilizado e a transição passa a ser então de T_0 para R, com uma variação de hidratação menor.

O modelo proposto para descrever o efeito de ânions na variação da hidratação entre a Hb totalmente oxigenada (R/R2) e totalmente desoxigenada (T_0/T_x) foi esquematizado como:



onde δ e Δ representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb livre e ligada a ânions respectivamente, K_x é a constante de dissociação do ânion à desoxi-Hb, e n a estequiometria da ligação. As equações que descrevem este modelo estão detalhadas na seção Materiais e Métodos.

Para a HbA os valores de Δn_w que acompanham a oxigenação são: $\delta \sim 25$ na ausência de ânions e $\Delta \sim 70$ na presença de ânions (2,3-DPG e Cl), $K_x = 10$ mM e $n = 1,9$. Esta diferença de hidratação reflete a mudança estrutural que a proteína sofre passando de $T_x \rightarrow R$ ou $T_0 \rightarrow R$: um número diferente de Δn_w indica uma diferente exposição de superfície acessível ao solvente em cada caso.

Uma vez que o novo estado, T_0 é intermediário a T_x e R, poder-se-ia suspeitar de um novo estado R, intermediário. No entanto, os autores mostraram evidências de que se trata de uma nova conformação da desoxi-Hb. Primeiro porque os experimentos realizados com DPG, foram realizados em uma concentração onde apenas a estrutura desoxigenada se liga a este ânion. Além disso, caso se tratasse de uma nova conformação R, seria esperado que a constante K_r variasse. Imaizumi *et.al.* estudaram a influência da presença de ânions em solução nas constantes K_R e K_T (IMAIZUMI, K., *et.al.*, 1979) e determinaram que a presença de ânions em solução parece não alterar a constante de ligação K_R , diferente do que acontece com a K_T , sustentando que a presença de um estado intermediário estabilizado na ausência de ânions seria um estado desoxigenado alternativo.

A presença de um novo estado estrutural alostérico para a desoxi-Hb foi posteriormente confirmada por outros grupos, em experimentos de oxigenação da Hb humana encapsulada em sílica-gel, o que impede mudanças quaternárias na proteína, mostrando que

este processo ocorre com mudanças terciárias (SHIBAYAMA, N. & SAIGO, S., 1995, BRUNO, S., et.al., 2001).

1.3 - Efeito Bohr e efeito de cloreto

Prótons H^+ são efetores alostéricos de grande importância fisiológica, ou seja, a afinidade da hemoglobina varia com o pH. A partir do pH 6,5, um aumento do pH e conseqüente diminuição no número de prótons em solução, causa um aumento na afinidade da Hb pelo oxigênio. Essa relação, conhecida como Efeito Bohr Alcalino, implica em uma maior afinidade da desoxi-Hb, em relação à Hb aos prótons H^+ , assim a oxigenação resulta na liberação desses prótons. Fisiologicamente, este efeito permite uma troca facilitada entre O_2 e CO_2 : o CO_2 está presente nos capilares em que circula o sangue; e a enzima anidrase carbônica catalisa a reação $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$, aumentando os prótons livres em solução. Segundo descrito pelo efeito Bohr alcalino, a Hb tenderá a ligar estes prótons, liberando oxigênio.

Em pH menor que 6,5 a oxi-Hb passará a ter maior afinidade aos prótons que a desoxi-Hb, assim a oxigenação da Hb acompanhará a ligação de prótons. Este efeito chamado de Efeito Bohr Ácido, admite que a afinidade da Hb ao oxigênio aumente com a diminuição do pH. (BOHR, C. et.al., 1904)

A origem destes dois efeitos está nas mudanças de cargas de determinados aminoácidos que na transição T-R tem seus valores de pK (ou seja valores de potencial doação de prótons) alterados. Diferentes aminoácidos participam do efeito Bohr, como grupos imidazole de histidinas de superfície, resíduos terminais das cadeias alfa e beta e possivelmente outros que tenham seus valores de pK alterados com a mudança de pH, devido a arranjos conformacionais da molécula. (LUFKIN J. A. & HO, C., 2004)

Alguns pesquisadores postulam que apenas um determinado número de resíduos poderia participar do efeito Bohr, enquanto outros propõe que potencialmente qualquer resíduo que mude seu valor de pK quando na mudança oxi-desoxi ou ainda que mude seu pK na presença de um ânion possa colaborar para o efeito Bohr. Desta forma, diferentes conjuntos de aminoácidos poderiam participar do efeito Bohr em uma ou outra condição. (HO, C. & RUSSU, I. M., 1987)

O efeito Bohr pode ser determinado em função da afinidade ao oxigênio, também utilizando a equação de Wyman. Neste caso a equação, adaptada ao ligante H^+ fica:

$$\left. \frac{d \log P_{50}}{dpH} \right|_{ai} = \Delta n_{H^+} = (n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}) \quad (07)$$

Estudos realizados por Busch e Ho em 1990 mostraram que o efeito Bohr é completamente dependente do meio, respondendo a variações iônicas da solução, uma vez que diversos resíduos de superfície podem participar dessas reações. O efeito Bohr macroscópico é uma soma dos efeitos microscópicos de cada resíduo, individualmente, determinado pelas mudanças eletrostáticas e conformacionais do meio em a proteína que se encontra. Para ilustrar esta modificação, reproduzimos a figura 4, que demonstra que de acordo com a solução, um resíduo pode contribuir positivamente ou negativamente para a captação ou liberação de prótons.

Um estudo específico feito com Hbs mutantes nas histidinas $\beta 2$ e $\beta 146$ trouxe evidências do efeito eletrostático e conformacional amplo que o solvente pode causar no pK dos resíduos. Os autores mostraram que a contribuição de cada um destes resíduos pode ser positiva ou negativa dependendo da presença de ânions e do tipo de tampão utilizado, uma vez que os valores de pK desses resíduos mudam em cada situação. Este resultado sugere que o efeito Bohr depende da natureza do solvente tanto por interações diretas aos resíduos de superfície ou por perturbações eletrostáticas e conformacionais de outros resíduos. (BUSCH, M. R. & HO, C., 1990)

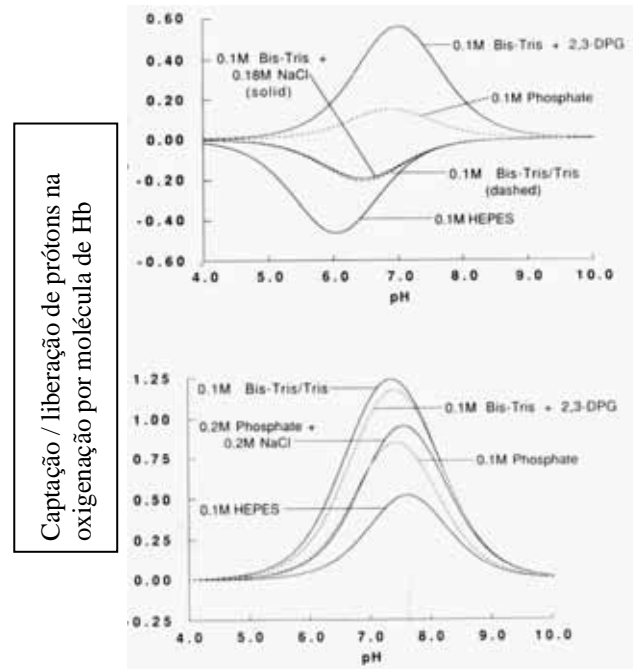


Figura 4: Contribuições da histidina $\beta 2$ (A) e $\beta 146$ (B) ao efeito Bohr da Hb em diferentes condições. A figura mostra colaborações tanto positivas quanto negativas dependendo do solvente. (Adaptado de Busch, M.R. e Ho,C., 1990)

O efeito Bohr é também influenciado pela presença de ânions em solução: íons cloreto se ligam a proteína no estado desoxigenado, modificando valores de pKs de determinados resíduos. Na oxigenação, tanto prótons quanto íons cloreto são liberados, assim os dois efeitos estão interligados. Na presença de 100mM cloreto cerca de 2 prótons são liberados na oxigenação da HbA, enquanto que na ausência deste íon, 1 próton é liberado. (VAN BEEK, G. G. M. et.al., 1979)

A maneira que ocorre a ligação do cloreto a Hb é alvo de muitos estudos. Primeiramente foi sugerido que essa ligação se daria em sítios específicos da Hb, que seriam o resíduo N-terminal Val $\alpha 1$ e a Arg 141 $\alpha 1$, resíduo C-terminal (CHIANCONE, E. et.al., 1972, 1975).

Max Perutz (PERUTZ, M. F., et.al., 1993) propôs que não existiria um sítio específico para a ligação do cloreto e que este efeito se deveria, portanto, a abertura da cavidade central, durante a transição T para R. Neste caso, o excesso de cargas positivas, causaria uma repulsão iônica, que permitiria a difusão de íons cloreto, os quais neutralizariam as oito cargas catiônicas da cavidade central deslocando o equilíbrio de T para R. Para testar essa hipótese, Perutz realizou experimentos com Hbs mutantes, que tinham alguns desses resíduos positivos substituídos e observou que a influência da concentração de íons cloreto na afinidade da Hb por O₂, medida por p₅₀, diminuía à medida que esses resíduos positivos da

cavidade central eram substituídos (as Hbs estudadas foram os mutantes naturais Sherwood Forest (R104 α T), Turriff (K99 α E), Abrizzo (H21 β R) e Dallas (N97 β K). Perutz notou ainda que modificações em resíduos de superfície da molécula, não influenciaram a p_{50} , e concluiu que estas observações suportam a hipótese que íons cloreto alteram a p_{50} por um mecanismo de condensação iônica. As Hbs estudadas foram Hbs Cowtown (H146 β L) e Hiroshima His (H146 β D). (PERUTZ, M. F., et.al., 1994)

Fronticelli *et.al.*, e outros autores posteriormente, propuseram como sítio de ligação de cloreto as lisinas β 76 e β 8 na Hb bovina, que não estão na cavidade central. (FRONTICELLI, C., et.al., 1994; FRONTICELLI, C., et.al., 1995, MARTA, M., et.al., 1998). Na Hb humana, o resíduo que ocupa a posição β 76 é uma asparagina, que não ligaria cloreto. Segundo estes autores, a ligação de cloreto seria, portanto diferente para as Hbs humana e bovina, sugerindo sítios específicos de ligação. Fronticelli *et.al.* atribuíram as diferenças funcionais das Hbs humana e bovina a estes diferentes aminoácidos da cadeia β , propondo uma modulação na afinidade por oxigênio regulada por mudanças de ordem terciária.

Estudos cristalográficos e funcionais apontaram ainda, ao longo dos anos, outros resíduos como possíveis sítios de ligação de cloreto, por exemplo, β 82 Lys, β 143 His , β 146 His, β 2His, entre outros. (MATTHEW J.B.,et.al., 1981.,1982; RUSSU, I. et.al.,1989, RIGGS, A.F., 1988) .

Em 1999, Hui *et.al.* propuseram evidências estruturais que o íon cloreto poderia se ligar a Hb pelos resíduos Arg 141 α 1 e Arg 141 α 2, baseados na comparação de estruturas cristalográficas de desoxi-Hb e de hemoglobinas mutantes cristalizadas: Hb α + M (cadeia β normal e cadeia α com uma metionina precedendo a valina inicial) e Hb α V1M (com uma metionina substituindo a valina inicial da cadeia α). Os autores notaram que a Hb α + M apresentava afinidade maior que a HbA e que a Hb α V1M. Ao comparar os mapas de densidade cristalográfica desta proteína com aquele da HbA, eles notaram que apesar da modificação ter sido feita na extremidade N-terminal, havia na Hb de maior afinidade a ausência de uma densidade eletrônica no resíduo 141 α . Assim, essa densidade que poderia ser assinalada como uma molécula de água ou de cloreto foi apontada pelos autores como responsável pela diferença nesta afinidade. (HUI, H. L., et.al., 1999)

Recentemente, estudos cristalográficos realizados em nosso laboratório também mostraram indícios de que os íons Cl⁻ poderiam estar ligados às argininas 141 α 1 e 141 α 2 da HbA . Estas evidências foram encontradas analisando mapas de diferenças entre densidades eletrônicas das desoxi-Hbs cristalizadas em total ausência de ânions (To) e na presença de

cloreto (Tx). Foram procuradas densidades eletrônicas para o solvente presentes no mapa Tx e ausentes no mapa To. A partir desta metodologia foram identificados quatro possíveis sítios de ligação de cloreto exatamente nas argininas: dois deles nas Arg 141 α 1 e 141 α 2, em concordância com a proposição de Hui *et.al.*, e dois deles identificados originalmente nas argininas 92 α 1 e 92 α 2. Estes quatro sítios obedecem ao padrão de ligação de cloreto a arginina, observado em outras proteínas (SEIXAS, F.A.V., 2002).

Para investigar a hipótese de que a Arg 141 α são sítios de ligação de cloreto, estendemos nossos estudos de variação de hidratação e cloreto para a Hb desArg, obtida por modificação enzimática da Hb humana, que perde as argininas 141 α . Este resíduo tem um importante papel na estabilidade da estrutura T, através de interações com outros aminoácidos: a arginina faz pontes salinas com a Lys127 α , com a Asp126 α e com a Val1 α . A perda deste resíduo causa um aumento na flexibilidade da molécula e conseqüentemente desloca o equilíbrio para a estrutura de maior afinidade R. (IKEDA-SAITO, M., *et.al.*, 1980, KILMARTIN, J. V. & ROSSI-BERNARDI, L., 1971).

Nossos resultados obtidos por variação de hidratação em função da concentração de cloreto, mostraram que o comportamento encontrado para a HbA novamente se repetiu para a Hb desArg: na ausência de ânions o valor de Δn_w encontrado foi cerca de 35 moléculas de água (enquanto para a HbA ficou em 25) e na presença de ânions, o mesmo número de Δn_w foi encontrado para as duas Hbs: ~70 moléculas de água. Os parâmetros termodinâmicos de constante de ligação de cloreto e estequiometria também foram muito parecidos àqueles medidos para Hb humana: HbA = 10mM e desArg = 13mM, e ~1,9 e 1,7 para coeficiente estequiométrico, indicando que Arg 141 não seria o sítio alostérico responsável pela ligação do cloreto à Hb. (TOSQUI, P., 2005)

Com base nestes resultados, buscamos então estudar as Arg 92 α como possíveis sítios de ligação do cloreto. Se estes resíduos colaborarem para a regulação intrínseca da afinidade do oxigênio pelo estado T, uma mutação destes resíduos para outro resíduo neutro poderia aumentar a afinidade do oxigênio a esta Hb. De fato, os mutantes naturais Hbs Chesapeake (R92 α L) e Hb J-Cape Town (R92 α Q) possuem afinidade ao oxigênio aumentada. (CHARACHE, S., JENKINS, T. *et.al.*, 1971)

Alem dessas duas espécies, construímos ainda a rHb Chesapeake desArg (R92 α L, Δ R141 α), um mutante sem as duas argininas, e re-analisamos a HbA e Hb desArg.

1.4- Hemoglobinas estudadas no trabalho

As Hbs Chesapeake e J-Cape Town, são mutantes naturais do resíduo $\alpha 92$ (FG4), localizado na subunidade $\alpha 1\beta 2$, o que resulta em aumento da afinidade pelo oxigênio e diminuição dos contatos entre subunidades e heme-heme, indicando que esta região é crítica para cooperatividade. (PERUTZ, MF & LEHMANN, H, 1968) O movimento oxi-desoxi da estrutura quaternária causa mudanças drásticas nesta subunidade: com a ligação do oxigênio ocorre uma rotação de 13 graus entre $\alpha 1$ e $\beta 2$, desfazendo pontes de hidrogênio que ligam vários resíduos.

Estudos de diversas Hbs com mutações em resíduos desta subunidade mostram que a mudança na funcionalidade da proteína varia com a substituição do aminoácido. Assim mutantes como Chesapeake, Kempsey (D99 β N) e Kansas (N102 β T) terão mudanças mais drásticas de funcionalidade tendo afinidade extremamente alta ao oxigênio (a Hb Kempsey é conhecida por não apresentar estrutura T) do que outros mutantes como Hb J-Cape Town (R92 α Q) ou Richmond (N102 β K). (WIECHELMAN, K. J. et.al., 1976)

A Hb Chesapeake possui uma afinidade cerca de seis vezes maior que aquela medida para a HbA e uma baixa cooperatividade, com valor de n_{50} em cerca de 1,3 (NAGEL, R L et.al., 1967) devido a diminuição de contato entre as subunidades. (HO, C. et.al.,1970) A Hb J-Cape Town possui cooperatividade e afinidade ao oxigênio intermediárias entre a Hb Chesapeake e HbA. (BALDASSARRE, J.J. et.al., 1970)

Estudos de RMN e EPR mostraram que tanto a Hb Chesapeake quanto a Hb J-Cape Town possuem perturbações estruturais não apenas localizadas, mas propagadas ao longo da molécula, sendo transmitidas pela interação entre esses aminoácidos e aminoácidos adjacentes. (DAVIS, D.G. et.al., 1971, BALDASSARRE, J.J. et.al., 1970)

A Hb desArg, é encontrada nas membranas do sinciotrofoblasto, no útero, e se caracteriza por ter alta afinidade ao oxigênio e baixa cooperatividade. (FASAN, G.G. et.al., 1991, KILMARTIN, J.V., 1981) A clivagem do resíduo Arg 141 causa um aumento na flexibilidade da molécula e conseqüentemente desloca o equilíbrio para a estrutura de maior afinidade R. Apesar desta mudança, não há modificação na região dos grupos heme e o resíduo Tyr140 α está na mesma direção que na HbA. (KAVANAUGH, J. S., et.al. 1995)

O mutante construído Chesapeake desArg, não possui nenhuma das duas argininas estudadas no trabalho: possui a mutação original da Chesapeake (R92 α L) e tem o resíduo C-terminal Arg 141 α excluído.

A figura 5 esquematiza onde estariam os resíduos modificados na molécula.

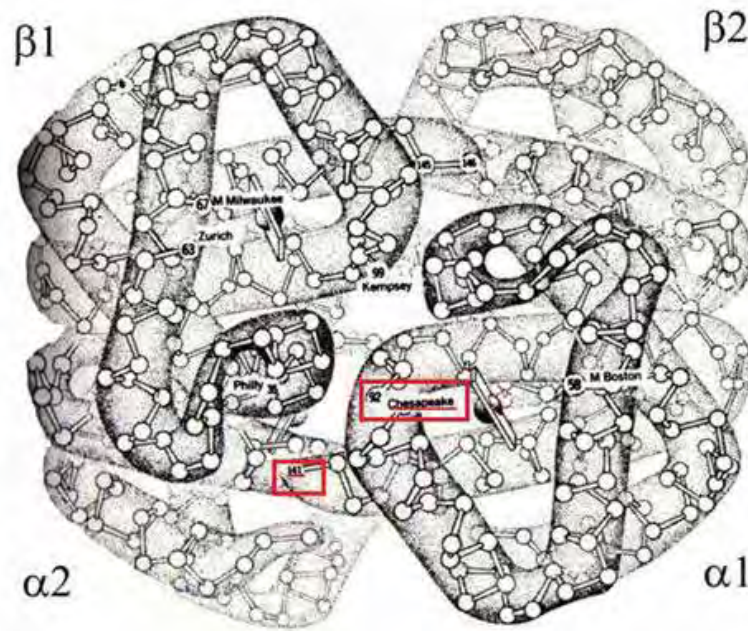


Figura 5: Localizações das mutações das Hbs : resíduo 92 e 141 grifados em vermelho. (Adaptado de Ho, C 1992)

1.5 - Breves considerações sobre 1H RMN aplicada ao estudo de hemoglobinas

Uma das técnicas utilizadas em nosso trabalho foi a ressonância magnética nuclear homonuclear de prótons ou 1D ^1H RMN. Esta técnica unidimensional tem se mostrado uma excelente ferramenta para o estudo de proteínas e particularmente ao estudo de hemoglobinas.

Evidentemente, muitos fatores impedem que a técnica ^1H RMN forneça informações diretas sobre todos os prótons da Hb (na ordem de milhares). Em primeiro lugar as ressonâncias (picos nos espectros) destes prótons se sobreporiam totalmente e, além disso, proteínas grandes como Hbs possuem movimento de tombamento em solução lento, fazendo com que as ressonâncias se tornem largas degradando a resolução espectral. Por isso, para estudar as características estruturais da Hb, são observadas regiões específicas, não limitadas por estes fatores.

Para se assinalar as ressonâncias características de proteínas como hemoglobinas, que são consideradas grandes (maiores que 15000 Da) e com estruturas complexas (contendo subunidades) o primeiro passo costuma ser o assinalamento de ressonâncias de aminoácidos específicos. Para isso comparam-se ressonâncias de proteínas nativas com aquelas que têm mutações específicas em suas seqüências. Os experimentos são então feitos em diferentes tampões e condições e as ressonâncias perdidas devem pertencer aos aminoácidos mutados. No entanto modificações estruturais podem afetar diferentes regiões da Hb perturbando as

ressonâncias e desta forma, causando efeitos ambíguos. Para descartar esta possibilidade são utilizadas estratégias como, confrontar estes resultados com outras técnicas (como 2D RMN ou informações de cristalografia) ou testar diferentes mutações para o mesmo aminoácido confirmando a ressonância. Através de todas essas técnicas foram assinaladas diversas ressonâncias para a molécula de hemoglobina.

A Hb possui em cada uma das subunidades um átomo de ferro, e de acordo com o estado de ligação os elétrons podem existir em diferentes spin ($S=2$ ou paramagnético para desoxi e $S=0$ ou diamagnético para estado ligado), sendo as modificações eletrônicas restritas a cada subunidade. Essas diferenças criam campos magnéticos locais anisotrópicos e, como resultado, produzem diferenças nos deslocamentos químicos, ou seja, na frequência de ressonância (medidas em ppm) dos prótons próximos. Essas interações, mostram com clareza o que acontece nas regiões do heme e em resíduos próximos a ele: através desta relação, foi possível, por exemplo, o estudo da cooperatividade da ligação de oxigênio à Hb. (HO, C., 1992)

O estudo da proteína no estado oxigenado não é conveniente devido a rápida formação de metaHb, que compromete o espectro e a possibilidade de comparação entre as soluções. Por esta razão para o estudo da Hb no estado ligado, utiliza-se a Hb ligada ao CO.

Existem muitas diferenças na ligação de oxigênio e CO a proteína: CO se liga a proteína com uma afinidade 210 vezes maior que o oxigênio, independente da presença de ânions ou do pH, tendo apenas alguma influência da temperatura. Funcionalmente, existem diferenças no coeficiente de Hill e na ligação a Hb: o oxigênio pode se ligar aos estados T e R da Hb com a mesma velocidade enquanto que o CO se liga ao estado T muito mais devagar que ao estado R. No entanto, estruturalmente ambos ligantes assumem a conformação quaternária R, tendo configurações muito parecidas. Algumas diferenças estruturais podem ser citadas como a ligação ao ferro do heme por cada ligante, e a ausência da ponte de hidrogênio estabelecida pelo oxigênio com a histidina distal, ausente na forma CO (já que não há necessidade de mais um ligante para o oxigênio complexado ao carbono). Ainda assim, deve ser enfatizado que de maneira geral as estruturas com CO e O₂ são muito parecidas e, portanto a HbCO pode ser utilizada como modelo para se estudar a HbO₂. (HO, C., 1992)

- Regiões Observadas

Seqüência de pulsos que permitem observar as ressonâncias de relaxamento rápido, ou seja, aqueles com blindagem paramagnética, suprimindo aquelas de relaxamento lento (ou

seja, prótons com blindagem diamagnética) dão origem aos espectros da proteína desoxigenada.

Estrutura hiperfina e histidinas proximais:

Utilizando como referencia o DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate), a principal região observada na proteína desoxigenada é aquela entre +20 e +16 ppm, região denominada “estrutura hiperfina”, e também entre +50 e +80 ppm onde se encontram as histidinas proximais (F8). Esses deslocamentos químicos são determinados pelas interações entre elétrons não pareados do átomo de ferro e prótons intercambiadores N_δH das histidinas, ou pelas de pontes de hidrogênio intermoleculares.

Corrente de anel:

No estado diamagnético, ou seja, quando a proteína está complexada com oxigênio ou CO, a região observada está entre -5 e -8 ppm. Esta região chamada de região de “deslocamento da corrente de anel” está próxima às porfirinas. Estas ressonâncias, presentes no estado ligado, são deslocamentos químicos de prótons presentes nas regiões do bolsão distal, em especial os alifáticos, como as valinas α62 e β67. Esses resíduos monitoram modificações estruturais localizadas próximas dos hemes no estado ligado.

Pontes de hidrogênio:

As interfaces das subunidades α1β1 e α1β2, possuem pontes de hidrogênio que também podem ser monitoradas tanto no estado desoxigenado, quanto no estado ligado. As ressonâncias 11,2; 12,4; 12,8 e 14 ppm são conhecidos marcadores de estrutura quaternária da proteína, uma vez que estão ausentes nos espectros de cadeias isoladas. Estas ressonâncias foram assinaladas como sendo respectivamente: prótons envolvidos na ponte de hidrogênio entre os resíduos Asp α94 e Trp β37 (11,2 ppm) subunidade α1β2; na ponte de hidrogênio entre His α103 e Asn β108 (12,4 ppm) na subunidade α1β1; na ponte de hidrogênio entre Asp α122 e Tyr β35 (12,8 ppm), na subunidade α1β1 e na ponte de hidrogênio entre Tyr α42 e Asp β99 na subunidade α1β2 (14 ppm). As ressonâncias em 11 e 14 ppm são ainda marcadores da estrutura desoxigenada e são deslocadas da região analisada no estado ligado: a ressonância em 14 ppm é chamada de marcador-T, não sendo medida com a proteína no estado ligado natural e a ressonância em 11,2 ppm está deslocada para 10,8 ppm no estado ligado natural.

Uma revisão detalhada sobre todo este conteúdo de RMN e hemoglobinas foi escrito por Ho, C. e pode ser encontrado em *Advances in Protein Chemistry*, volume 43, 1992.

Ainda que essas três regiões (hiperfinas, correntes de anel e pontes de H) sejam pequenas em relação ao número de prótons da Hb, elas estão estrategicamente localizadas na estrutura da Hb: nas regiões do heme onde pode-se medir a ligação de O₂ ou CO e entender o alosterismo na estrutura, ou nas subunidades onde pode-se medir as mudanças quaternárias (BARRICK, D. et.al., 2004)

Histidinas de superfície:

O assinalamento das ressonâncias de histidinas de superfície, envolvidas no efeito Bohr, é possível apenas em meio deuterado a partir de prótons C2. Esse assinalamento foi alvo de estudos funcionais e de RMN por muitos anos e para a HbA está concluído, assim como as contribuições de cada uma das histidinas de superfície ao efeito Bohr tanto no estado ligado quanto no estado desoxigenado, obtidas a partir do valor de pK de cada uma em diferentes ambientes. Estes estudos, realizados em intervalos muito pequenos de pH, aconteceram ao longo dos anos e foram publicados em diversos trabalhos, os quais utilizamos como referência, como por exemplo: HO, C & RUSSU, I.M. 1987; RUSSU, I. M. & HO, C.; 1986; BUSCH, M.R. & HO,C.; 1990, etc.

II – OBJETIVOS

O principal objetivo desta tese foi investigar a presença de sítios específicos para a ligação de cloreto à Hb. Para isso propusemos:

- Estudar o papel das argininas 141 α e 92 α na ligação do cloreto à Hb através da expressão, purificação e caracterização de hemoglobinas com mutações sítio dirigidas a esses dois resíduos.

- Estender os estudos de efeito de ânions realizados para a HbA a outras Hbs, utilizando cloreto como efector , através de medidas de variação da atividade de água para obtenção de parâmetros estruturais e funcionais destas Hbs.

- Caracterizar o efeito Bohr das Hbs humana e modificadas para identificação da influência do íon cloreto neste comportamento.

- Investigar a estrutura dessas proteínas nos estados desoxigenado e ligado, em função do pH, da presença de ânions e temperatura por RMN, assim como estudar aspectos estruturais que reflitam aqueles funcionais.

- Analisar a influência do cloreto nos resíduos de histidina de superfície e seu potencial envolvimento no efeito Bohr da Hb Chesapeake, em comparação com a HbA, investigando se a ligação de cloreto causaria grandes mudanças em poucos grupos ou diversas mudanças em vários grupos.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram obtidos de empresas certificadas como Sigma, Merck, Boehringer Mannheim, Fisher, New England Biolabs, GE Healthcare, Promega e com alto grau de pureza. Para os experimentos necessários, os reagentes, vidraria e materiais plásticos foram autoclavados.

3.1) Obtenção das amostras de hemoglobina.

3.1.1) Obtenção da HbA

A amostra de hemoglobina humana foi obtida de um indivíduo adulto saudável e não fumante e purificada conforme procedimento padrão em nosso laboratório baseado na metodologia proposta por Williams e Tsay (WILLIAMS, R. C. & TSAY, K., 1973) e descrito anteriormente por Colombo e Bonilla-Rodriguez. (COLOMBO M. F., et.al. 1996).

Uma vez coletado o sangue, o plasma foi retirado por centrifugação a 2500 g. As hemácias foram lavadas cinco vezes em solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 + EDTA 1 mM). A hemólise ocorreu com a adição de solução tampão hipotônica Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8,5. O passo seguinte, a retirada de “debris”, ocorreu com a adição de clorofórmio no mesmo volume que a solução da amostra, sob agitação constante. Coletamos o sobrenadante e em seguida centrifugamos a amostra a 2.300 g por 120 minutos. Novamente coletamos o sobrenadante e a amostra foi dialisada contra 2 L de tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 1 Mm, pH 8,5 por 12 horas para remoção de fosfatos.

Após este processo a amostra passou por coluna de troca aniônica DEAE-SEPHADEX A - 50 (Pharmacia), para separação da fração de interesse. Os tampões utilizados nesta cromatografia foram: Tampão inicial (A): Tris-HCl 15mM, pH 8,4 e Tampão final (B): BisTris-HCl 15mM, pH 7,0. O passo seguinte foi acoplar a coluna a um sistema de FPLC modelo LKB da Pharmacia e a um banho térmico com a temperatura mantida constante em 4° C. O FPLC forma um gradiente de pH devido a mistura de frações dos tampões A e B, permitindo assim a eluição da amostra pela coluna.(O gradiente de pH separa a fração de HbA2 com ponto isoelétrico 7,9 da HbA, com ponto isoelétrico pH em 7,2).

Após a eluição da fração de interesse, a amostra foi concentrada por centrifugação utilizando concentradores CENTRICON até um volume de aproximadamente 50 mL e posteriormente passada em uma coluna, de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA, para desionização da solução. A resina foi lavada com água ultrapura e depois a solução de Hb foi passada nesta coluna por no mínimo cinco vezes, para que quaisquer íons ficassem ligados à resina. Depois disso a amostra foi novamente concentrada por centrifugação em

concentradores Centriprep (AMICON) até aproximadamente 10mM/ heme e armazenada em alíquotas de 250 µl em N₂ líquido. Ao final destes procedimentos, a pureza da amostra foi checada através de uma eletroforese não desnaturante - PAGE, com coloração do gel por impregnação de nitrato de prata. (LAEMMLI, U. K., 1970)

As amostras utilizadas no Laboratório de Ciências Biológicas, localizado no Mellon Institute, pertencente à Universidade Carnegie Mellon, em Pittsburgh-PA, EUA, foram obtidas no banco de sangue local do Hospital da Universidade de Pittsburgh e purificadas pelo procedimento descrito por Ho, C e Lindstrom, 1972. A purificação constitui principalmente das etapas de lise das hemácias, centrifugação e passagem em coluna de FPLC. Os fosfatos e ânions são retirados pela passagem em coluna Sephadex, G25 (Pharmacia) equilibrada com tampão Bis-Tris pH 7,5. (HO,C. & LINDSTROM, T. R., 1972). A checagem de pureza foi feita por espectrometria de massa.

3.1.2) Obtenção das rHbs

As amostras de hemoglobina recombinantes foram obtidas no Laboratório de Ciências Biológicas, localizado no Mellon Institute, Universidade Carnegie Mellon, em Pittsburgh-PA, EUA. A expressão e crescimento das células contendo as Hbs seguiram com a descrição de Shen e colaboradores. (SHEN T.-J. H., et.al. 1993, SHEN T.-J. H., et.al. 1997).

O plasmídeo de expressão, derivado de *E coli*, pHE2, (T.-J. H. SHEN, et.al. 1993) foi utilizado como base para a construção dos plasmídeos de expressão das Hbs. Os plasmídeos pHE2113, pHE2115, pHE2114 e pHE2128 para a expressão das Hbs Chesapeake, Chesapeake desArg, Hb J-Cape Town e Hb desArg, respectivamente, foram construídos com o kit QuickChange de mutação sítio dirigida (Stratagene) e com os oligonucleotídeos apropriados para os códons modificados esperados. Como procedimento padrão, após a obtenção do plasmídeo sua seqüência foi checada pelo Laboratório Genewiz, Indústrias Genewiz, Southplainfield, New Jersey, EUA. Os plasmídeos foram transformados em *E coli* JM109 (Promega).

Vinte litros de cultura celular foram crescidos em Meio Mínimo de cultura enriquecido com vitaminas e estoque de metais (Sigma) a 32°C utilizando-se o fermentador Sartorius Bioestat C20-2, com pressão, pH, temperatura e nível de oxigênio e glicose monitorados. A figura 6 mostra este fermentador.



Figura 6: Fermentador Biostat Sartorius utilizado para obtenção das culturas de bactérias.

Quando a absorbância em 550 nm atingiu 7, a cultura foi induzida pela adição de isopropil-1-thio-D-galactopyranosida (ITPG) a uma concentração final de 24mg/L. Adicionou-se ainda hemina para atuar como precursor do grupo heme em quantidade de 25mg/L. Todos os reagentes e o fermentador foram autoclavados antes do uso. As células foram recolhidas pela centrifugação em centrífuga SORVALL, rotor SLC4000 a 4 °C a 6500 rpm por 15 minutos e BECKMANN, rotor J2-MC a 8 °C, em 8000 rpm por 10 minutos. A massa celular foi estocada em freezer -80°C até a purificação.

O procedimento de purificação se inicia com a massa celular resuspensa em 4mL de tampão de lise por grama (40 mM Tris-HCl, pH 8.6 e 1mM benzamidina, um inibidor de proteases). As amostras foram mantidas em ambiente de CO₂. Um homogeneizador de alta pressão (Avestin, EmulsiFlex-C5) foi utilizado para a lise das células. As amostras foram centrifugadas por 2,5 horas a 4 °C em 13500 rpm em uma centrífuga Beckman com rotor JLA16. Após adicionarmos polyethyleneimine a uma concentração de 0.5%, o sobrenadante foi centrifugado a 8000 rpm, em 4°C utilizando o mesmo rotor, por 30min para precipitar ácidos nucleicos. A amostra sofreu então ultrafiltração utilizando o Vivaflow 200 Ultrafiltration (Sartorius Stedim Biotech) para ser concentrada e equilibrada em solução 20mM Tris-HCl 0.5mM EDTA, pH 8.5.

Após diálise *overnight* a amostra foi aplicada em coluna de troca iônica, com resina Q-Sepharose Fast-Flow, e a checagem da saída de DNA foi feita por monitoração no espectrofotômetro, medindo-se a absorbância em 260 nm. Após todo DNA ser eluído, a fração de Hb foi eluída por passagem do mesmo tampão a pH 6,6.

Após a coleta, a amostra foi concentrada e oxidada usando $K_3Fe(CN)_6$, em concentração três vezes maior que a Hb. Após a oxidação a amostra foi reduzida com ditionito de sódio, na mesma concentração do $K_3Fe(CN)_6$ e convertida na forma CO. Esse passo garante a configuração própria do grupo heme. (SHEN, T.-J. H, et.al. 1993). A solução foi então purificada em coluna ACTA FPLC Mono-S, para isolar a fração de interesse. (sistema GE Healthcare Cation Exchanger, HR 16/10).

A aferição de pureza da amostra foi feita por análise de ionização eletrospray de espectroscopia de massa, (ESI-MS) realizada em VG Quattro-BQ, de acordo com Shen, T.J. et.al. (SHEN, T. J., et.al. 1993) A figura 7 mostra o espectro obtido para checagem de pureza da Hb Chesapeake.

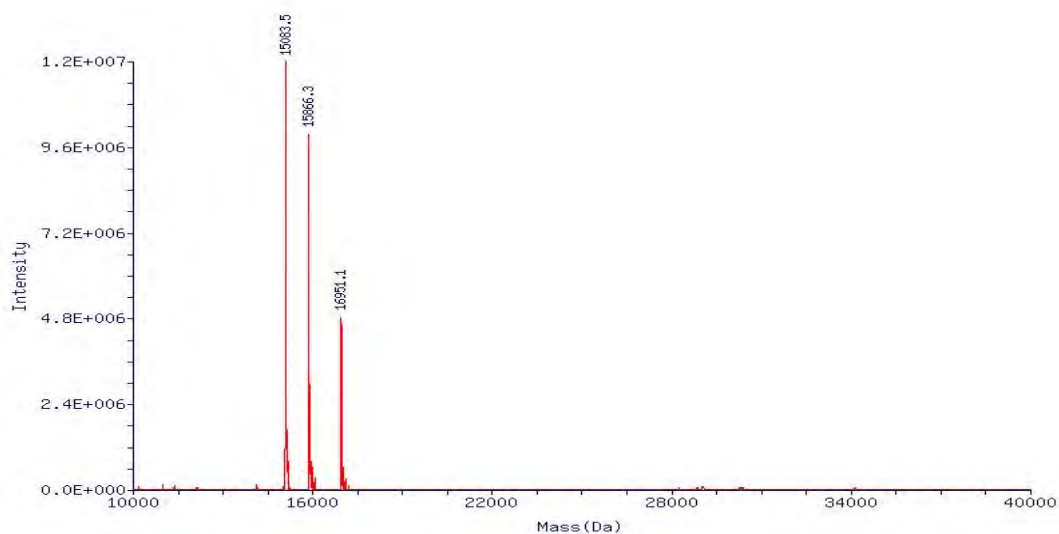


Figura 7: Espectro de massa obtido para checagem de pureza da hb Chesapeake. A cadeia beta sem modificação tem o peso teórico de 15867,2 Da e o obtido de 15866, 3 Da. A cadeia alfa da HbA tem o peso de 15126,38 e o peso teórico da Chesapeake é 15083.3 Da. O peso obtido da cadeia alfa da Hb Chesapeake foi de 15083,5 Da. A mioglobina foi usada como padrão com peso teórico de 16951.15 Da e obtido de 16951,1 Da.

3.2) Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração protéica foi realizada com base no método quantitativo espectrofotométrico. (RIGGS, A., 1981) A equação 08 expressa o cálculo da concentração da proteína, [prot], a partir das absorvâncias (Abs) aferidas em um dos picos característicos para a oxi-Hb (577nm), e do valor correspondente à linha de base (700 nm).

$$[prot] = \frac{(Abs_{577} - Abs_{700}) \cdot (V_{cubeta})}{(\epsilon_{577prot} \cdot V_{Hb})} \quad (08)$$

A concentração da proteína é expressa em mM/heme, V_{cubeta} representa o volume total da amostra na cubeta, ϵ_{prot} o coeficiente de extinção molar a Hb em 577nm e V_{Hb} , o volume de Hb adicionado ao tampão de diluição. Em nossos experimentos utilizamos as enzimas catalase e superóxido dismutase, a uma concentração de 1mM para evitar a formação de meta-hemoglobina. Como a presença de meta-hemoglobina em excesso pode adulterar os resultados, é importante checar ao final da purificação, assim como ao final de cada experimento a concentração desta espécie presente. Para isso, utilizamos as equações abaixo:

$$A_{576} = [oxi - Hb] \epsilon_{577}^{oxi} l + [meta - Hb] \epsilon_{577}^{meta} l \quad (09)$$

$$A_{630} = [oxi - Hb] \epsilon_{630}^{oxi} l + [meta - Hb] \epsilon_{630}^{meta} l \quad (10)$$

Onde, [meta-Hb] e [oxi-Hb] são as concentrações molares da proteína oxidada e não oxidada respectivamente e l o caminho ótico da cubeta.

Os valores dos coeficientes de extinção molar determinados em pH de 7,2 e nos comprimentos de ondas 630 e 576 nm, utilizados são aqueles determinados por Benesch (BENESCH, R. E., et.al., 1973):

para a oxi-Hb $\epsilon_{630}^{oxi} = 0,014 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ e $\epsilon_{577}^{oxi} = 1,58 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, enquanto que para a meta-Hb, $\epsilon_{630}^{meta} = 0,376 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ e $\epsilon_{577}^{meta} = 0,414 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

3.3) Oxigenando e desoxigenando as amostras de hemoglobina no estado CO

As amostras que se encontram na forma CO precisam ser oxigenadas e/ou desoxigenadas dependendo do experimento planejado.

A oxigenação da amostra é feita utilizando um rotovapor. Esta cela redonda possui duas aberturas: uma para entrada do gás oxigênio ou nitrogênio e outra para saída do CO. Através de um braço mecânico a cela fica presa e rotaciona dentro de um recipiente com gelo enquanto é iluminada por uma lâmpada de 120W que acelera a reação de desprendimento de CO. (HALDANE, J. & LORAINE-SMITH J., 1895)

A amostra recebe oxigênio por cerca de uma hora ou até que esteja totalmente oxigenada. A monitoração desta reação se dá no espectrofotômetro. Os parâmetros utilizados para identificar a amostra oxigenada são os picos de absorbância nos comprimentos de onda 577nm e 540 nm, além de uma diferença de 20% entre os picos. As amostras de Hb no estado CO se caracterizam por picos em 538nm e 570 nm de altura similar.

A desoxigenação ocorre após a oxigenação, trocando-se o gás oxigênio por nitrogênio, até que a amostra esteja totalmente desoxigenada. A checagem ocorre pelo espectro de absorção com um pico único em 550 nm, característico desta espécie. A figura 8 traz uma foto deste sistema



Figura 8: Amostra de Hb sendo oxigenada em um rotovapor, dentro de um recipiente com gelo e iluminada por uma lâmpada de 120W.

3.4) Obtenção das curvas de oxigenação

As curvas de oxigenação foram obtidas através de dois métodos: hemox e tonometria. Os experimentos de efeito de cloreto foram realizados na presença de tampão HEPES 10mM, para que não houvesse interação de íons fosfato com a proteína.

3.4.1) Hemox

Um dos métodos utiliza um analisador hemox (TCS Scientific Corporation). A amostra é inserida em uma cela de acrílico, composta pela entrada de um eletrodo, um termostato, além de uma barra de agitação magnética, que permite homogeneização da amostra. Ela possui duas câmaras tampadas, uma onde está a amostra e outra que é mantida como vácuo. Na tampa se localizam a entrada e saída de gás (oxigênio ou nitrogênio). (TCS Scientific Corporation, 1995) A figura 9 traz uma foto da cela.

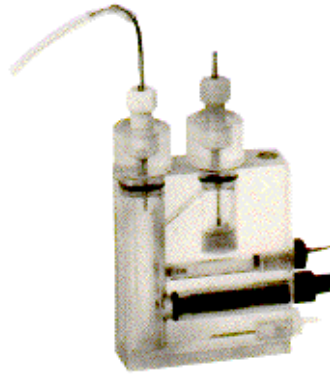


Figura 9: Foto da cela utilizada em nossos experimentos no hemox.

O princípio do hemox se baseia em um duplo feixe de luz que atravessa a amostra simultaneamente, nos comprimentos de onda 560 nm e 577 nm e em um eletrodo Clark que mede o nível de oxigênio, em mmHg. O resultado do sinal obtido espectrofotometricamente e pelo eletrodo se converte em um gráfico x,y mostrado pelo aparelho. No eixo y é apresentada a saturação, dada pela diferença entre os valores de absorbância obtidos nos dois comprimentos de onda. No eixo x, o eletrodo mede a tensão de oxigênio presente na cela conforme a amostra vai se desoxigenando, pela entrada de nitrogênio. A figura 10 traz o gráfico fornecido pelo aparelho.

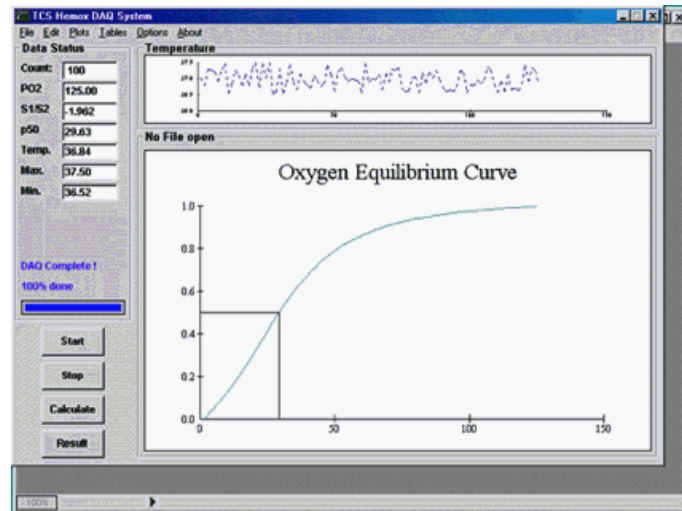


Figura 10: Gráfico da pressão de oxigênio pela razão da absorvância em 577 e 560 nm fornecido pelo hemox.

Os experimentos foram realizados em diferentes tampões e pHs, porém sempre contendo concentração de Hb entre 80 e 100 μ M (checada em espectrofotômetro), 1mM de catalase e superóxido-dismutase para prevenção da formação de meta-Hb e 1mM de anti-espumante (SIGMA) para prevenção de bolhas devido a agitação. Os parâmetros p_{50} e n_{50} são fornecidos pelo próprio equipamento através de Gráficos de Hill e ajuste não linear da equação de Adair. (ADAIR, G, 1925) A acurácia dos valores obtidos pelo hemox é de $\pm 5\%$. (TSAI,C. H. et.al.,1999)

Como as Hbs estudadas no trabalho apresentaram alta afinidade ao oxigênio, e por consequência valores de p_{50} muito baixos, os valores fornecidos pelo hemox poderiam não estar considerando a curva total de oxigenação da Hb. Este problema foi resolvido através do tratamento logístico de cada conjunto de dados. Uma vez que a curva de oxigenação da hemoglobina é descrita por uma sigmóide simétrica, com 70% da curva, é possível efetuar o ajuste logístico dos dados obtendo a curva completa. Este ajuste utiliza os extremos da sigmóide e fornece os valores de p_{50} e n_{50} . Os ajustes foram realizados com a ajuda do software ORIGIN (Microcal Corp.)

Com o intuito de confirmação dos resultados as curvas de oxigenação foram também obtidas através do método tonométrico-espectrofotométrico.

3.4.2) Tonometria

As medidas de tonometria se utilizam de um tonômetro. O tonômetro é formado por um corpo principal de vidro, uma válvula que controla entrada e saída dos gases, uma saída conectora por onde são feitas as injeções de oxigênio, e uma cubeta acoplada, onde fica a amostra com volume de 3 mL. O tonômetro utilizado está representado na figura 11.

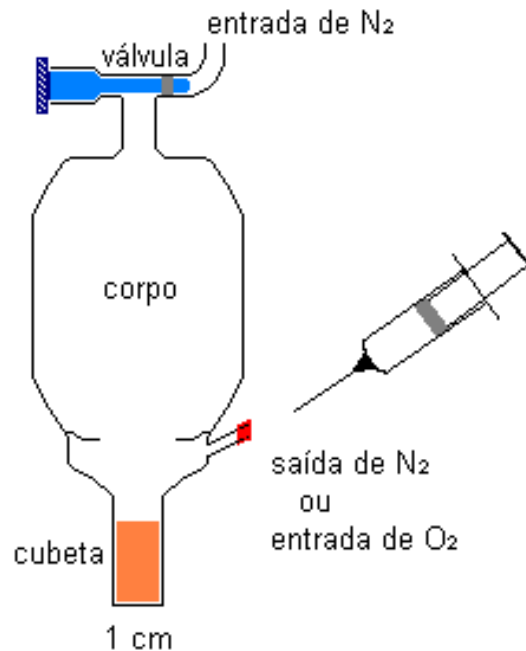


Figura 11- Representação esquemática do tonômetro. Com uma seringa injetamos um volume conhecido de ar dentro do tonômetro.

Após preparar a amostra nas condições desejadas para o experimento, a aplicamos no tonômetro e medimos um espectro de absorção da solução contendo a Hb oxigenada. Em seguida esta solução é desoxigenada através da passagem de nitrogênio gasoso, por cerca de 40 minutos. Então medimos outro espectro de absorção, agora com a Hb totalmente desoxigenada. Logo, temos os valores de absorção da Hb nas duas condições extremas, e dessa maneira podemos calcular a fração de saturação com qualquer outro espectro intermediário. Passamos então a adicionar oxigênio por meio de uma seringa e, após cada adição de oxigênio, o tonômetro foi deixado sob agitação constante por 5 minutos, para que a solução atingisse o equilíbrio. Então, medimos um novo espectro. Este processo se repetiu até que a solução estivesse totalmente oxigenada. A figura 12 demonstra essa técnica.

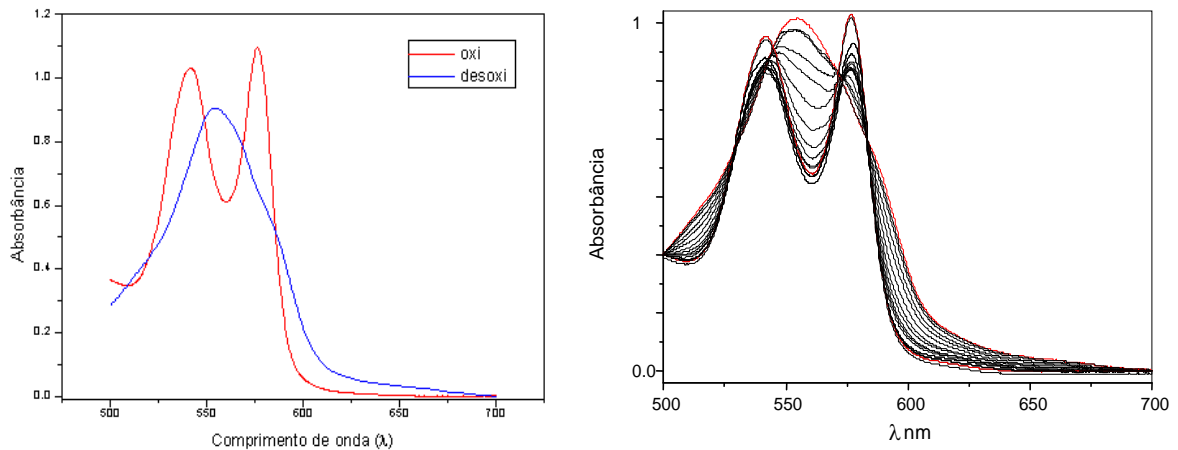


Figura 12: A figura acima a esquerda mostra os espectros de absorção da desoxi-Hb (—) da oxy-Hb (—) na região do visível. A figura a direita mostra regiões intermediárias entre os espectros e são referentes à diferentes saturações que a Hb apresenta durante o processo de desoxigenação e/ou oxigenação.

A pressão parcial de O_2 no tonômetro é calculada a partir do volume de ar injetado V_i , da pressão parcial de O_2 na atmosfera (P_o) e do volume da fase gasosa no tonômetro V_t , conforme a equação:

$$pO_2 = \left(\frac{(P_o \times V_i)}{V_t} \right) \quad (11)$$

O grau de saturação \bar{Y} é calculado em cada valor de pO_2 a partir das leituras de absorbância da oxy e desoxi hemoglobina no comprimento de onda de 576nm. Com valores de saturação e pO_2 podemos construir o gráfico de Hill e obter os valores de p_{50} e n_{50} .

As medidas foram realizadas em tampão fosfato de sódio 100mM ou HEPES 10mM, dependendo do experimento, em diversos pHs. A temperatura variou entre 25 e 29°C.

3.4.3) Obtenção dos dados de p_{50}

Os dados obtidos pelo hemox e re-tratados pelo ajuste logístico, foram confirmados pela tonometria. A figura 13 apresenta um gráfico da saturação pelo logaritmo da pO_2 , para a Hb J-Cape Town em tampão HEPES 10 mM, pH 7,2, na presença de 100mM de NaCl. O valor de p_{50} medido pelo ajuste logístico é 5,2 mmHg ($\pm 0,65$). O valor na mesma condição medido pelo tonômetro para p_{50} é 4,8 mmHg ($\pm 0,64$). Como os valores são próximos,

utilizaremos a média entre os dois valores, obtidos pelo ajuste logístico aos dados do hemox e obtidos através do gráfico de Hill dos dados obtidos por tonometria.

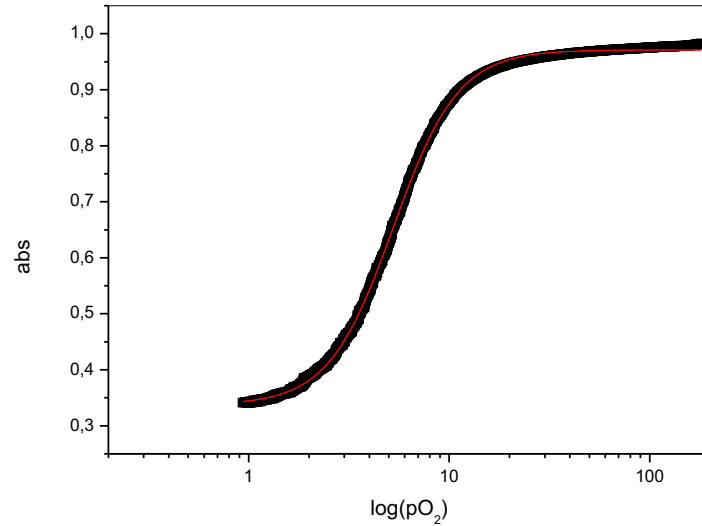


Figura 13: Gráfico de saturação pelo log pO₂ para Hb J Cape Town, obtido na presença de HEPES 10mM e 100mM de NaCl, 25°C.

A figura 14 mostra um gráfico de saturação em função de logaritmo da pO₂, para a hemoglobina Chesapeake. Por ser uma hemoglobina de alta afinidade, parte da curva foi perdida. Neste experimento, obtido na presença de tampão HEPES 10mM, pH 6,8, o valor de p₅₀ obtido foi pela equação logística foi 1,07 mmHg ($\pm 0,01$). O mesmo experimento realizado no tonômetro foi ajustado pelo gráfico de Hill e obtivemos o valor 1,18 mmHg ($\pm 0,41$).

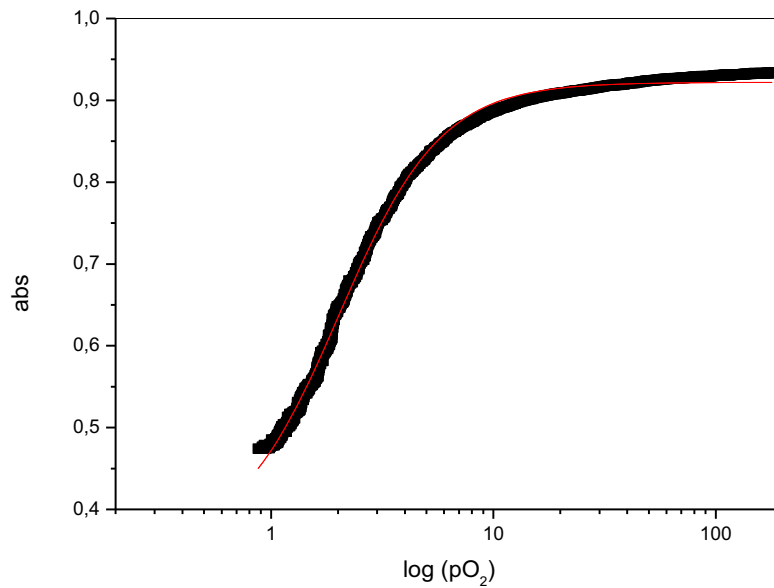


Figura 14: Gráfico de saturação pelo log pO_2 para Hb J Chesapeake, obtido na presença de 10Mm HEPES e 100mM de NaCl.

3.5) Medidas de Osmolaridade

As medidas de efeito de água e cloreto foram obtidas na presença de tampão HEPES-NaOH 10mM, pH 7,2 e concentrações variadas de NaCl e sacarose. A sacarose foi utilizada como soluto neutro para variar a osmolaridade e, portanto a atividade de água da solução.

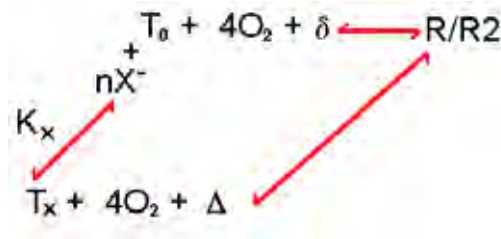
As osmolaridades das soluções contendo Hb (**Osm**) foram determinadas por medidas de depressão do ponto de congelamento da solução, usando um osmômetro Osmette A modelo 5002 (Precision System, Inc.) ou Osmometer (Model 3W2 – Advanced Instruments inc.). Estas determinações se deram após a obtenção das curvas de oxigenação da Hb, para cada condição experimental. O logaritmo da atividade de água foi então calculado através da seguinte relação (Colombo, M. F. & Bonilla-Rodriguez, G. O., 1996):

$$\ln a_w = \frac{\Delta_{\text{fpd}}}{K_f M_w} = \frac{-\text{osm}}{55,5} \quad (12)$$

onde Δ_{fpd} é o decaimento do ponto de congelamento, $K_f = 1,86 \text{ } ^\circ\text{C Kg mol}^{-1}$ é a constante crioscópica quando o solvente é a água, e $M_w = 55,5$ é a molaridade da água pura e **osm** é o valor da osmolaridade.

3.6) Equação do modelo de três estados

Uma vez que a ligação preferencial de ânions ao estado desoxigenado T modula o equilíbrio conformacional desta espécie entre os dois estados alostéricos distintos, T_o e T_x e que a oxigenação da Hb ocorre por dois caminhos de reação relacionados, podemos explicar o modelo de oxigenação da Hb segundo o esquema abaixo (Colombo, M. F. & Seixas, F. A.V., 1999)



onde δ e Δ representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb livre e ligada a ânions, K_x é a constante de dissociação do ânion à desoxi-Hb, e n a estequiometria da ligação.

Portanto, podemos escrever esquematicamente o equilíbrio como:



E, sendo K_x a constante de dissociação da ligação de ânion, podemos escrevê-la da seguinte forma:

$$K = \frac{T_o \cdot X^n}{T_x} \quad (14)$$

Considerando dois estados desoxigenados, temos que:

$$T = T_o + T_x, \quad (15)$$

Assim, em termos de fração:

$$f_{T_o} = \frac{T_o}{T_o + T_x} \quad \text{e} \quad f_{T_x} = \frac{T_x}{T_o + T_x} \quad (16)$$

reescrevendo:

$$T_o = f_{T_o}(T_x + T_o) \quad \text{e} \quad T_x = f_{T_x}(T_x + T_o) \quad (17)$$

Substituindo os termos T_x e T_o por suas respectivas frações, temos agora:

$$K = \frac{f_{T_o}(T_x + T_o) \cdot X^n}{f_{T_x}(T_x + T_o)} \quad (18)$$

após alguns rearranjos temos:

$$\frac{f_{T_x}}{f_{T_o}} = \frac{X^n}{K} \quad (19)$$

ao expressarmos a f_{Tx} como sendo $(1-f_{To})$, temos:

$$\frac{1-f_{To}}{f_{To}} = \frac{X^n}{K} \quad (20)$$

rearranjando temos:

$$1 = f_{To} \left(\frac{X^n}{K} + 1 \right) \quad (21)$$

Podemos definir a constante de dissociação aparente observada por íon X ligado (K_{OBS}^X), a partir de K como se segue:

$$(K_{OBS}^X)^n = K$$

Uma vez que a constante de dissociação K é a constante observada, e as moléculas de X se ligam com a mesma afinidade à proteína, temos que:

$$f_{To} = \frac{1}{1 + \left(\frac{X}{K_{OBS}} \right)^n} \quad (22)$$

Se o Δn_w total observado é dado pelo número de moléculas de água que acompanham a transição To / Tx /R temos:

$$\Delta n_w^{obs} = f_{To} \cdot \delta n_w + f_{Tx} \cdot \Delta n_w \quad (23)$$

Substituindo na equação, temos:

$$\Delta n_w^{obs} = \frac{(\delta_w - \Delta n_w)}{\left[1 + \left(X / K_{obs} \right)^n \right]} + \Delta n_w \quad (24)$$

3.7) Medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Espectros 1D 1H RMN foram coletados utilizando os espectrômetros Bruker Avance DRX-300 e Avance DRX-600 de 300 e 600 MHz. As amostras foram analisadas nos estados CO, desoxigenada e na presença e ausência de IHP (em proporção de 1:5). As ressonâncias observadas em cada estado da Hb seja ele, meta, CO ou desoxigenado são diferentes, desta forma existe um campo magnético onde teremos sensibilidade e resolução ótimas para cada situação. Para as principais ressonâncias encontradas na estrutura desoxigenada o campo magnético ótimo é de 7T ou 300 MHz. Por outro lado, os prótons da molécula quando diamagnética (como das regiões de corrente de anel presentes nas estruturas CO) possuem melhor resolução em campos magnéticos de 600 MHz. Por esta razão nossos experimentos foram obtidos utilizando-se dois espectrômetros com 300MHz e 600MHz (HO, C., 1992).

Estudos de RMN aplicados a proteínas podem ser feitos tanto em meio aquoso quanto em meio deuterado. Quando o meio utilizado é aquoso, a concentração de prótons do solvente é cerca de 110M, enquanto aquela da proteína é de 1mM, ou seja há um excesso de prótons provindos do solvente que se trocam com aqueles da proteína. Para muitos experimentos, as ressonâncias desejadas são exatamente essas, apenas observadas em meio aquoso e é necessário suprimir o sinal do solvente. Muitas técnicas podem ser utilizadas para esta supressão, no caso deste trabalho, utilizamos uma seqüência de pulsos “jump and return”. (PLATEAU, P., & GUERON, M., 1972)

Conforme recomendação da União Internacional da Química Pura e Aplicada, a escala de deslocamento químico foi definida como positiva na região abaixo da ressonância padrão e como negativa acima desta. Utilizamos como ressonância padrão aquela do grupo metil do DSS (2,2 dimetil-2 silapentano 5-sulfonado), sabendo que a ressonância do próton da água está em 4,73 ppm desta, a 29°C. É importante destacar que o deslocamento químico da água varia com a temperatura, em 0,01ppm por grau. Como os experimentos foram feitos nas temperaturas de 29 e 11 graus, em solução aquosa, os experimentos feitos a 11°C foram corrigidos somando-se 0,18 ppm nos espectros.

As amostras de hemoglobina foram concentradas até 6-8 % (3mM/heme) em diferentes tampões, dependendo do experimento planejado e mantidas em ambiente de 100% CO. O volume final foi de ~500µL para garantir um boa relação sinal/ruído. Para as amostras aquosas, 5% de óxido de deutério (D₂O) foram adicionados ao tampão, de forma a manter um sistema de referência para escala de medida espectral. Outras condições experimentais necessitaram de ambiente 100% D₂O. Neste caso a solução tampão foi totalmente congelada, liofilizada e a quantidade volumétrica exata de D₂O foi então adicionada à solução substituindo a água.

Cuidados como a correção do pH ou pD ($pD = pH + 0,4$) além da medição de pH de alíquotas do tampão, para que a solução não entrasse em contato com o eletrodo de pH e conseqüentemente com íons cloreto provenientes da solução KCl, foram tomados. A calibração do espectrômetro de RMN foi feita com Etileno glicol e a temperatura mantida em porta amostra termostatizado.

A Hb foi concentrada em cada tampão específico e depois transformada no estado CO ou desoxigenada, de acordo com cada experimento. Nos casos de solução CO a Hb foi exposta a este gás dentro de uma capela, de forma que não ocorresse contato do gás com o laboratório. No caso de amostra desoxigenada foi repetido o processo descrito na seção 3.2. Em caso de formação de metaHb ou para certificar-se da ausência de oxiHb, foram

adicionados 30 μ L de solução de ditionito sódico a 1M (concentração final de cerca de 0,05M).

Para troca de tampão de uma mesma amostra, esta foi concentrada com o novo tampão até que o valor de pH do tampão descartado em cada concentração fosse igual àquele desejado, indicando o equilíbrio no novo pH.

Ao final do preparo as amostras foram colocadas em tubos específicos de RMN com 5 mm de diâmetro (tampados e vedados), e analisadas no espectrômetro determinado. A checagem de metaHb foi feita verificando presença de picos de ressonância na região entre -30 e - 60 ppm. Após a coleta dos espectros, as amostras foram armazenadas em -20° C e os dados analisados com a ajuda do software XWIN NMR.

IV – RESULTADOS

4.1 – Atividade de água

A afinidade da Hb pelo O_2 é alterada pela atividade de água em solução: ao adicionar solutos neutros, e conseqüentemente diminuir a atividade de água em solução, o equilíbrio alostérico $T \rightleftharpoons R$ desloca-se na direção da estrutura menos hidratada e de menor afinidade pelo oxigênio, a estrutura T. Esse deslocamento causa um aumento na p_{50} , o que pode ser representado pela figura 15.

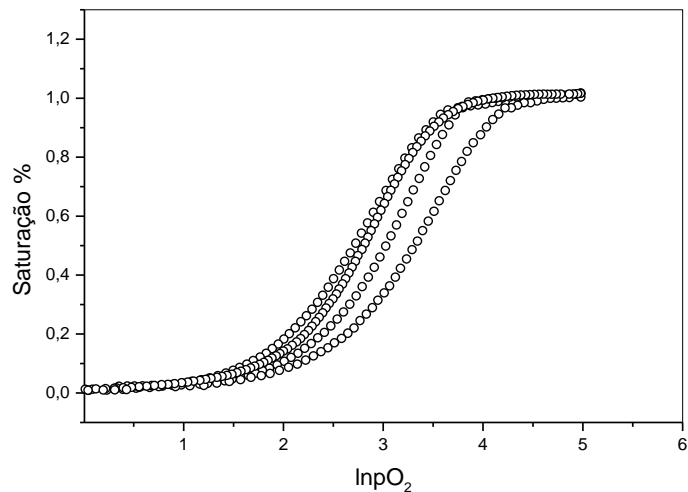


Figura 15 – A figura mostra as curvas de oxigenação obtidas com HbA, em quatro diferentes concentrações de sacarose: da esquerda para direita: 0M, 0,3M, 0,5M e 0,8M. O deslocamento da curva para valores maiores de p_{50} ao aumentar a concentração de sacarose, está associado à diminuição da atividade de água, que desloca o equilíbrio da reação para o estado T. As curvas foram obtidas na presença de tampão HEPES 10mM, a 25°C e pH 7,2.

Para investigar os efeitos da ligação de cloreto no equilíbrio alostérico das Hbs, determinamos o Δn_w de oxigenação em diversas concentrações de cloreto. Em cada concentração de cloreto, realizamos experimentos de variação da concentração de sacarose à concentração de cloreto fixa.

Conforme já estabelecido, a oxigenação da Hb é descrita dependendo da presença de ânions na solução. No caso de presença de cloreto, a HbA vai do estado Tx para o estado R ligando cerca de 70 moléculas de água; já na ausência de cloreto, a Hb vai do estado To para o estado R, ligando cerca de 25 moléculas de água. (COLOMBO, M. F. & SEIXAS, F.A.V., 1999)

A partir destes resultados, chegou-se ao modelo de três estados que descreve a oxigenação da HbA, detalhado na Introdução. Neste trabalho, refizemos os experimentos de variação da atividade de água em função da concentração de cloreto em solução. Os resultados, mostrados na figura 16, confirmam os anteriores: na ausência de cloreto o valor de Δn_w encontrado foi $24 (\pm 3)$, na presença de 50mM de cloreto, é $36 (\pm 4)$ e na presença de 100 mM de cloreto este valor sobe para $69 (\pm 5)$.

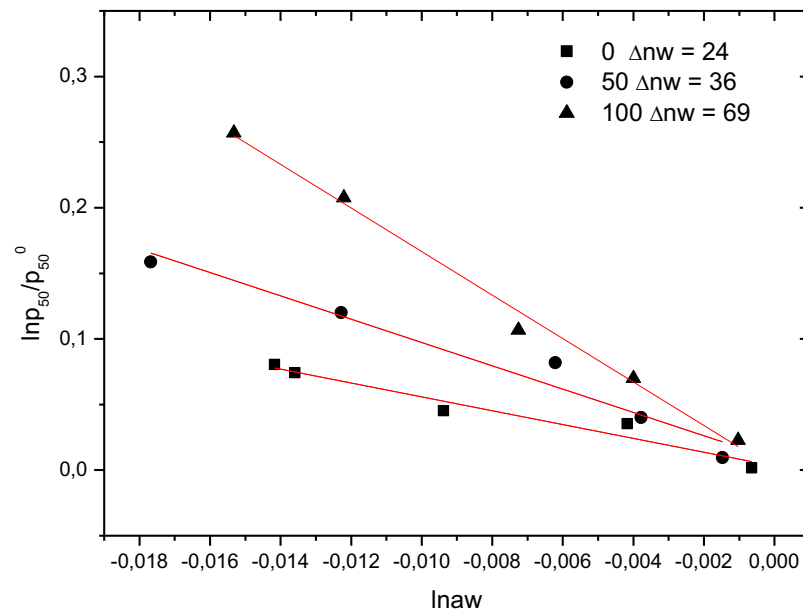


Figura 16: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função da atividade de água para HbA. Os dados foram obtidos em três diferentes concentrações de cloreto: 0(■) , 50(●) e 100Mm(▲). A inclinação de cada reta indica o número de moléculas de água para cada condição, respectivamente $24 (\pm 3)$, $36 (\pm 4)$ e $69 (\pm 5)$. Dados obtidos em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C.

Uma grande variação no valor de Δn_w para diferentes concentrações de cloreto, foi observado para a Hb desArg, o que nos levou em um primeiro momento, a descartar o sítio Arg141 como específico de ligação ao cloreto (TOSQUI,P. , 2005). Da mesma maneira que fizemos para a HbA, re-analisamos a Hb desArg. Novamente o mesmo comportamento foi observado: na ausência de ânions o valor de Δn_w medido foi $36 (\pm 3)$, com 50mM o valor medido foi $56 (\pm 4)$ e na presença de 100mM este valor subiu para $69 (\pm 4)$. A figura 17 demonstra estes resultados.

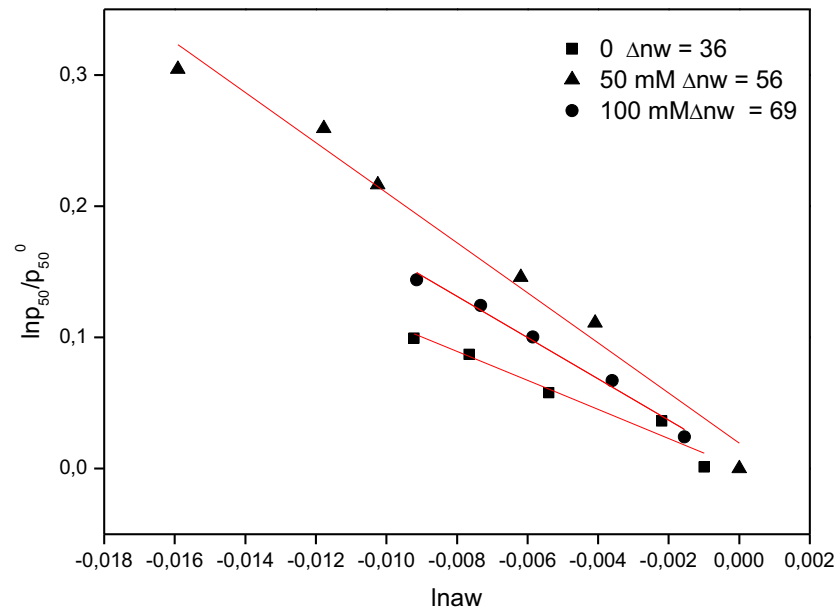


Figura 17: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função da atividade de água para Hb desArg. Os dados foram obtidos em três diferentes concentrações de cloreto: 0 (■), 50 (●) e 100 mM (▲). A inclinação de cada reta indica o número de moléculas de água para cada condição, respectivamente 36 (± 3), 56 (± 4) e 69 (± 4). Dados obtidos em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C.

Podemos observar que os valores de HbA e Hb desArg mostram uma grande variação de moléculas de água, dependentes da concentração de cloreto, confirmando os valores obtidos anteriormente. (COLOMBO, M .F. & SEIXAS, F.A.V., 1999 e TOSQUI, P., 2005)

Além da Arg 141 α o outro possível sítio de ligação para o cloreto seria a Arg 92 α . Levando nossas suspeitas para este resíduo, o que esperaríamos é que para as Hbs com mutações nesta posição não existiria o estado Tx na presença de cloreto. Neste caso, o equilíbrio tanto na ausência como na presença de cloreto deveria ser descrito pela relação To \rightarrow R e o número de moléculas de água que acompanharia esta oxigenação deveria ser aquele parecido com o da HbA na ausência de cloreto, ou seja ~25 moléculas de água.

Para investigar essa hipótese realizamos medidas de efeito de água e cloreto para as Hbs modificadas, da mesma maneira que fizemos com a HbA. A figura 18 mostra o gráfico de $\ln(p_{50})$ em função de $\ln(aw)$ obtido nas concentrações de 0, 50 e 100 mM de cloreto em tampão HEPES 10 mM, pH=7,2 e 25°C para a Hb Chesapeake, mutante da Arg 92.

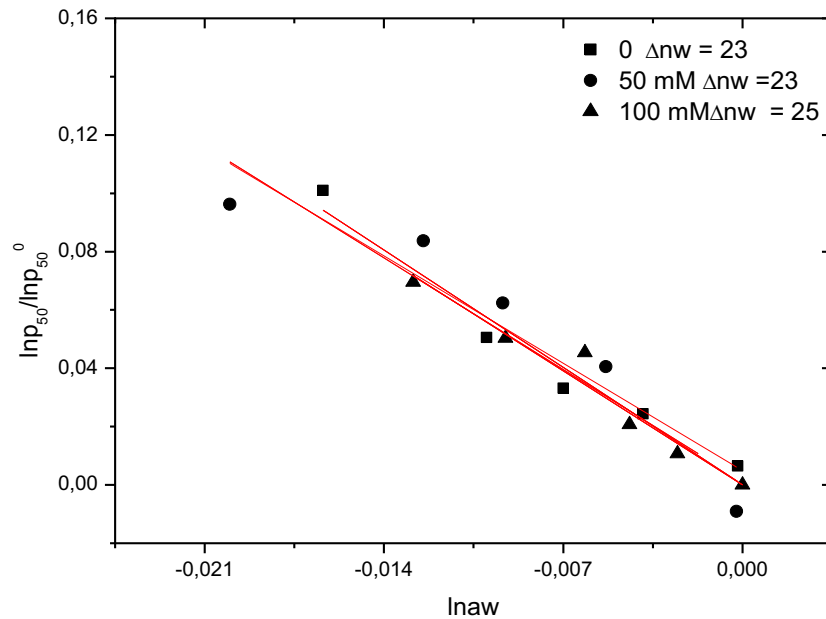


Figura 18: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função da atividade de água para a Hb Chesapeake. Os dados foram obtidos em três diferentes concentrações de cloreto: 0(■), 50(●) e 100mM(▲). A inclinação de cada reta indica o número de moléculas de água para cada condição, respectivamente 23 (± 5), 23, (± 5) e 25 (± 3). Dados obtidos em tampão HEPES, pH7,2 a 25°C.

É possível observar pelo gráfico a diferença no comportamento desta Hb em relação a HbA e Hb desArg. Nota-se que o valor de $\ln(p_{50})$ varia linearmente com o $\ln(a_w)$, nas diferentes concentrações de NaCl. As inclinações dos dados fornecem os valores de Δn_w que acompanham a oxigenação da Hb Chesapeake. Para as três condições este valor é, dentro do erro, muito próximo: cerca de 23 (± 5), moléculas de água na ausência de cloreto, na presença de 50mM de cloreto o valor é 23 (± 5) e na presença de 100mM de cloreto o valor se mantém em 25 (± 3).

Estes resultados mostram evidências que a Arg 92 estaria envolvida na ligação de cloreto à Hb. Assim, estendemos a investigação ao sítio Arg 92, realizando medidas de variação de hidratação em função da atividade de cloreto à outras duas Hbs mutantes desta posição: a Hb J Cape Town e a rHb Chesapeake desArg. Se as suspeitas sobre o resíduo Arg 92 funcionar como um sítio de ligação específico de cloreto estiverem corretas, para essas duas Hbs devemos novamente observar a ausência do efeito deste ânion, demonstrado pela não variação do Δn_w .

A figura 19 traz os resultados medidos para a Hb J Cape Town. O valor de Δn_w medido na ausência de cloreto é 22 (± 2), na presença de 50mM 23 ($\pm 2,5$) e na presença de 100 mM é 25 (± 2).

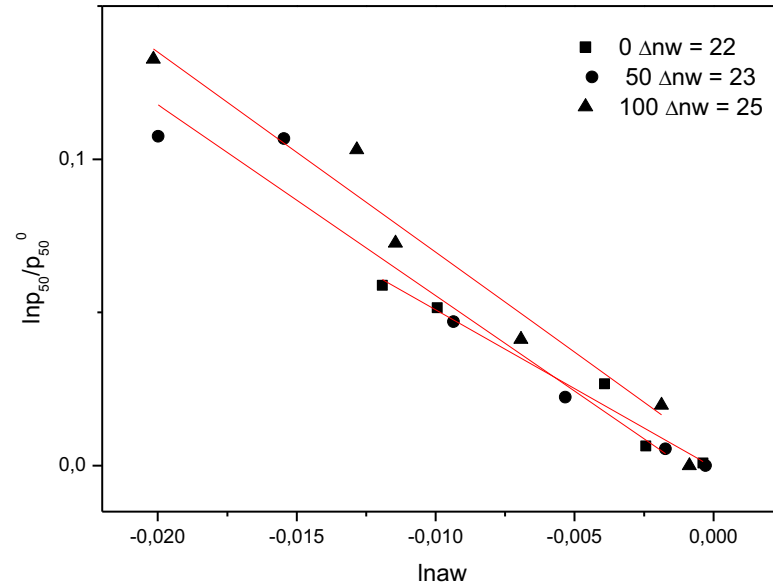


Figura 19: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função da atividade de água para a Hb J Cape Town. Os dados foram obtidos em três diferentes concentrações de cloreto: 0 (■), 50 (●) e 100mM (▲). A inclinação de cada reta indica o número de moléculas de água para cada condição, respectivamente 22(± 2), 23, ($\pm 2,5$) e 25(± 2). Dados obtidos em tampão HEPES, pH7,2 a 25°C.

Da mesma maneira que a Hb Chesapeake, a Hb J Cape Town também não apresentou diferença no valor de Δn_w na presença ou ausência de cloreto, reforçando a hipótese do sítio Arg 92 como responsável pela ligação de cloreto.

Medidas com a Hb de mutação dupla, a rHb Chesapeake desArg foram realizadas com o intuito de comparar a contribuição dos dois sítios. Os resultados de variação de hidratação em função da concentração de cloreto estão na figura 20.

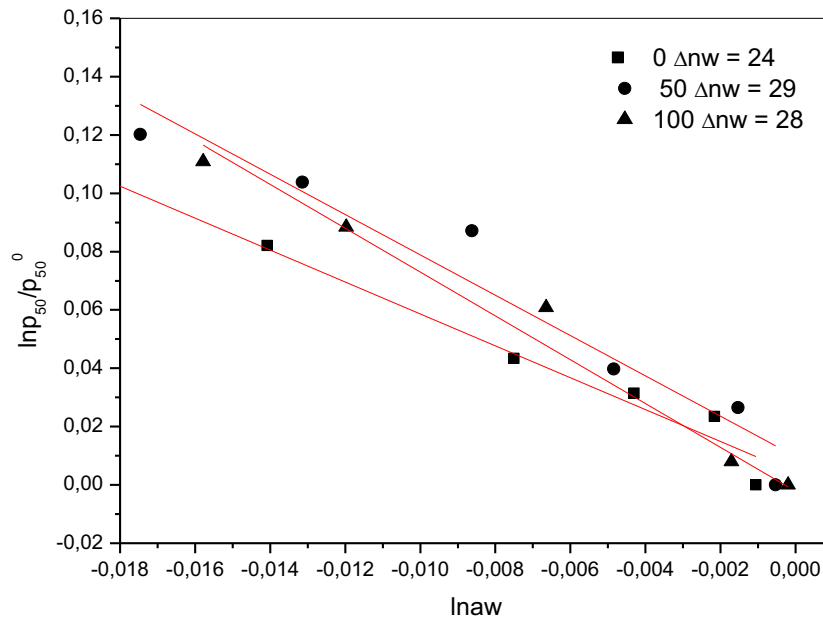


Figura 20: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função da atividade de água para a rHb Chesapeake desArg. Os dados foram obtidos em três diferentes concentrações de cloreto: 0 (■), 50 (●) e 100 mM (▲). A inclinação de cada reta indica o número de moléculas de água para cada condição, respectivamente 24 ($\pm 2,5$), 29 (± 3) e 28 (± 3). Dados obtidos em tampão HEPES, pH 7,2 a 25°C.

Assim como as demais mutantes da posição Arg 92, a Hb Chesapeake desArg também não mostrou variação significativa do valor de Δn_w . Este valor na ausência de cloreto é 24 ($\pm 2,5$), na presença de 50 mM de cloreto é 29 (± 3) e na presença de 100 mM de cloreto fica em 28 (± 3).

A figura 21 mostra os dados de todas as Hbs estudadas neste trabalho e o número de moléculas de água calculado para cada uma, a partir da inclinação de $\ln(p_{50})$ em função de $\ln(a_w)$ na ausência de cloreto. As inclinações fornecem o número de moléculas de água que acompanha a oxigenação para cada condição, que dentro do erro, permanece em torno de 25 moléculas de água.

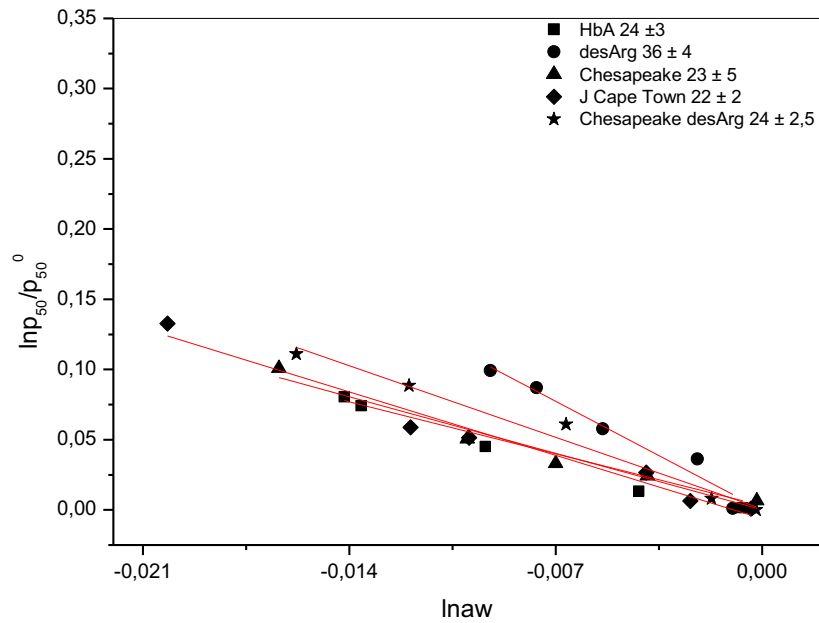


Figura 21: Resultados obtidos na ausência de cloreto para a HbA e demais Hbs. A inclinação fornece o valor de Δn_w para cada espécie, que fica, dentro do erro, em torno de 25. Dados obtidos na presença de tampão HEPES 10mM, pH 7,2 e 25°C.

Para resumir os resultados obtidos na presença de cloreto, a figura 22 mostra os dados de todas as Hbs estudadas neste trabalho e o número de moléculas de água calculado para cada uma, a partir da inclinação de $\ln(p_{50})$ em função de $\ln(a_w)$ na presença de 100mM de NaCl. As inclinações fornecem o número de moléculas de água que acompanha a oxigenação para cada condição.

Observamos que na presença de cloreto a HbA e desArg possuem inclinações muito diferentes daquelas na ausência de cloreto (figura 21), indicando a diferença de hidratação nessas duas condições. Já as Hbs Chesapeake, rHb Chesapeake desArg e J-Cape Town, ou seja, as mutantes da Arg 92 possuem na presença de cloreto inclinações muito próximas àquelas sem cloreto. Podemos observar que esses mutantes têm na presença de cloreto o comportamento semelhante àquele sem cloreto.

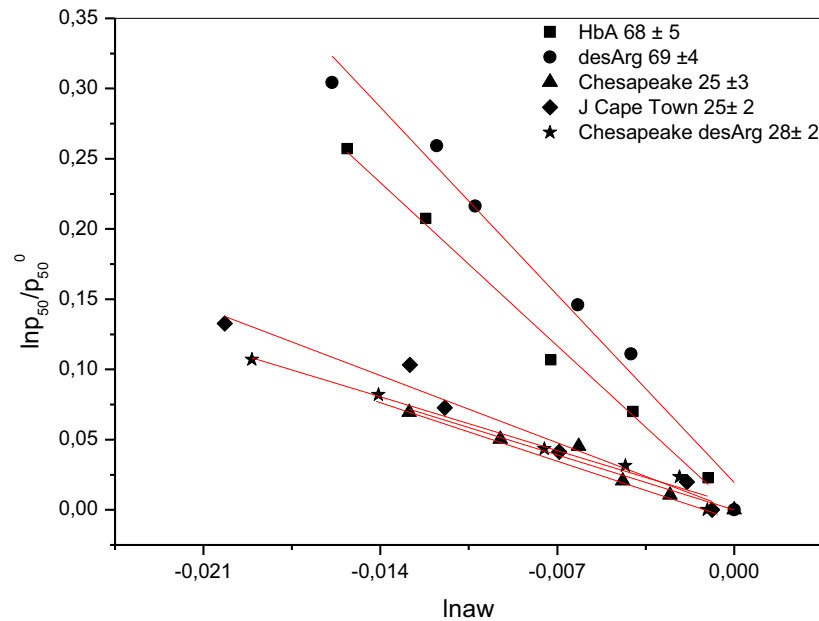


Figura 22: Resultados obtidos na presença de tampão HEPES 10 mM e 100mM de cloreto para a HbA e demais Hbs. A inclinação para as Hbs Chesapeake, J Cape Town e Chesapeake desArg fica em torno de 25. Já a HbA e a Hb desArg na presença de 100mM de cloreto tem a inclinação em torno de 70.

A caracterização total da mudança de Δn_w em função do efeito de cloreto, foi observada para a HbA por Colombo e Seixas (COLOMBO, M.F. & SEIXAS, F.A.V., 1999). Os autores encontraram que o valor de Δn_w aumenta com o aumento da concentração de cloreto partindo de 25 até alcançar 70 moléculas de água. A partir desta concentração, o Δn_w em 70 moléculas de água permanece constante.

A figura 23 mostra o gráfico dos valores de Δn_w de oxigenação da Hb humana em função da concentração de NaCl. A linha contínua passando pelos pontos experimentais representa o melhor ajuste da equação 24, derivada do modelo de três estados alostéricos da Hb: To, Tx e R, aos dados experimentais.

Os parâmetros do ajuste desta equação são: K_x , a constante de dissociação do íon cloreto ao estado T da Hb, e n a estequiometria da ligação. Para a HbA os valores de $K_x=10\text{mM}$ e $n=1,9$. O valor de n é um valor representativo, semelhante ao n_{50} , indicando um número aparente de íons cloreto ligado à Hb.

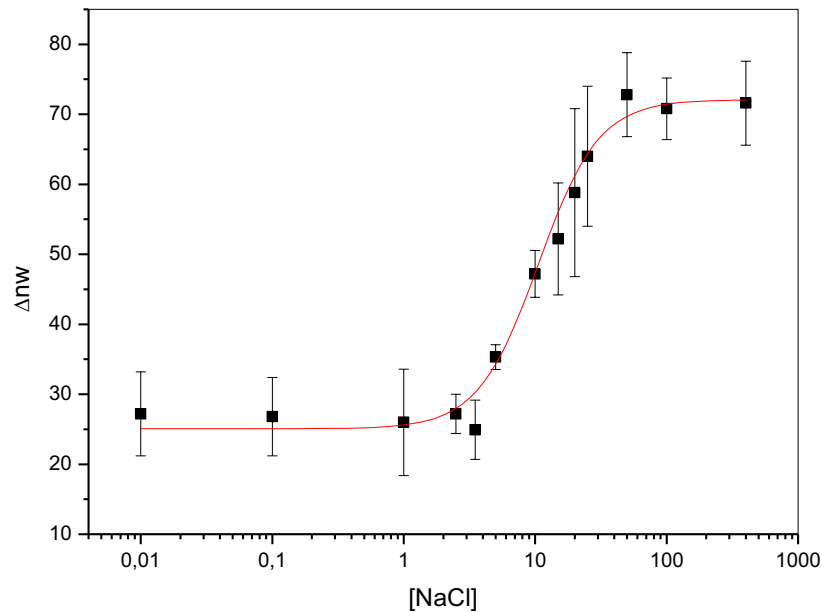


Figura 23: Gráfico da mudança de hidratação que acompanha a oxigenação da Hb A em 10 mM HEPES, pH 7.2, em função do logaritmo da concentração de cloreto. A linha representa o melhor ajuste de eq 24 (reproduzida da tese de doutorado de SEIXAS, F.A.V. 2002)

Para caracterizar a variação de Δn_w das Hbs estudadas, colocamos em um gráfico a variação de Δn_w em função da concentração de cloreto. Notamos que o comportamento das Hbs Chesapeake, Chesapeake desArg e J Cape-Town, ou seja, aquelas que não possuem uma arginina na posição 92 alfa, não podem ser ajustadas a esse modelo. Já a Hb desArg possui uma variação sigmoide do número de moléculas de água associadas a oxigenação em função do aumento da concentração de cloreto, conforme observado para a Hb humana.

A Hb desArg pode ser ajustada pelo modelo de três estados, assim como a HbA. A linha que passa pelos pontos representa o ajuste da equação 24 aos pontos e fornece os valores de $K_x = 15$ mM e o valor de $n = 1,7$, para esta Hb, próximos aqueles medidos para a HbA.

A figura 24 demonstra um gráfico do número de moléculas de água que acompanha a oxigenação das Hbs mutantes estudadas neste trabalho.

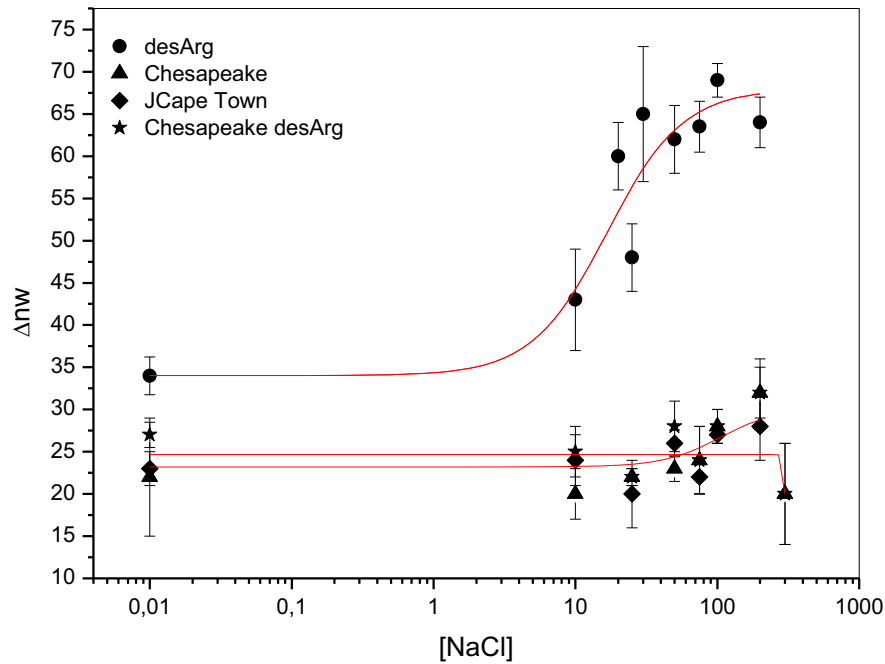


Figura 24: Gráfico da mudança de hidratação que acompanha a oxigenação das Hbs modificadas estudadas no trabalho em 10 mM HEPES, pH 7,2, em função do logaritmo da concentração de cloreto. A linha representa o melhor ajuste de eq 24. A Hb desArg se ajusta ao modelo, porém as Hbs Chesapeake, Chesapeake desArg e J Cape Town não podem ser ajustadas.

A tabela 1 compara o número de moléculas de água que se liga a cada Hb na transição oxi e desoxi na ausência e na presença de 100 mM de cloreto, encontrados neste trabalho.

Quadro 1: Número de moléculas de água que acompanha a oxigenação de cada Hb na presença e na ausência de cloreto.

Hb	NaCl mM	
	0	100
HbA	24 ± 3	68 ± 5
desArg	36 ± 4	69 ± 4
Chesapeake	23 ± 5	25 ± 3
J Cape Town	22 ± 2	25 ± 3
Chesapeake desArg	24 ± 2,5	28 ± 3

4.2) Efeito Bohr

4.2.1) Efeito Bohr em função da concentração de cloreto

Da mesma forma como acontece com o número de moléculas de água que se ligam na transição oxi-desoxi, o número de prótons liberados pela HbA durante a oxigenação da proteína varia com a concentração de cloreto em solução. É conhecido que o número de prótons liberado na oxigenação da Hb na ausência de cloreto é ~ 1 enquanto que na presença de 100mM de cloreto esse número sobe para ~ 2 . (VAN BEEK, G.G.M., et.al, 1979).

Nossos resultados, em concordância com a literatura, mostraram que em tampão HEPES 10mM, no pH entre 6,5 a 7,5 na ausência de cloreto fornece ~ 1 prótons e na presença de 0,1M de cloreto este número é ~ 2 .

Os valores de p_{50} e n_{50} foram determinados nas várias condições e os dados obtidos, analisados a partir de gráficos de $\log(p_{50})$ versus pH. Estes valores apresentados no gráfico a seguir, provém da média entre os valores obtido pelo ajuste logístico das medidas realizadas no hemox e pelos valores obtidos através do gráfico de Hill das medidas de tonometria.

A figura 25 mostra esses resultados

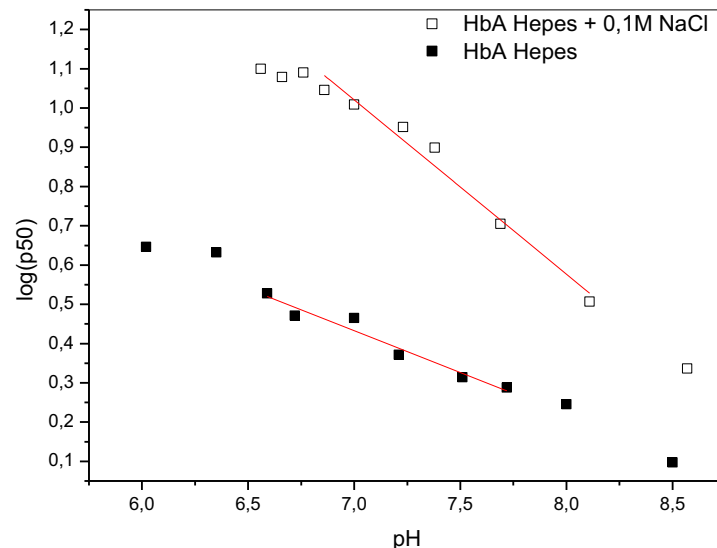


Figura 25: Resultados obtidos na ausência (■) e presença de 0,1M (□) de NaCl para HbA. O valor da inclinação, fornece o número de prótons liberados na transição oxi-desoxi: na ausência de cloreto é de 0,90 e na presença de 100mM de NaCl é 1,9.

A influência de cloreto no efeito Bohr das Hbs mutantes estudadas neste trabalho, foi determinada em tampão HEPES 10mM na ausência de ânions e na presença de 100mM de NaCl. A figura 26 mostra o gráfico de $\log(p_{50}/p_{50}^0)$ versus pH obtidos na ausência de cloreto para todas as Hbs estudadas.

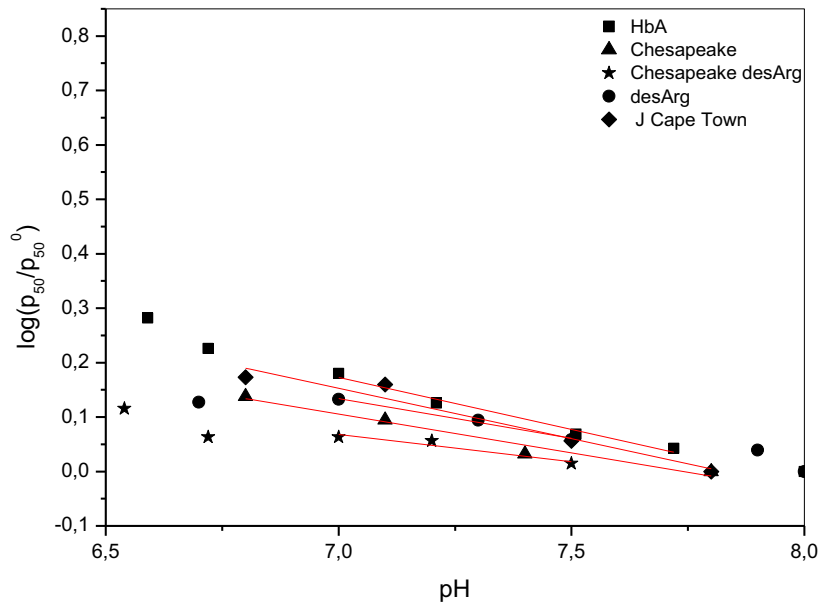


Figura 26: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função de pH para as Hbs estudadas. Resultados obtidos na ausência de NaCl, em tampão HEPES 10Mm, diversos pHs e 25°C. O valor da inclinação, na ausência de cloreto, ficou próximo de 1.

A figura 27 traz o $\log(p_{50})$ versus pH na presença de 0,1M de cloreto. Nesta condição o valor de prótons liberado pela HbA é ~ 2 . Os resultados mostram que para as demais Hbs o valor de prótons liberado permanece em torno de 1.

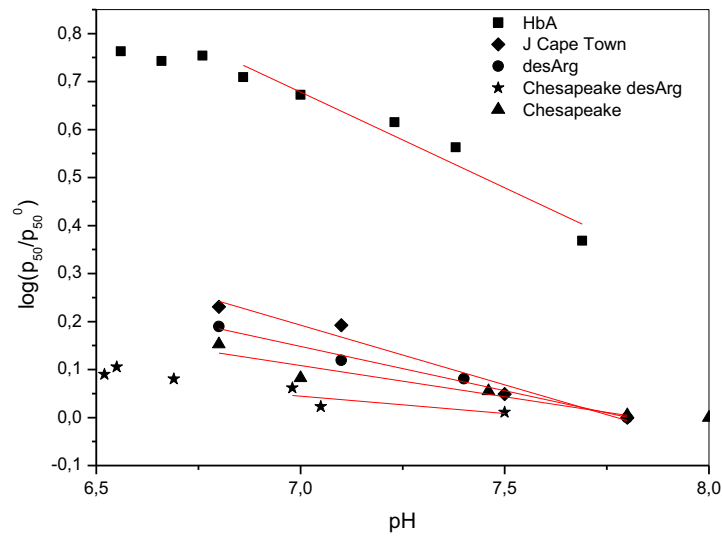


Figura 27: Gráfico de $\ln p_{50}/p_{50}^0$ em função do pH para as Hbs estudadas. Resultados obtidos em tampão HEPES 10Mm + 100Mm NaCl, diversos pHs e 25°C. O valor da inclinação, na presença de cloreto para as Hbs modificadas ficou próximo de 1, enquanto a HbA fica em torno de 2.

O número de prótons liberados na oxigenação das Hbs esta descrito no quadro 2.

QUADRO 2: Resultados de Efeito Bohr

Hb	[NaCl] mM	
	0	100
HbA	0,90 ($\pm 0,05$)	1,90 ($\pm 0,03$)
Chesapeake	0,90 ($\pm 0,03$)	0,80 ($\pm 0,03$)
Chesapeake desArg	0,80 ($\pm 0,06$)	0,76 ($\pm 0,01$)
J Cape Town	1,08 ($\pm 0,02$)	0,96 ($\pm 0,04$)
desArg	1,00 ($\pm 0,08$)	1,12 ($\pm 0,04$)

Como observado na tabela 2, a adição de cloreto às Hbs desArg, J-Cape Town, Chesapeake e rHb Chesapeake desArg não altera o número de prótons liberados na oxigenação, sendo para as Hbs modificadas $\sim 1\text{H}^+$. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos a partir da variação de hidratação, demonstrados no item 4.1. Neste item mostrou-se que o Δn_w para as Hbs que perdem o resíduo Arg 92 fica em torno de 25 na ausência e presença de 100 mM de sal. O valor de Δn_w de oxigenação para a HbA e Hb desArg aumenta para ~ 70 moléculas, com a ligação de cloreto. Este resultado é interpretado como indicativo que a Arg 92 é sítio específico de ligação de cloreto, que quando ocorre altera a conformação alostérica desoxigenada T_0 para T_x .

Se o sítio de ligação de cloreto está localizado na Arg 92, com a perda deste resíduo, esperamos que o número de prótons na presença e ausência de cloreto, não se modifique, de fato, isso acontece. No entanto, a Hb desArg também apresenta este mesmo comportamento, diferindo do que acontece nos experimentos de variação de hidratação. Este resultado sugere um papel exercido pelo resíduo 141α no efeito Bohr na presença de cloreto.

A cooperatividade da ligação de oxigênio também foi estudada, medida pelos valores de n_{50} . Para todas as Hbs modificadas, não há mudança na cooperatividade na presença de cloreto. A HbA tem a cooperatividade um pouco aumentada na presença de cloreto. Estes resultados estão demonstrados na figura 28.

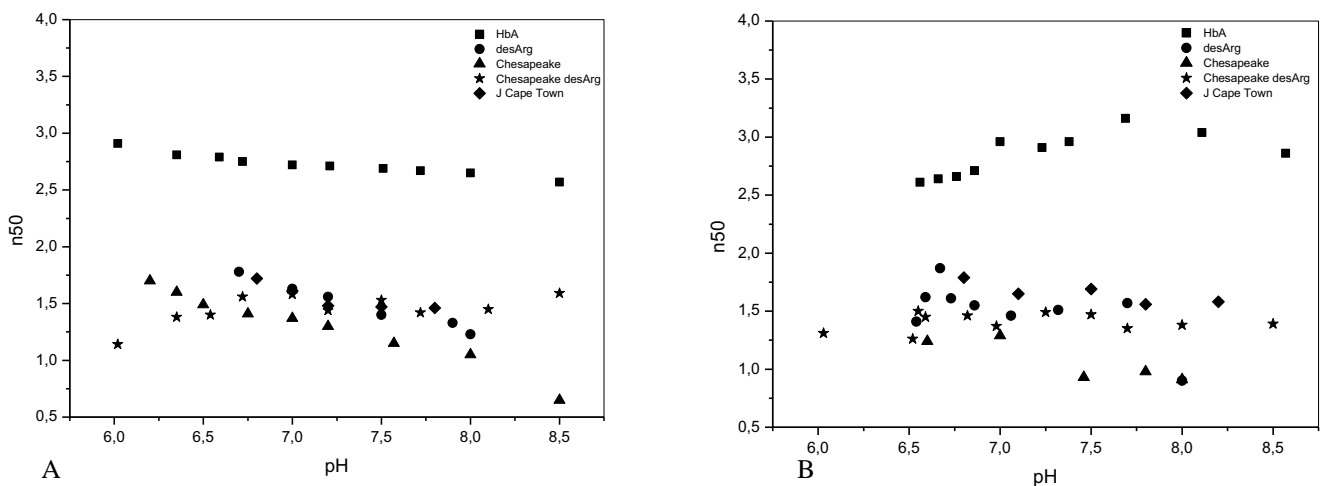


Figura 28: Resultados de n_{50} obtidos em experimentos de variação de pH, para todas as Hbs estudadas em tampão HEPES 10Mm na ausência (A) e na presença de 100 mM de NaCl (B)

As Hbs estudadas apresentam valor de n_{50} entre 1 e 2, sendo menores que aqueles medidos para a HbA tanto na ausência quanto na presença de cloreto. No entanto as substituições de aminoácido influenciam neste valor: quando comparamos os valores de n_{50} da Hb Chesapeake e J Cape Town, notamos que os valores de n_{50} medidos para a Hb J Cape Town estão entre aqueles medidos para a Hb Chesapeake e HbA.

4.2.2) Estudo de IHP

A presença de IHP estabiliza a Hb no estado de menor afinidade ao oxigênio, o estado T, conseqüentemente os valores de p_{50} aumentam nessas condições. Na figura 29, mostramos os valores medidos para a HbA em tampão fosfato de sódio 0,1 M na presença e ausência de IHP. Notamos que na presença de IHP os valores de p_{50} , aqui representados em log, aumentam consideravelmente.

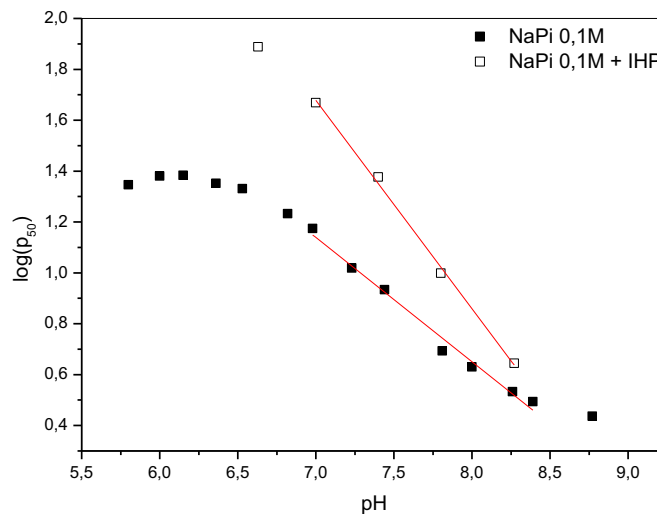


Figura 29: Gráfico de $\log(p_{50})$ em função de pH da HbA a concentração de $80\mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio 0,1M na ausência (■) e presença de 4 mM de IHP (□). Notamos que os valores absolutos de p_{50} aumentam consideravelmente na presença de IHP, indicando sua menor afinidade ao oxigênio nesta condição.

Hemoglobinas de alta afinidade terão o valor de p_{50} menor que aqueles encontrados para Hbs de baixa afinidade, pois é necessária uma pressão de oxigênio menor para saturar a proteína. No caso deste trabalho, todas as Hbs possuem afinidade maior que a HbA em todas as condições estudadas e conseqüentemente, valores de p_{50} menores, assim como índices de cooperatividade, medidos por n_{50} menores que aqueles encontrados pra HbA.

Para testar a resposta ao IHP, as Hbs modificadas também foram medidas na presença deste ânion. Da mesma maneira que acontece com a HbA, a presença de IHP em solução aumentou o valor de p_{50} dessas proteínas.

A figura 30 mostra o gráfico dos valores medidos para a Hb Chesapeake em tampão fosfato de sódio 0,1 M, diversos pHs, na ausência de ânions e na presença de 0,1 M de cloreto e de 4mM IHP.

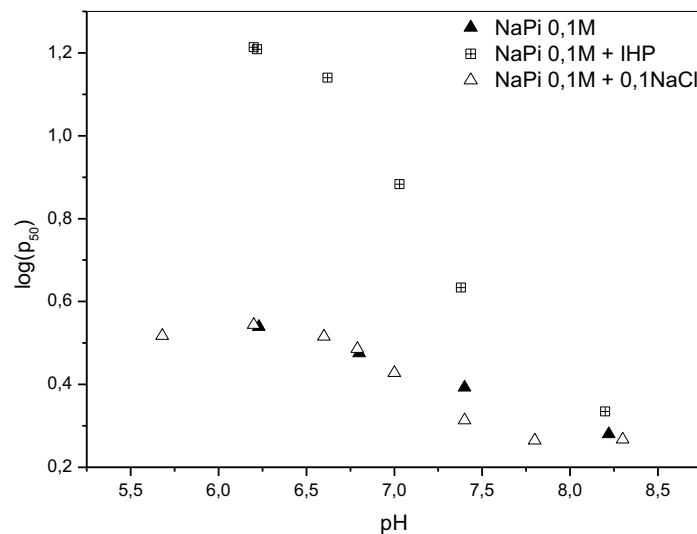
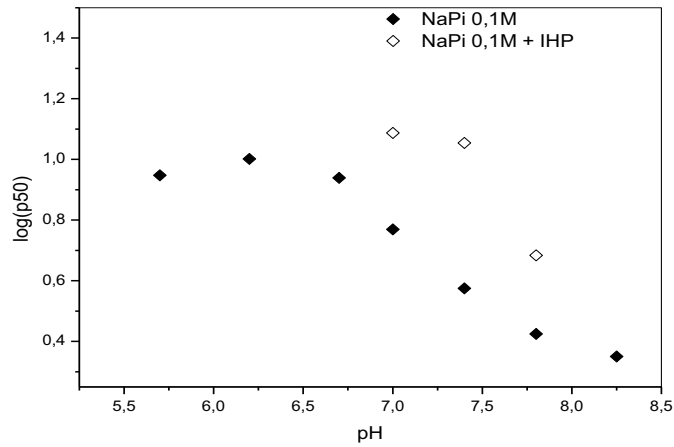


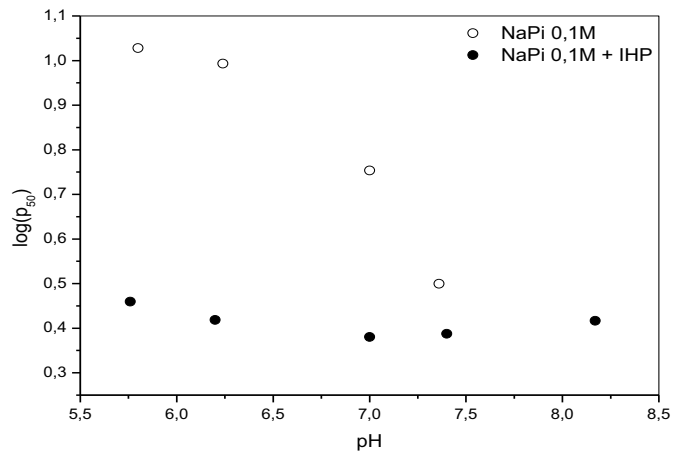
Figura 30: Gráfico de $\log(p_{50})$ em função de pH da Hb Chesapeake à concentração de $80\mu\text{M}$ em tampão fosfato de sódio na ausência (\blacktriangle), na presença de 100mM de NaCl (\triangle) e na presença de 4 mM de IHP (\square). Notamos que os valores absolutos de p_{50} aumentam consideravelmente na presença de IHP, indicando sua menor afinidade ao oxigênio nesta condição, já os valores na presença e ausência de NaCl variam muito pouco.

Notamos que a Hb Chesapeake também tem o valor de p_{50} aumentado na presença de IHP. Notamos que a presença de cloreto não altera significativamente os valores de p_{50} medidos nas duas condições (presença e ausência de cloreto: triângulos abertos e fechados, respectivamente).

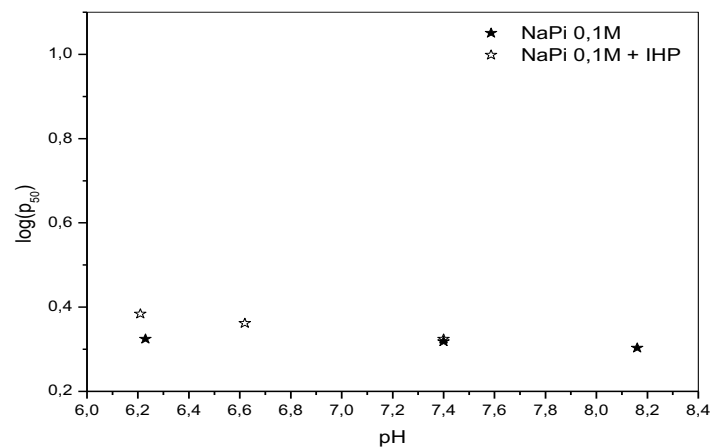
O efeito Bohr das demais Hbs (J Cape Town, Chesapeake desArg e desArg) em tampão fosfato e IHP foi observado, conforme demonstrado na figura 31. Podemos observar que os valores de p_{50} absolutos aumentam para todas as Hbs quando na presença deste ânion, sendo este aumento considerável para as Hbs J Cape Town e desArg. No caso da Hb Chesapeake desArg, não há uma resposta considerável à presença de IHP.



A



B



C

Figura 31: Gráfico de log (p50) em função de pH em tampão fosfato de sódio 0,1M, diversos pH, (símbolos fechados) e fosfato de sódio 0,1M + 4mM de IHP (símbolos abertos). Notamos que os valores absolutos de p_{50} aumentam consideravelmente na presença de IHP, indicando sua menor afinidade ao oxigênio nesta condição, para as Hbs J Cape Town e desArg. Em **A** Hb J Cape Town, em **B** Hb desArg e em **C** Hb Chesapeake desArg

4.3) Aspectos estruturais das Hbs obtidos por RMN

As medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram estudadas em diversas condições, dependendo do objetivo de cada experimento. Todas as Hbs foram estudadas em tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 6,5 e 7 nas condições desoxigenadas e ligadas a CO. As medidas no estado CO foram feitas na ausência e na presença de IHP (em concentração 5 vezes maior que aquela de Hb) e nas temperaturas de 29° C e 11°C. A referência utilizada para todas as medidas é o DSS, estando a água a 4,73 ppm deste, conforme detalhado na seção de Materiais e Métodos.

É importante ressaltar que nestas medidas a estrutura Tx estaria estabilizada, já que os íons fosfato estabilizam esta conformação. Assim, para estes resultados notamos as modificações estruturais provindas das mutações de cada resíduo.

4.3.1) Estado Desoxigenado

A) *Histidinas Proximais*

No estado desoxigenado, a primeira região que observamos nas proteínas está entre 50 e 90 ppm, onde se localizam as ressonâncias das histidinas proximais. Esses prótons amídicos N_δH, na HbA, em água e a 29°C apresentam o pico de ressonância em 75 ppm para a histidina β92 e 63,5 ppm para a histidina α87, considerando como referência o DSS (TAKAHASHI, S & HO, C., 1980, LA MAR et.al 1977) . Estas histidinas estão relacionadas com o heme, conforme descrito na Introdução. A figura 32 mostra os espectros medidos nesta região, em fosfato de sódio 0,1M nos pHs 7 e 6,5.

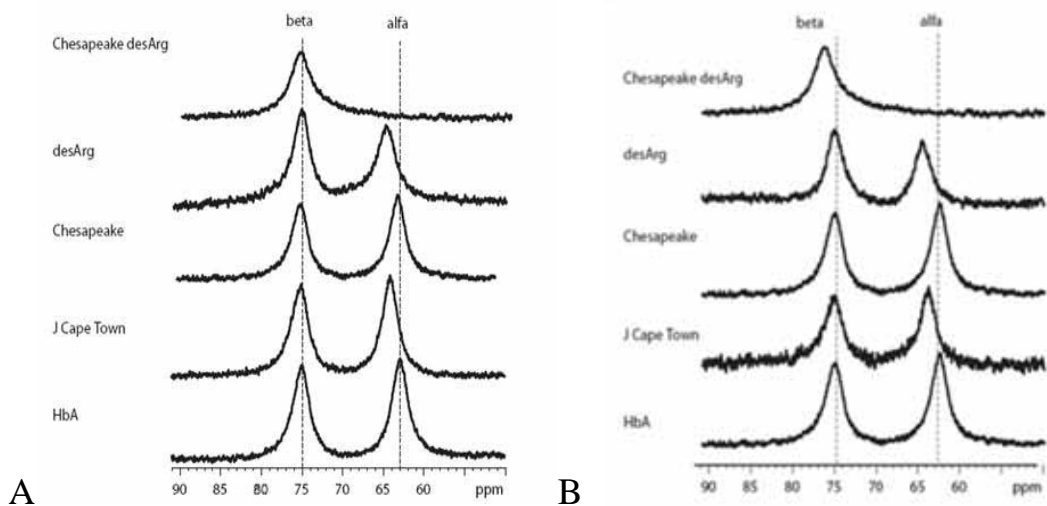


Figura 32: Espectros de RMN das Hbs estudadas. A região entre 50 e 90 ppm, contém os picos de ressonância das histidinas proximais. A ressonância em $\sim 63,5$ ppm representa a alfa 92 histidina e a $\sim 74,9$ ppm representa a histidina beta 67. Em **A** as leituras feitas em tampão fosfato 0,1M pH 7 e em **B** no mesmo tampão em pH 6,5, estado desoxigenado e espectrômetro de 300 MHz.

As Hbs J Cape Town, Chesapeake e desArg não apresentam nenhuma diferença na ressonância da histidina beta, mostrando que não há nenhuma perturbação no ambiente desta histidina, em relação a HbA. Já para a histidina alfa existe uma pequena migração em cerca de 1,5 ppm, para as Hbs J-Cape Town e desArg. Essa modificação, menor que 2 ppm, pode significar uma acomodação da proteína dada pela modificação na sua seqüência de aminoácidos e não necessariamente uma perturbação nesta região. (TSAY, C.H. et.al, 1999). Para as proteínas HbA, Hb Chesapeake, Hb J-Cape Town e Hb desArg não há diferença devido a alteração de pH.

A Hb Chesapeake desArg apresenta apenas uma ressonância nesta região. Esta ressonância pode significar o deslocamento da ressonância da histidina alfa para a posição da histidina beta. Uma indicação deste deslocamento está no fato de, em CO, essas ressonâncias estarem novamente separadas e a altura do pico de ressonância da histidina alfa ser menor neste estado que naquele desoxigenado. No entanto, no estado CO não permite uma boa observação desta região (dados não apresentados). De qualquer forma, para esta Hb existe uma grande perturbação na estrutura na região que acomoda estas histidinas, próximas ao bolsão do heme. Além disso, para a Hb Chesapeake desArg, essa ressonância única em pH 6,5 está deslocada daquela em pH 7, mostrando uma certa influência do pH.

B) Hiperfinas E Prótons Intercambiadores

Na região compreendida entre 26 e 11 ppm se encontram as ressonâncias chamadas hiperfinas e dos prótons amídicos intercambiadores. Na região das hiperfinas (apenas considerado entre 24 e 16 ppm) encontramos picos alfa e beta e podemos identificar comunicações entre as cadeias alfa e beta. O pico a 22,5 ppm é o maior pico de prótons da cadeia beta, enquanto que o pico a 17 ppm é aquele provindo de prótons da cadeia alfa. Entre esses dois picos temos picos que representam a cadeia alfa e a cadeia beta, porém essas ressonâncias não possuem um resíduo específico determinado ligado a elas. (TAKAHASHI, et.al, 1980).

Para as Hbs mutantes, as espécies J-Cape Town e Chesapeake possuem as ressonâncias alfa e beta levemente deslocadas em relação àquelas encontradas para a HbA. A Hb desArg possui um alargamento dos picos tendo a ressonância alfa deslocada a direita das demais. Repetindo o padrão de estrutura instável medido para as histidinas, a Hb Chesapeake desArg possui grande modificação no espectro desta região. Para nenhuma Hb há modificação devida ao pH: tanto para medidas em pH 6,5 e 7 as ressonâncias se apresentam iguais. A figura 33 traz os espectros obtidos nesta região em tampão fosfato de sódio em pHs 7 e 6,5 para todas as Hbs estudadas neste trabalho.

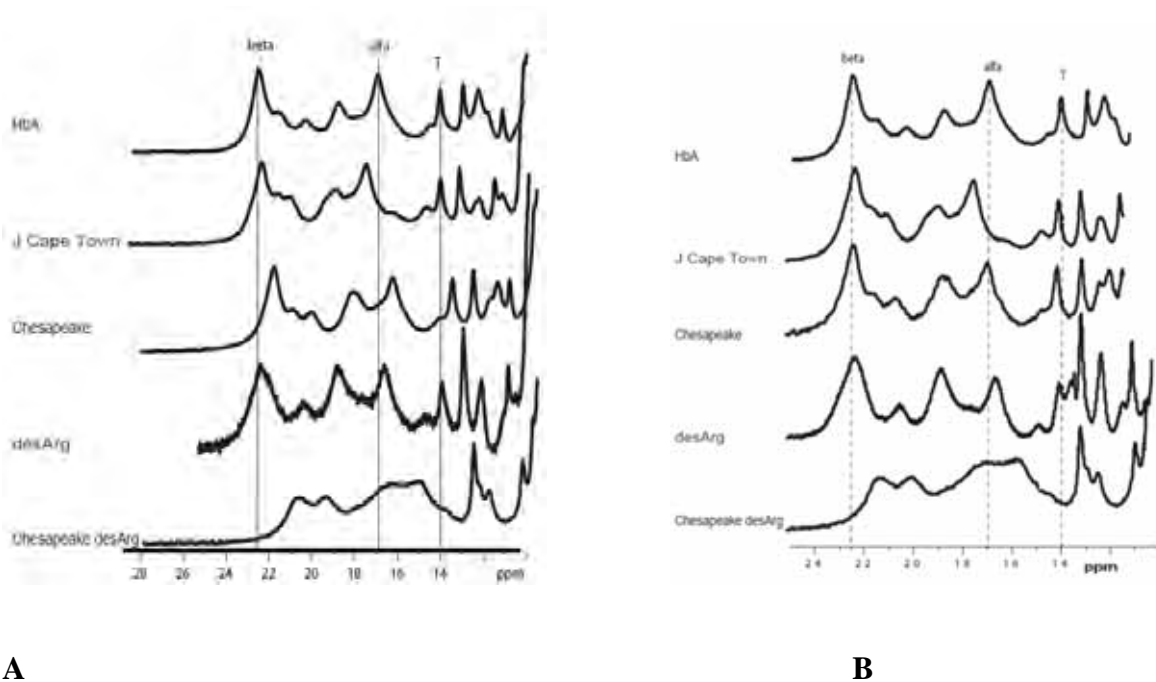


Figura 33: Detalhe da região das hiperfinas, com a presença dos picos alfa e beta que denotam a comunicação entre as subunidades da proteína. Em **A** as leituras feitas em tampão fosfato 0,1M pH 7 e em **B** no mesmo tampão em pH 6,5, estado desoxigenado, obtidos em espectrômetro de 300 MHz

Estes resultados demonstram que a supressão da Arg 141 e da Arg 92 separadamente não causam uma modificação tão drástica na estrutura da molécula, enquanto que a mutação dupla causa uma modificação maior nas regiões observadas.

Em relação aos prótons intercambiadores, todas as Hbs estudadas no trabalho apresentam as ressonâncias deslocadas para entre aquelas das HbA. As ressonâncias H122, H103 e W37 apresentam o mesmo padrão daquele da HbA para as Hbs Chesapeake e J-Cape Town. Novamente para as Hbs que perdem a Arg 141, existem modificações maiores nas ressonâncias. A figura 34 demonstra estes resultados.

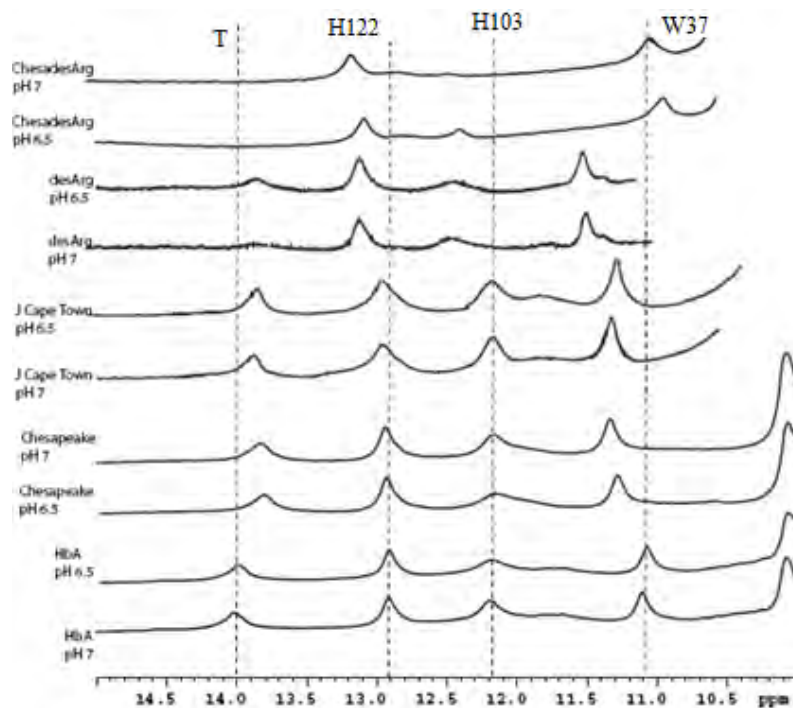


Figura 34: Ressonâncias dos prótons intercambiadores para todas as Hbs nos pHs 6,5 e 7, obtidos em tampão fosfato de sódio e 29°C, estado desoxigenado. Espectrômetro e 300 MHz

A ressonância do W37 está modificada para a Hb desArg, estando deslocada para 11,6 ppm apresentando uma ressonância extra em 11,4 ppm. Uma vez que a ressonância extra é muito menor que a ressonância principal concluímos que esta ressonância extra não significa contribuição de um novo próton, mas sim, indica uma estrutura intermediária que possui esta ressonância (do W37) deslocada. (TSAI, C.H. et.al, 1999).

Na Hb Chesapeake desArg essa ressonância está em cerca de 10,8 ppm e não em 11,2 ppm ou seja, deslocada para a posição encontrada na estrutura ligada. A ausência de marcador T e o deslocamento da ressonância do W37 para as Hbs desArg e Chesapeake

desArg indicam que o equilíbrio está fortemente deslocado para a estrutura R, ainda que no estado desoxigenado para estas duas Hbs.

4.3.2) ESTADO LIGADO

O estudo da proteína no estado oxigenado não é conveniente devido a rápida formação de metaHb. Assim, para que seja possível o estudo da Hb no estado ligado, adicionamos a ela CO, conforme explicado na Introdução.

A) Prótons Intercambiadores

Observamos a região dos prótons intercambiadores no estado CO, onde existe a migração da ressonância do W37 para 10,8 ppm e o desaparecimento da ressonância característica do estado desoxigenado, o marcador T, em 14 ppm, para a HbA. Notamos que as demais Hbs não diferem no geral do padrão da HbA, exceto a Hb Chesapeake desArg que apresenta a ressonância da histidina 103 com intensidade menor que as demais proteínas estudadas. O pH não influenciou consideravelmente os resultados. A figura 35 demonstra esses resultados.

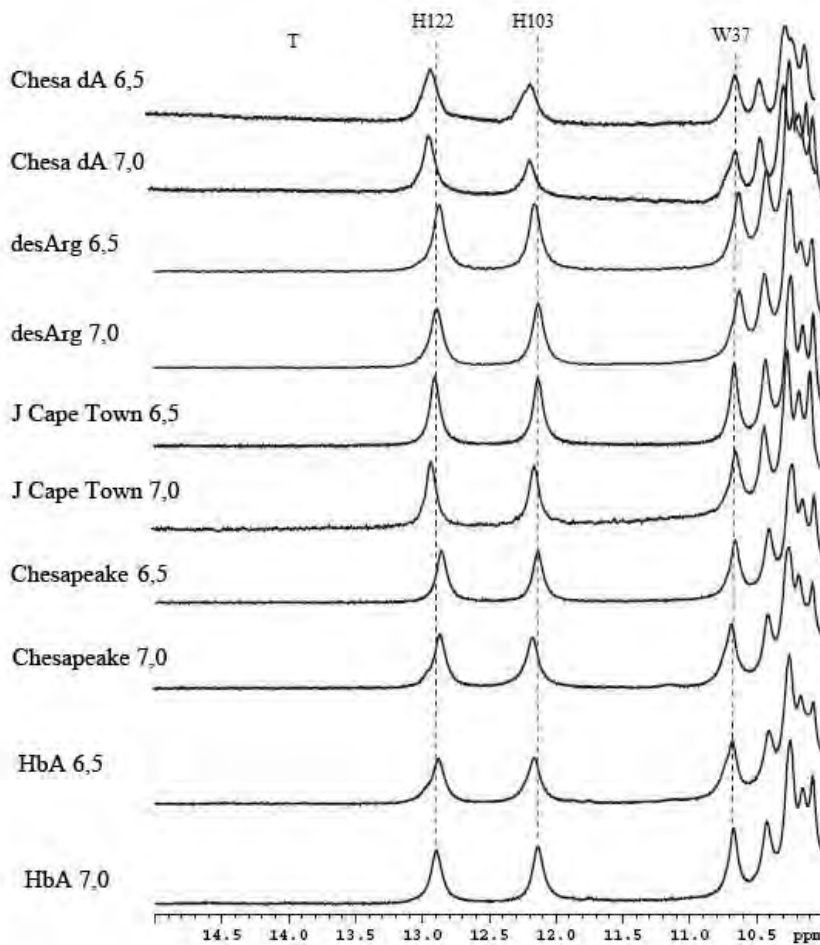
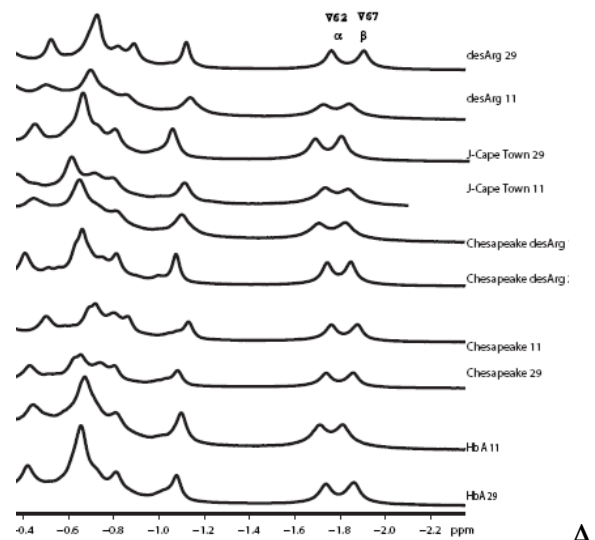


Figura 35: Ressonâncias dos prótons intercambiadores para todas as Hbs nos pHs 6,5 e 7, obtidos em tampão fosfato de sódio e 29°C, estado CO. Espectrômetro de 600 MHz

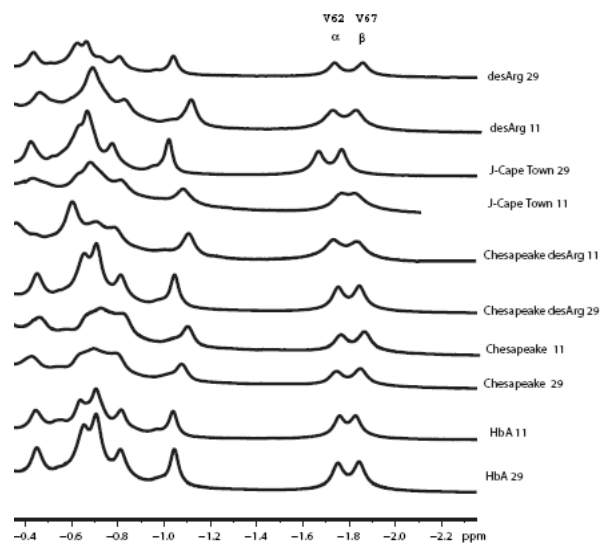
B) Região de Corrente de Anel

No estado ligado, observamos as ressonâncias da região de corrente de anel, onde medimos dois picos provindos da ligação metil de duas valinas: V62 α e V67 β , localizadas entre -1,8 e -2 ppm do DSS. Esses resíduos se localizam próximos ao grupo heme e demonstram modificações de origem terciária.

Para os mutantes estudados, o comportamento segue aquele encontrado para a HbA, com os picos se reduzindo em um, na temperatura de 11°C, indicando que a troca química se torna mais rápida, mostrado na figura 36.



A



B

Figura 36: Ressonância das valinas e região de corrente de anel no estado CO em 29 e 11°C nos pHs 6,5 (A) e 7 (B)

C) Afinidade e Cooperatividade

Um estudo de cooperatividade e afinidade pode ser realizado com a HbA, analisando o espectro da proteína no estado CO, a 11°C e na presença de IHP.

A temperatura mais baixa diminui a velocidade de troca dos prótons com o solvente, possibilitando uma melhor análise de diferentes regiões. O efeito de temperatura, no entanto, causa diversas modificações na estrutura da proteína e desloca o equilíbrio para a conformação T, além disso adicionamos IHP em concentração 5 vezes maior que aquela de cada Hb, situação que leva a HbA ao estado desoxigenado. Assim, ainda que ligada a CO, a

proteína possui marcadores de estrutura T presentes. De maneira a comparar as estruturas determinando cooperatividade e afinidade dos mutantes, faremos comparações nestas condições.

No caso da HbA, nesta situação (CO, com IHP e 11°C), é possível notar um traço do marcador T (figura 37), mostrando que a proteína pode ser levada, em parte a esta conformação. Hbs de baixa afinidade costumam apresentar picos mais pronunciados desta ressonância do marcador T, enquanto que proteínas de alta afinidade não apresentam essa marcação. A presença de ânions em solução costuma estabilizar o estado T, e por consequência para que a Hb passe do estado desoxigenado para o estado oxigenado, ocorre um aumento na cooperatividade. Assim, o marcador T é ainda constantemente utilizado como um indicativo de cooperatividade: Hbs com cooperatividade alta apresentam traços desta ressonância. (HO,C.,1992) A figura 37 mostra estas ressonâncias.

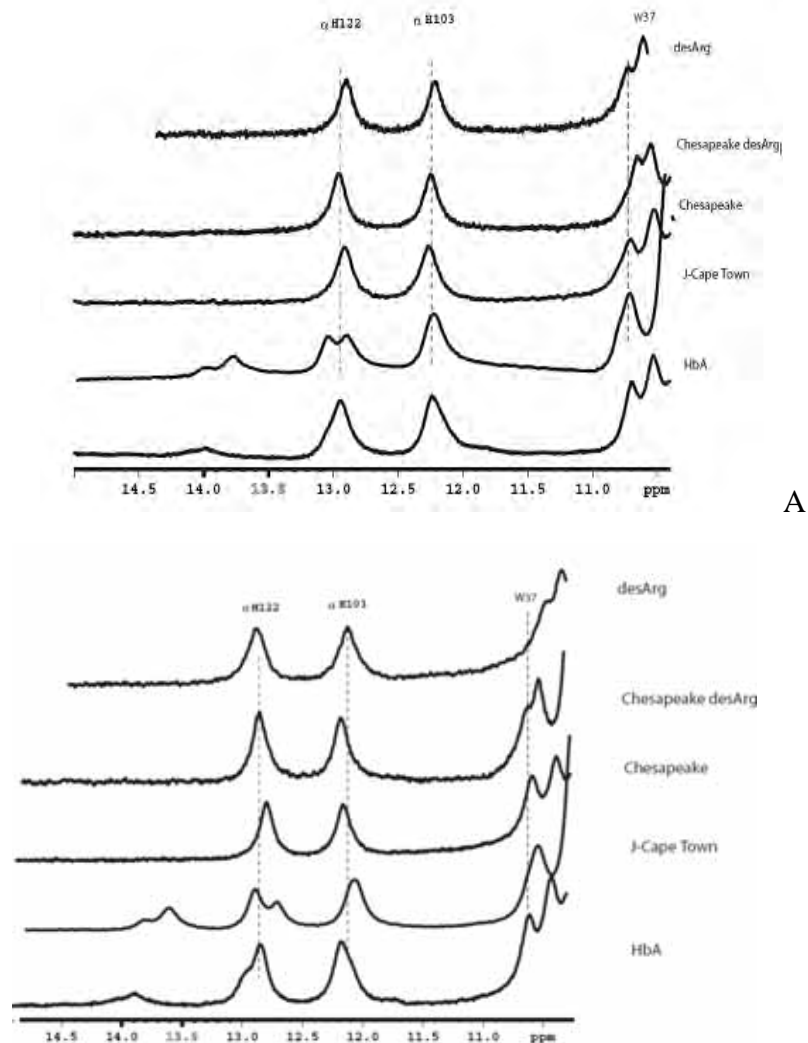


Figura 37: Gráfico de prótons amídicos de todas as proteínas estudadas no trabalho, em 11°C graus e na presença de IHP, no estado CO. Em tampão fosfato de sódio, espectrômetro de 600 MHz. A a pH 7 e em B em pH 6,5

Os mutantes Chesapeake, Chesapeake desArg e desArg não apresentam nenhum traço de ressonância na posição do marcador T. Esse comportamento indica alta afinidade ao ligante e ausência de cooperatividade dessas proteínas. Já a Hb J-Cape Town apresenta um pico duplo nesta posição assim, como um pico duplo na ressonância da histidina 122. Esse comportamento identifica a presença de duas estruturas desoxigenadas possíveis para esta Hb que se encontram em troca lenta.

Investigamos se esse efeito era proveniente da temperatura ou da presença de IHP comparando os espectros nestas posições e concluimos que este efeito é causado devido a presença de IHP: essa ressonância apenas está presente na presença de IHP, independente do pH ou da temperatura (estando mais favorecida a 11°C).

Outro fato notável para esta Hb, é que as ressonâncias do W37 e a ressonância subsequente (resíduo, W14 α) parecem formar uma só, em uma posição intermediária as duas. Também investigamos a origem desse comportamento e notamos que este efeito ocorre dependendo da temperatura, ou seja, a 29°C, as ressonâncias estão separadas e a 11°C unidas, independentes do pH ou da presença de IHP. Esse comportamento não ocorre para a HbA nem para as demais Hbs. A figura 38 ilustra a caracterização da Hb J-Cape Town.

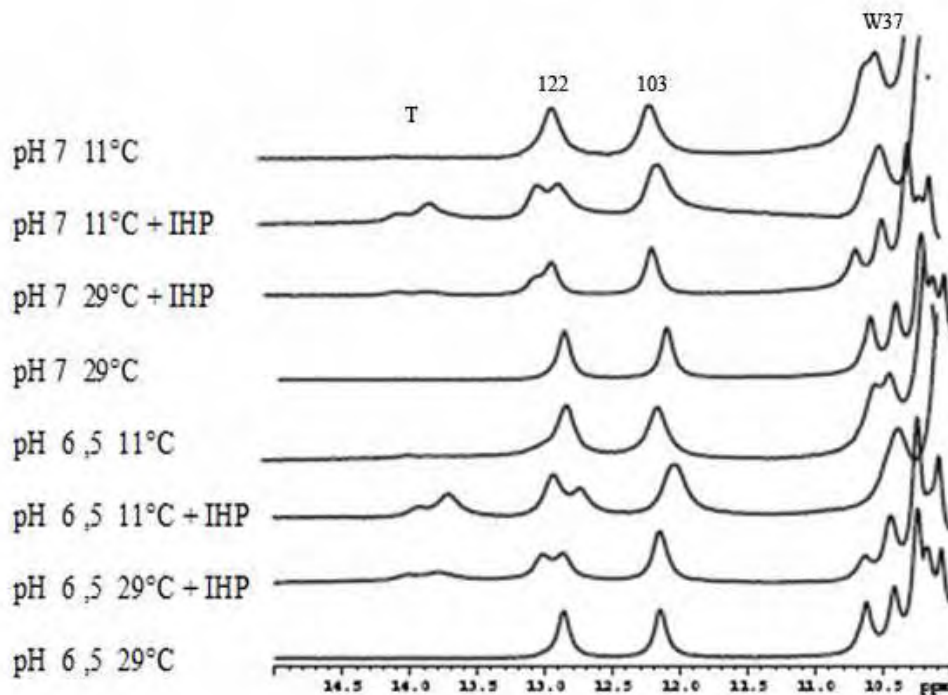


Figura 38: Caracterização da Hb J-Cape Town, região dos prótons intercambiadores no estado CO com e sem IHP, a 29 e 11°C. Espectrômetro de 600 MHz

4.4 - Efeito Bohr e Efeito de Cloreto na Hb Chesapeake

Outro objetivo deste trabalho consistiu na observação de prótons C2 e C4 provenientes das histidinas de superfície envolvidas com o efeito Bohr, nas Hbs humana e Chesapeake numa tentativa de demarcar deslocamentos químicos em função de pH e da presença de cloreto. Esses experimentos foram obtidos na presença de água deuterada, tampão HEPES, condição que possibilita a identificação dessas ressonâncias e na ausência e presença de 0,1M NaCl. Essas ressonâncias ocorrem normalmente nas regiões próximas as ressonâncias de prótons aromáticos e são facilmente identificadas em D₂O. Existem 22 ressonâncias dessas histidinas (ou 11 por $\alpha\beta$ dímero) identificadas no estado ligado ou desoxigenado (RUSSU I.M., ET.AL, 1980;1982; RUSSU, I.M. &HO, C., 1987).

As histidinas envolvidas no efeito Bohr já estão muito bem identificadas na HbA, tanto no estado desoxigenado como no estado ligado, na presença e na ausência de cloreto. Uma vez que temos uma diferença funcional no efeito Bohr das HbA e Chesapeake, na presença de tampão HEPES (diversos pHs) com e sem cloreto, conforme mostrado na seção Resultados (tabela 2), decidimos fazer uma comparação das estruturas das duas Hbs nessa condição.

O assinalamento das ressonâncias das histidinas e o valor de pK para cada condição, necessita de muitas medidas com intervalos o menor possível de pH para que se possa seguir os mínimos deslocamentos dos picos. O valor de pK das histidinas é dado pelo ajuste não linear do deslocamento químico de cada ressonância C2 ou C4 próton, em função do pH de acordo com:

$$\delta = (\delta^+[\text{H}^+] + \delta^0\text{K}) / ([\text{H}^+] + \text{K}) \text{ ou } \delta = (\delta^+[\text{H}^+]^n + \delta^0\text{K}^n) / ([\text{H}^+]^n + \text{K}^n)$$

onde δ e δ^+ são os deslocamentos químicos nas formas protonadas e desprotonadas, respectivamente, K é a constante de dissociação de prótons H⁺ de cada resíduo e n é o coeficiente de titulação para a titulação em ¹H NMR. O valor de n é incluído na equação para caracterizar desvios do equilíbrio de protonação das histidinas de superfície predito pela equação de Hendersson-Hasselbach. (MARKLEY, J., 1975)

Neste trabalho, realizamos medidas a pH 6,84 e 7,02 (ou pD= 7,24 e pD= 7,42) para as Hbs Chesapeake e HbA, com e sem cloreto, para observarmos mudanças relacionadas aos diferentes pHs e conseqüentemente pKs. Os resíduos foram demarcados por comparação com aqueles já publicados pelo mesmo grupo. (BUSCH,M. R et al, 1990 e 1991, RUSSU,I et al 1980,1982 e 1886 , FANG,T. et al 1999, TSAI, C.H.2000)

4.4.1 - Diferenças estruturais entre as duas Hbs no estado desoxigenado

Conforme já discutido anteriormente, a mudança de um resíduo traz modificações estruturais distribuídas ao longo da molécula. A figura 39 mostra as regiões de campo alto e de campo baixo do espectro, onde apenas por ^1H NMR os resíduos não podem ser identificados isoladamente. Nessas regiões podemos notar as diferenças provindas apenas da substituição do resíduo Arg 92.

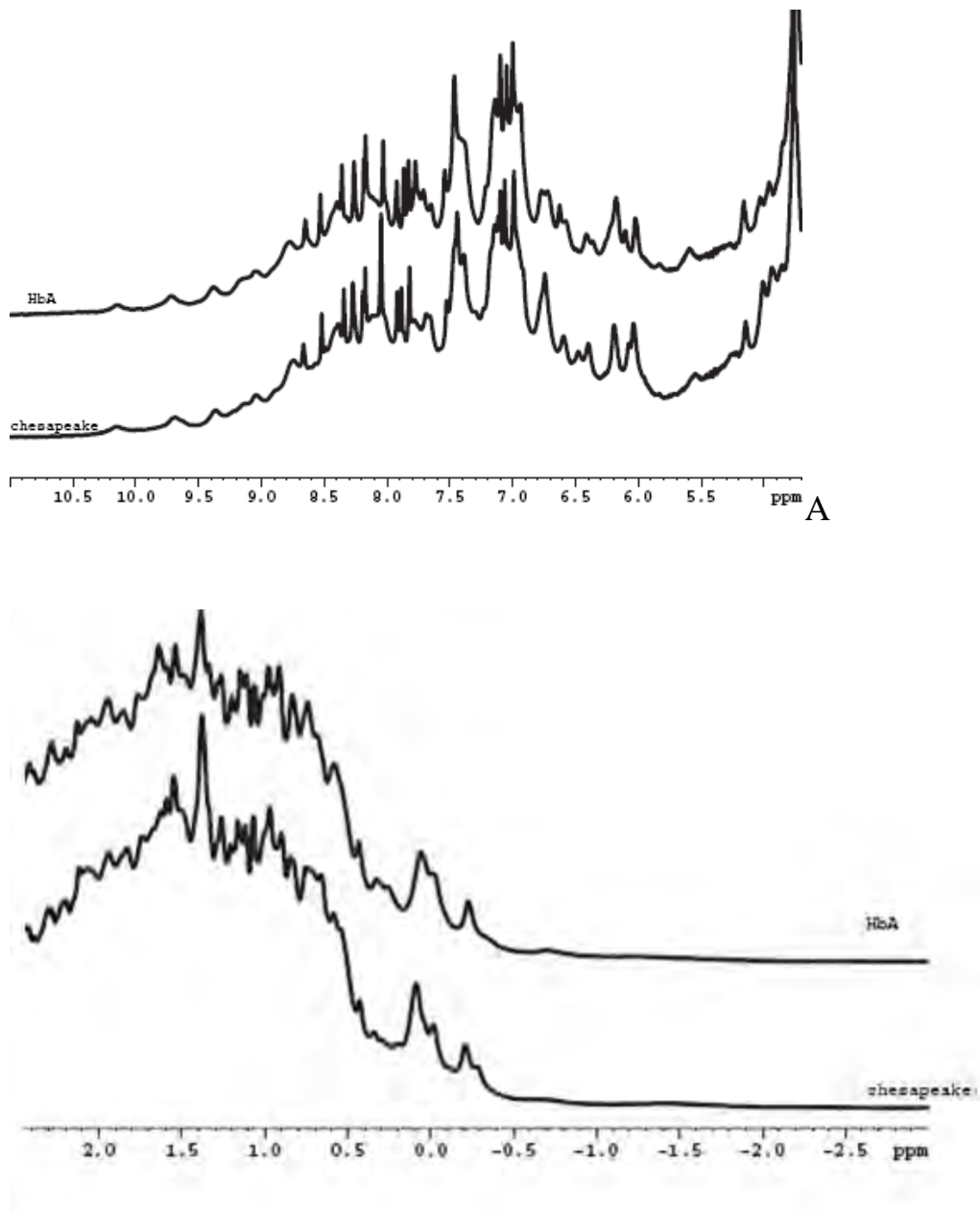


Figura 39: HbA e Chesapeake em HEPES 0,01M, pD=6,84 e 29° C no estado desoxigenado, espectrômetro de 300 MHz. Em A região de campo baixo (abaixo da ressonância padrão), região que contém os prótons das histidinas e os aromáticos. Em B, campo alto onde estão os alifáticos.

4.4.2 - Demarcação de histidinas no espectro de HbA e Chesapeake no estado desoxigenado

A partir de estruturas desoxigenadas da HbA, publicadas em 1990 por Busch e Ho e, foi possível identificar as histidinas nos pHs estudados e comparar com a Hb Chesapeake. De acordo com RUSSU, I. et.al, 1980, as histidinas do estado desoxigenado são identificadas por números, sendo:

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>4'</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>
$\beta 97$	$\alpha 72$	$\beta 146$	$\alpha 50$	$\beta 77$	$\alpha 112$	$\alpha 20$	$\beta 117$	$\beta 116$	$\alpha 89$	$\beta 2$

Na Figura 40, assinalamos as histidinas obtidas em nosso experimento a partir daquelas encontradas na literatura (BUSCH, M.R. et.al, 1990). As ressonâncias são comparadas aquelas obtidas exatamente na mesma condição (necessariamente mesmo tampão, temperatura, presença ou ausência de íons) apenas com o pH diferente (intermediário aos já existentes). Pela comparação, foi mais fácil a identificação das ressonâncias em pH= 6,84.

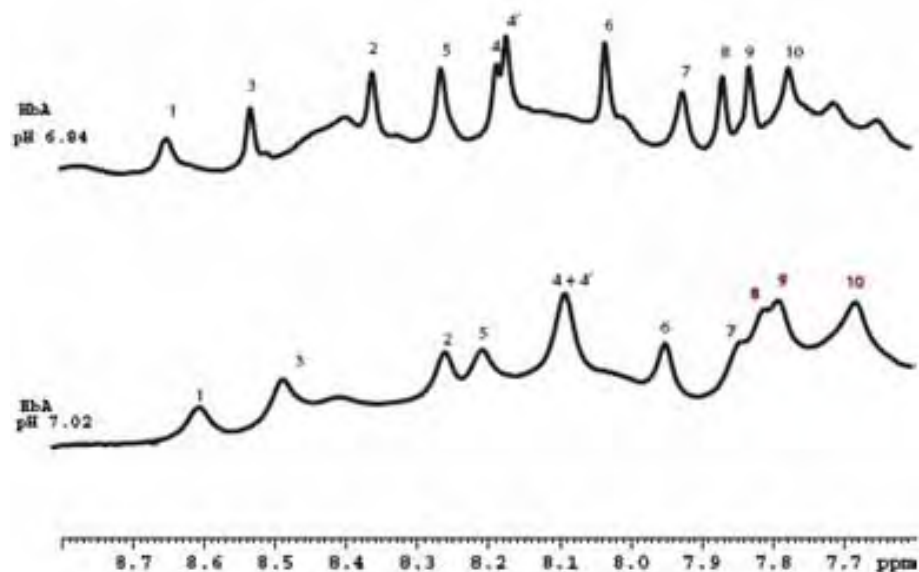


Figura 40: Ressonâncias das histidinas de superfície, no estado desoxigenado da HbA em pH 6,84 e 7,02 obtidas em tampão HEPES 10m M, 29°C em espectrômetro de 300MHz. As ressonâncias em vermelho não podem ser demarcadas com certeza.

Após a identificação feita a partir da HbA, podemos comparar os espectros obtidos na mesma condição para a Hb Chesapeake. Para a Hb Chesapeake existe homologia até a histidina 6, a partir disso torna-se impossível a demarcação. Esses resultados estão na figura 41.

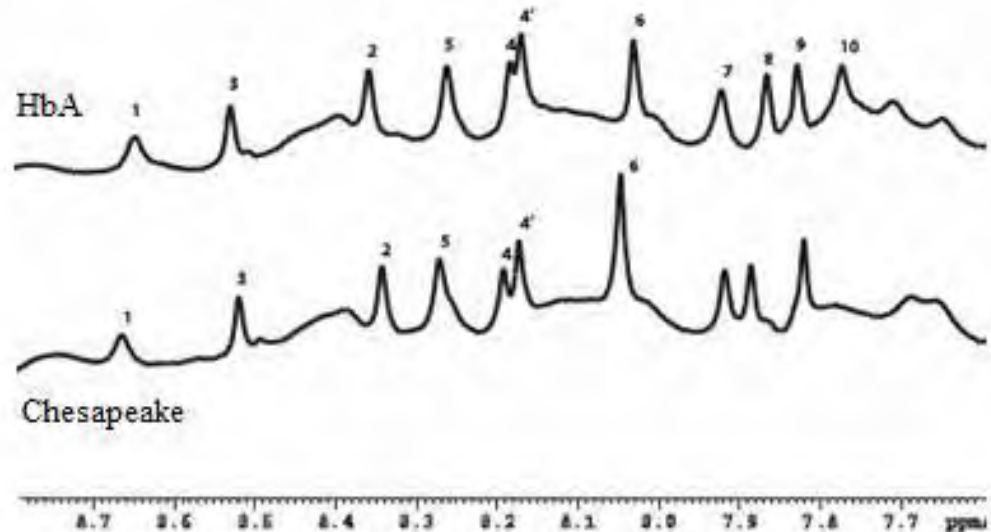


Figura 41: HbA e Chesapeake, tampão HEPES 0,1M pH =6,84 estado desoxigenado, espectrômetro de 300 MHz. As histidinas 7 a 10 não podem ser demarcadas com certeza para a Hb Chesapeake

A influência do pH nas amostras é parecida para as duas Hbs: nos dois casos as ressonâncias 4 e 4' se tornam uma só no pH = 7,02, assim como as ressonâncias 2 e 5 se aproximam. No entanto as ressonâncias de 7 a 10 continuam difíceis de ser demarcadas e também diferem em seu comportamento. A figura 42 mostra esses resultados

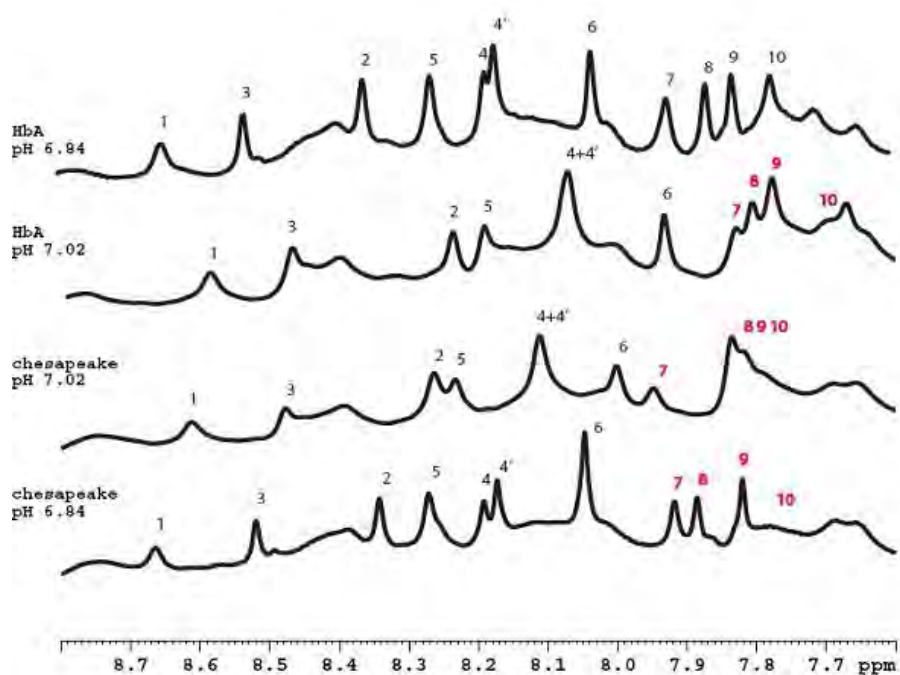


Figura 42: Histidinas proximais HbA e Chesapeake, tampão HEPES 0,1M pH =6,84 estado desoxigenado, espectrômetro de 300 MHz. As histidinas marcadas em vermelho não puderam ser demarcadas com certeza

4.4.3- A proteína no estado ligado

Também no estado CO, podemos observar as diferenças estruturais na região geral dos prótons aromáticos e histidinas de superfície. A figura 43 traz essa caracterização no estado CO.

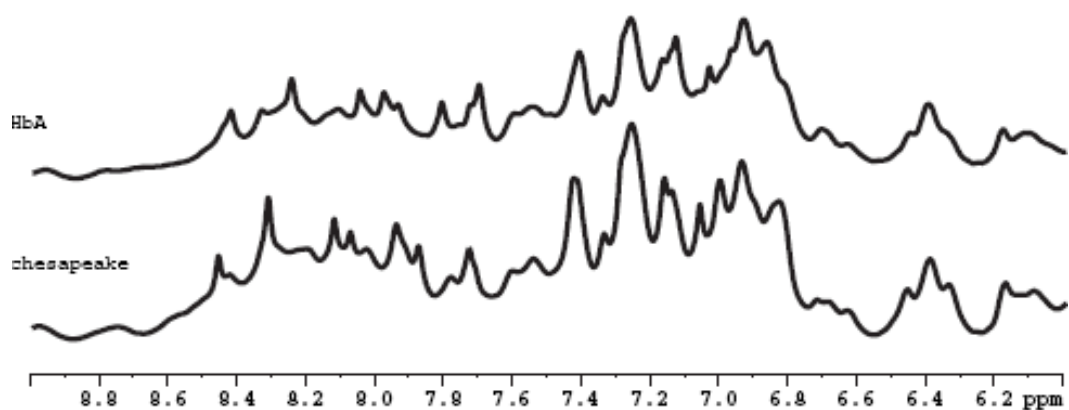


Figura 43: Espectro das HbA e Chesapeake as histidinas de superfície e os aromáticos, obtidos em tampão HEPES, pH =6,84, no estado CO em espectrômetro de 600 MHz

4.4.4 - Demarcação de histidinas no espectro de HbA e Chesapeake no estado ligado

As histidinas de superfície no estado ligado a CO foram identificadas através de comparação com trabalhos anteriores, da mesma forma realizada para o estado desoxigenado. Segundo Russu, I. et.al, neste caso as histidinas são identificadas por letras. (RUSSU, I et.al, 1980)

<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>J</i>	<i>K</i>	<i>L</i>	<i>Y</i>
$\beta 77$	$\alpha 72$	$\beta 97$	$\alpha 122$	$\alpha 20$	$\alpha 50$	$\beta 2$	$\alpha 45$	$\alpha 89$	$\beta 177$	$\beta 116$	$\beta 143$	$\beta 146$

A figura 44 traz a demarcação das histidinas para a HbA, realizadas a partir da literatura. (FANG,T., et al 1999, TSAI, C.H, et al.2000).

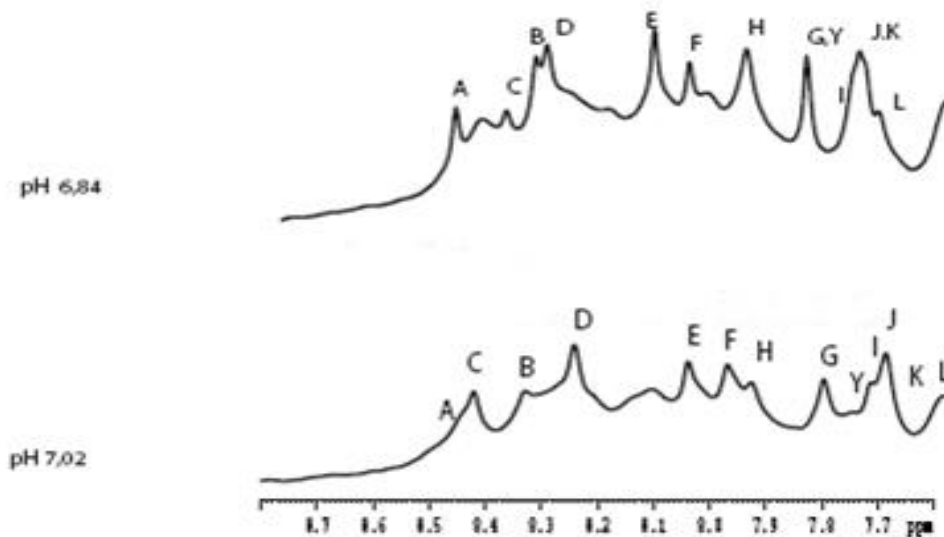


Figura 44: Histidinas proximais HbA e Chesapeake, tampão HEPES 0,1M pH =6,84 e 7,02 estado CO 29°C, em espectrômetro de 600 MHz. .

Novamente a comparação no pH 6,84 foi mais fácil, assim utilizamos estas ressonâncias para demarcar a Hb Chesapeake. Os resíduos marcados em vermelho: G, I, Y, J, K e L não podem ser marcados com certeza, conforme mostrado na figura 45.

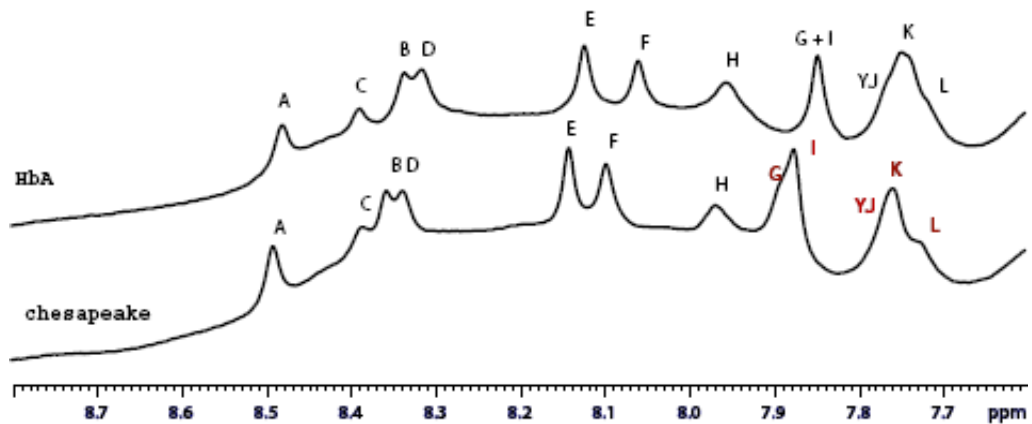


Figura 45: HbA e Chesapeake, tampão HEPES 10Mm, pH=6,84 estado ligado a CO. As histidinas em vermelho não podem ser demarcadas com certeza. Dados obtidos em espectrômetro de 600MHz

A influência do pH no deslocamento das histidinas no estado CO esta representada na figura 46.

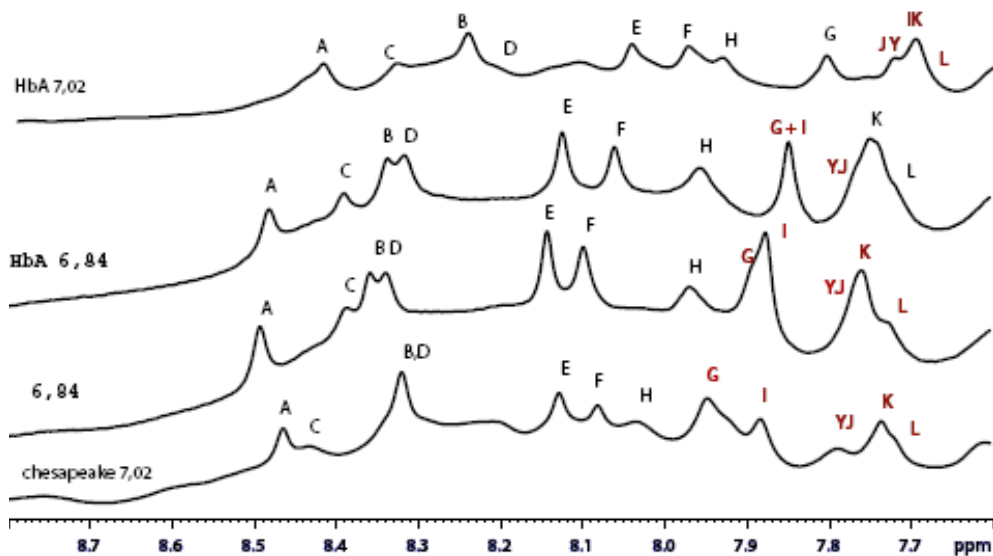


Figura 46: Comparação dos deslocamentos das ressonâncias das histidinas duas Hbs pela influência do pH. As histidinas marcadas em vermelho não podem ser marcadas com certeza. Obtidos em espectrômetro de 600MHz

4.4.5 – Efeito de cloreto nas Hbs no estado desoxigenado

A influência de cloreto causa modificações no efeito Bohr da HbA, no entanto medidas funcionais demonstraram ausência de efeito de cloreto no efeito Bohr da Hb Chesapeake. Para estudar esta influência nos aspectos estruturais destas Hbs, medimos os espectros de RMN na presença de 100mM de cloreto.

A figura 47 mostra o efeito de cloreto nas histidinas da Hb A e Chesapeake no estado desoxigenado e a pH 6,84; e a figura 48 mostra o efeito de cloreto nas histidinas da Hb A e Chesapeake no estado desoxigenado e a pH 7,02.

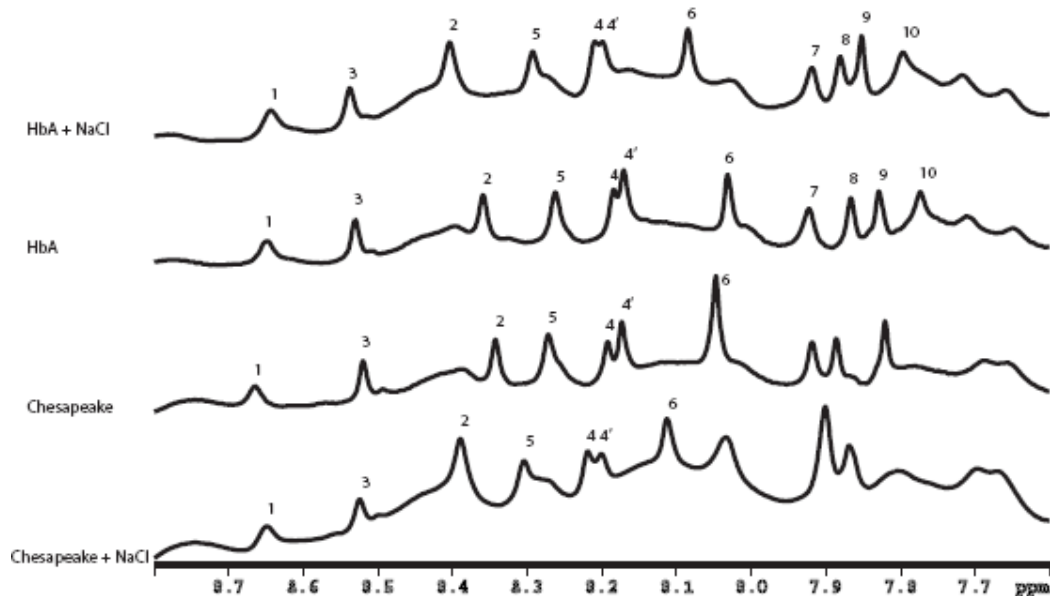


Figura 47: Efeito de cloreto nas histidinas de superfície das Hbs A e Chesapeake. Dados obtidos em tampão HEPES 0,01M+ 0,1M NaCl, pH=6,84 29°C, obtidos em espectrômetro de 600MHz

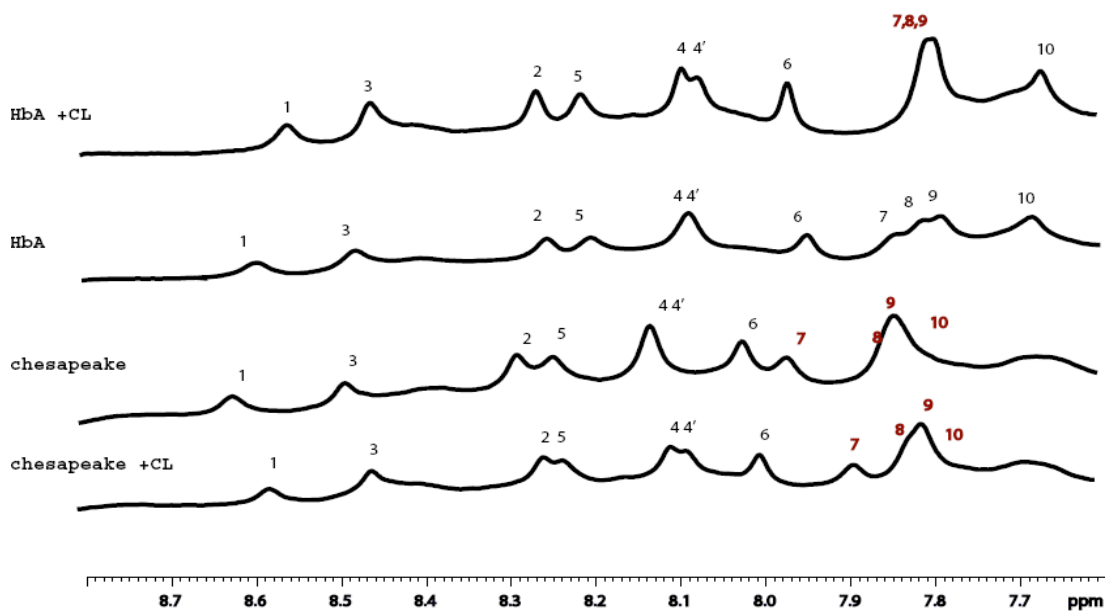


Figura 48: Efeito de cloreto nas histidinas de superfície das Hbs A e Chesapeake. Dados obtidos em tampão HEPES 0,01M +0,1M NaCl, pH=7,02 29°C, em espectrômetro de 600MHz

Uma caracterização dessa região, que inclui os prótons aromáticos está na figura 49. Nesta figura, podemos observar as diferenças estruturais para pH 7,02 com e sem sal, mostrando poucas modificações na região dos aromáticos para ambas as proteínas.

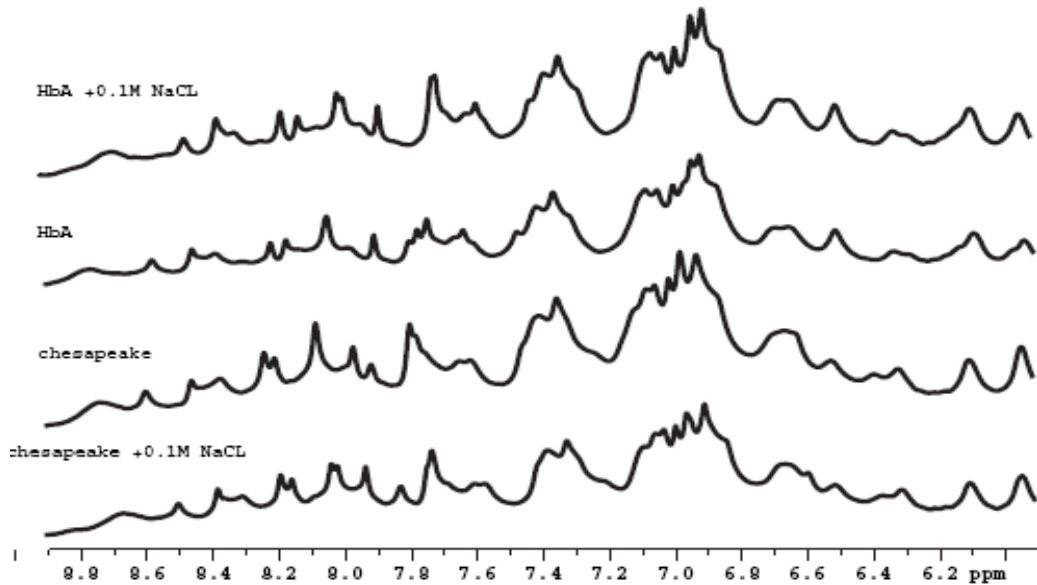


Figura 49: Região de histidinas e prótons aromáticos com e sem cloreto para ambas Hbs. Dados obtidos a 29 graus e pH 7,02

4.4.6 – Efeito de cloreto no estado ligado a CO

A figura 50 mostra o efeito de cloreto nas histidinas da Hb A e Chesapeake no estado ligado a CO e a pH 6,84; e a figura 51 mostra o efeito de cloreto nas histidinas da Hb A e Chesapeake no estado ligado a CO e a pH 7,02. É possível observar em ambas figuras, tanto contribuições de diferenças estruturais, quanto mudanças ocorridas pelo efeito de cloreto. As ressonâncias na presença de cloreto foram demarcadas a partir das concentrações de NaCl encontradas na literatura de 80 mM e de 160 mM em tampão fosfato pH 6,95 (BUSCH, M.R. et.al, 1990 E 1991).

As histidinas, G, Y, J, I, K e L são muito difíceis de serem demarcadas com certeza, uma vez que são afetadas pelo pH, pela diferença estrutural bem como pela presença de cloreto.

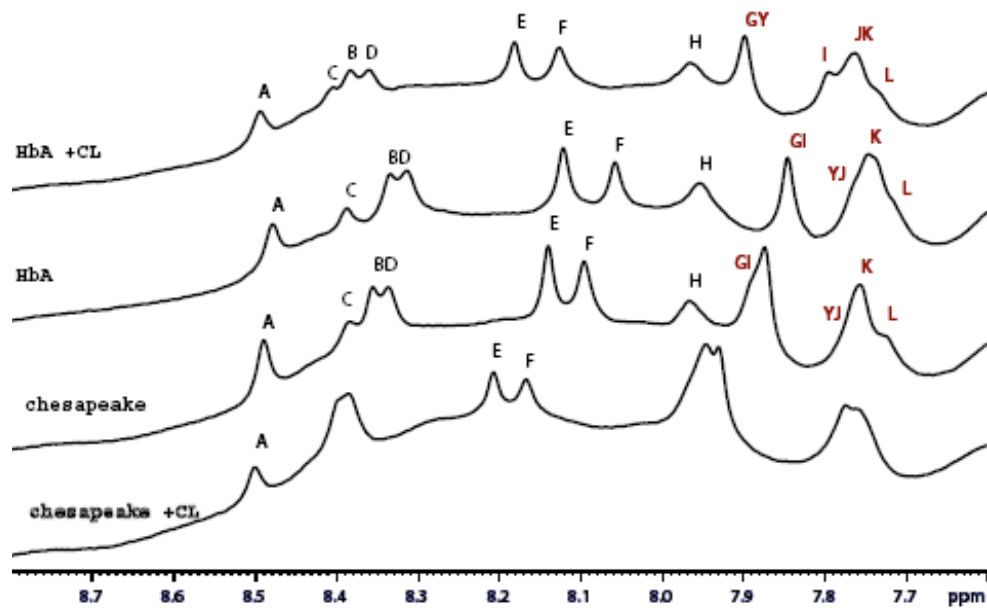


Figura 50: Deslocamentos químicos apresentados pelas Hbs Chesapeake e HbA na presença e ausência de cloreto em pH 6,84, obtidos em espectrômetro de 600MHz. As histidinas marcadas em vermelho não podem ser assinaladas com certeza.

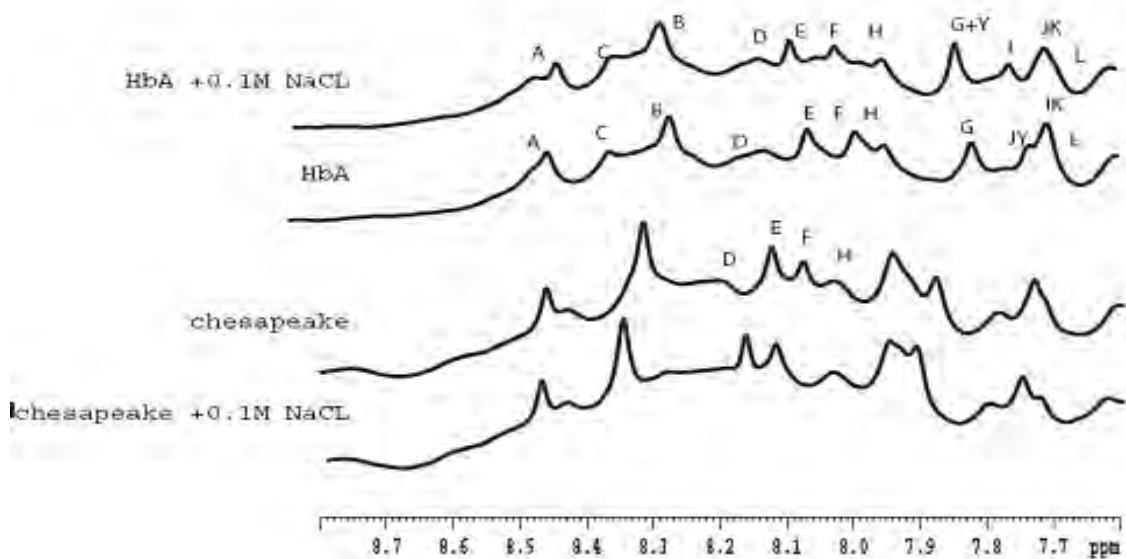


Figura 51: deslocamentos químicos apresentados pelas Hbs Chesapeake e HbA na presença e ausência de cloreto em pH 7,02 Obtidos em espectrômetro de 600MHz

No estado CO, podemos observar também a região da corrente de anel, nessas condições. Avaliamos a diferença de pH nessa região e a diferença causada pela presença de cloreto. As diferenças estruturais nessa região não parecem mudar muito pela influência do pH. A Hb Chesapeake e a HbA diferem estruturalmente, mas quando comparadas em relação a si próprias, não diferem muito devido ao pH. A figura 52 mostra esses resultados.

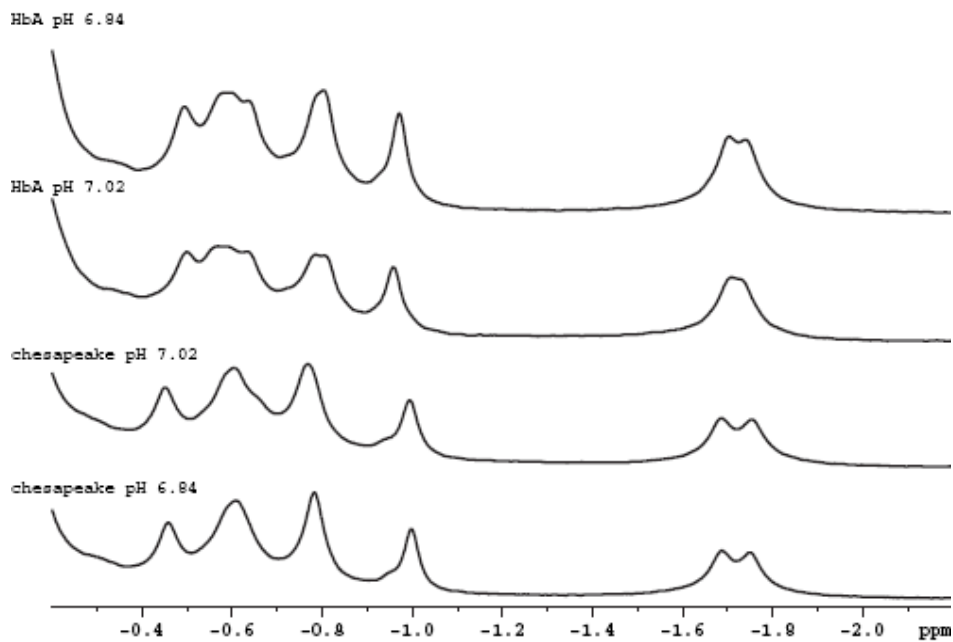


Figura 52: Região de corrente de anel para a HbA e Chesapeake nos pH= 6,84 e 7,02. Medidos em espectrômetro 600 MHz, em tampão HEPES nos pHs 6,84 e 7,02, a 29°C

A figura 53 traz a influência do cloreto nesta região. Podemos observar que as duas Hbs têm diferenças estruturais entre si e pequenas diferenças pela presença de cloreto.

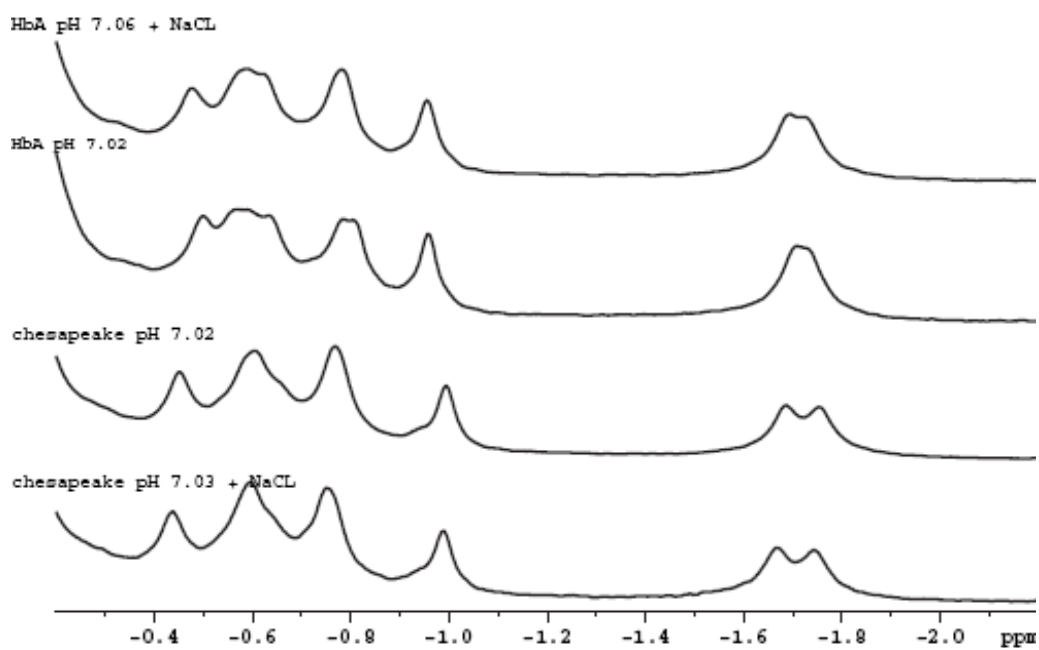


Figura 52: Região de corrente de anel para a HbA e Chesapeake no pH= 7,02. Medidos em espectrômetro 600 MHz, em tanpao HEPES na ausência e presença de 100Mm de NaCl, a 29°C

V - DISCUSSÃO

5.1 - Aspectos funcionais das Hbs

Neste trabalho, estudamos a influência de cloreto nas propriedades funcionais e estruturais de hemoglobinas, buscando uma ligação entre este efector e os resíduos Arg 141 α e 92 α .

A investigação destes dois sítios de ligação, revelou que as Hbs com mutações para estes sítios se comportam de maneira diferente da HbA e entre si, confirmando que a natureza de cada aminoácido substituído altera as propriedades de cada Hb.

Todas as Hbs mutantes estudadas apresentaram afinidade ao oxigênio maior que a HbA em todas as situações, independente do pH, presença de cloreto, IHP e outros fosfatos.

Em estudos anteriores, demonstramos que, assim como a HbA, que tem sua oxigenação explicada pelo modelo de três estados $T_x \rightarrow T_o \rightarrow R$, a Hb desArg também necessita de um modelo que considere mais conformações para explicar sua oxigenação. (COLOMBO, M.F. & SEIXAS, F.A.V., 1999; TOSQUI, P., 2005)

Na re-investigação dessas duas Hbs, confirmamos estes resultados, medidos pela diferença de hidratação que acompanha a oxigenação dessas proteínas na presença e na ausência de ânions. Na presença de cloreto as Hbs A e desArg apresentaram valores de Δn_w de aproximadamente 70 e valores de Δn_w na ausência de cloreto de aproximadamente 25 e 35. A diferença de ~ 40 moléculas de água nas duas situações foi explicada pela presença de um estado desoxigenado com afinidade pelo oxigênio e hidratação intermediários aos estados T e R, estabilizado na ausência de ânions.

Partindo do princípio que existem sítios de ligação específicos para o cloreto na HbA e que este equilíbrio de três estados é regulado pela ligação desses íons cloretos a estes sítios específicos, a remoção destes sítios faria automaticamente que o estado T_x não fosse estabilizado. Dessa forma, na ausência desses resíduos específicos, ainda que na presença de cloreto a Hb estabilizaria o estado desoxigenado T_o e ligaria, em sua oxigenação o mesmo número de moléculas de água que na ausência de cloreto – valor que para HbA está em cerca de 25 moléculas de água.

Este sítio não poderia, segundo os resultados preliminares e re-investigados, ser apenas o 141 α , já que a Hb desArg não se comportou dessa maneira. Seria então, segundo as evidências cristalográficas, o sítio 92 α . De fato, as Hbs Chesapeake e J-Cape Town, apresentaram o mesmo número de moléculas de água na ausência e na presença de 100 mM

de cloreto: 23 (\pm 5) e 25 (\pm 3) respectivamente para Hb Chesapeake e 22 (\pm 2) e 25 (\pm 2) para a Hb J Cape Town.

O mutante duplo Chesapeake desArg também não mudou consideravelmente o número de moléculas de água na presença e ausência de cloreto: 24 (\pm 2,5) e 28 (\pm 3), reforçando que o sítio Arg 92 poderia ser o responsável pela ligação de cloreto. (Tabela 1)

O efeito Bohr também é influenciado pela ligação de cloreto à Hb. A HbA apresenta o valor de \sim 1 próton liberado na oxigenação na ausência de ânions e \sim 2 na presença de altas concentrações de cloreto. (VAN BEEK, G.G.M. et AL, 1979)

Em nossos estudos, observamos que a HbA novamente apresentou estes resultados.

As Hbs modificadas liberam \sim 1 próton tanto na ausência quanto na presença de cloreto. Este fato indica que a perda dos resíduos 141 e 92 não altera a liberação de prótons na ausência de cloreto, diferente do que acontece na presença deste ânion. O fato destas Hbs liberarem o mesmo número de prótons durante a oxigenação, na presença e ausência de cloreto, confirma a Arg 92 como sítio de cloreto. (Tabela 2)

A Hb desArg, que teve comportamento semelhante àquele da HbA nos resultados de variação de hidratação, mostrou agora comportamento semelhante àquele das Hbs modificadas e diferente da HbA nos resultados de Efeito Bohr: \sim 1 próton na ausência e presença de 100mM de cloreto. Desta forma, podemos supor que o resíduo 141 α está envolvido de alguma forma no efeito Bohr regulado pelo cloreto.

Uma interpretação possível para a Hb desArg liberar apenas 1 próton na presença de cloreto, teria origem nas mudanças terciárias da proteína. Assim, quando a HbA libera dois prótons na transição oxi-desoxi na presença de cloreto, admitimos que um primeiro próton estaria sendo liberado na transição terciária Tx \rightarrow To e um segundo próton na transição quaternária To \rightarrow R. No caso da Hb desArg, provavelmente não ocorre a liberação do primeiro próton, sugerindo que a Arg 141 α desempenhe um papel na regulação terciária da liberação de prótons induzida pela presença de cloreto.

Uma questão pode ser levantada neste ponto: se a Hb desArg e HbA teriam o mesmo comportamento de três estados, indicando modificações estruturais parecidas influenciadas pelo cloreto, como os valores de p₅₀ e n₅₀ desta Hb são muito mais próximos que aqueles das Hbs mutantes? Uma possível explicação para este comportamento poderia estar na ausência das pontes formadas pela Arg 141 que, conforme descrito na Introdução causa a desestabilização do estado T. Estudos estruturais apontaram que a modificação deste resíduo não causa modificações críticas à estrutura da Hb (referências na Introdução).

Apesar de Hb desArg possuir diversas modificações localizadas em relação à HbA, como demonstrado pelos resultados de RMN, essas modificações estariam localizadas estrategicamente, de forma que a estrutura se mantivesse globalmente, mas o deslocamento do equilíbrio para a estrutura R seria responsável pelos valores absolutos de p_{50} serem menores que aqueles da HbA.

Em termos de cooperatividade as Hbs Chesapeake, desArg e Chesapeake desArg possuem valores menores que a HbA e próximos de 1, indicando uma cooperatividade baixa. Já a Hb J Cape Town possui valores de cooperatividade entre aqueles da HbA e dos demais mutantes, confirmado também por evidências estruturais. As Hbs não possuem mudanças significativas nos valores de n_{50} na presença e na ausência de sal. Este comportamento demonstra a ausência de modificações heme-heme desencadeadas pela presença de cloreto, o que indica que as proteínas mutantes não possuem grandes modificações nas interações moleculares das subunidades. A afinidade diminui e a cooperatividade aumenta para as Hbs J Cape Town, Chesapeake e desArg apenas na presença de IHP, um forte agente alostérico que leva as Hbs para o estado de menor afinidade T. A Hb Chesapeake desArg não tem modificações significativas, indicando que a mutação dupla diminui a afinidade a este ligante.

Estudos anteriores (NAGEL, R.L., et al, 1967) apontaram a Hb Chesapeake com efeito Bohr “normal”, parecido com aquele da HbA, entre pH 6,6 e 7,3. O valor de cooperatividade medido na ausência de sal e em tampão fosfato foi de 1,3 para a Hb Chesapeake e 2,8 para a HbA. Os valores de p_{50} medidos para a Hb Chesapeake foram 1/6 daqueles medidos para a HbA. No entanto, o valor de $\Delta \log p_{50}$ por ΔpH para as duas proteínas foi 0,45 para os dois casos, levando os autores a concluir que o efeito Bohr é chamado normal. O mesmo aconteceu com a Hb J-Cape Town. Estudos realizados em 1971 por Charache, S. et.al. apontam que a Hb J Cape Town, em tampão fosfato possui um efeito Bohr “parecido” com aquele da HbA, ainda que os valores de p_{50} absolutos sejam menores. Nossos resultados, realizados em tampão HEPES também demonstram que, na ausência de cloreto, o efeito Bohr das Hbs Chesapeake e J Cape Town, é semelhante aquele da HbA, mostrando que a ausência da Arg 92 não modifica este efeito. No entanto, nenhum dos trabalhos citados realiza medidas em tampão HEPES ou na presença de cloreto, onde notamos a grande diferença entre a HbA e as Hbs Chesapeake e Hbs J Cape Town.

5.2 – Aspectos estruturais das Hbs

Os espectros analisados mostram que todas as Hbs têm diferenças ao longo de sua estrutura, indicando que a modificação de um resíduo em determinada região afeta a molécula como um todo. O fato da Hb Chesapeake e J Cape Town apresentarem várias diferenças em seus espectros mostra que as diferenças nas regiões da molécula são influenciadas pelo aminoácido substituído.

Em 1974, estudos de RMN realizados por Wiechelman e colaboradores publicaram regiões hiperfinas (entre 28 e 13 ppm) da estrutura desoxigenada da Hb Chesapeake em tampão fosfato de potássio, pH=6,9, com a ressonância em 14 ppm ausente. (WIECHELMAN, K V et AL 1974) Em nossos resultados é possível ver que a ressonância está presente, da mesma forma que na HbA, contrariando os resultados anteriores.

No estado desoxigenado, a Hb desArg possui o marcador T com muito baixa intensidade e a Hb Chesapeake desArg perde completamente essa ressonância, indicando que a mutação no resíduo 141 α desloca o equilíbrio para a estrutura R ainda que no estado desoxigenado. Foi reportado para a Hb desArg, que a baixos pHs (menores que 6) a proteína teria seu equilíbrio deslocado para a estrutura T, enquanto que a pHs altos (maiores que 8), sua estrutura se deslocaria para o estado R. Podemos observar que a pH, 6,5 o marcador T está um pouco mais pronunciado que a pH 7, indicando esta mudança de equilíbrio e estando em concordância com a literatura (KILMARTIN, J.V. et al, 1981).

Estudos realizados com a Hb Malmo (H97 β G), que possui uma substituição homóloga àquela da Hb Chesapeake, ou seja, uma modificação na posição FG4 da cadeia beta, mostra que existe diferença em se substituir um resíduo nesta posição na cadeia alfa ou beta. Para esta Hb, a modificação maior ocorre na estrutura ligada, enquanto que na estrutura desoxigenada a proteína Hb Malmo seu espectro se sobrepõe ao da HbA. Funcionalmente, esta Hb possui afinidade aumentada, porém não tanto quanto a Chesapeake, estando intermediária a esta e a HbA (WIECHELMAN, K. V & HO, C. 1976).

Este comportamento denotaria que uma Hb que difere mais na estrutura desoxigenada que na ligada, teria afinidade mais alta que aquela que fosse mais similar na estrutura desoxigenada. Esta suspeita, levantada por HO, C. et AL, 1976 estaria de acordo com o fato das Hbs desArg, Chesapeake desArg e Chesapeake, que diferem mais na estrutura desoxigenada, terem afinidade altíssima e alta ao oxigênio. Aparentemente a perda do resíduo 141 α desloca o equilíbrio para a estrutura R de uma maneira mais pronunciada que a mutação no resíduo 92 α . Isso pode ser medido por uma maior similaridade das Hbs Chesapeake e J Cape Town à estrutura da HbA no estado desoxigenado do que as Hbs desArg e Chesapeake

desArg, esta última com ausência de marcadores de estrutura T, ainda no estado desoxigenado, além de perturbações na região da histidina proximal alfa.

A Hb J-Cape Town, possui maiores diferenças no estado ligado com as demais Hbs, apresentando o marcador T na situação ligada a CO e IHP (Figura 38). Esse comportamento indica uma cooperatividade maior para essa Hb do que para as demais, assim como uma afinidade mais próxima aquela da HbA. Essa Hb teria, portanto afinidade e cooperatividade intermediárias as demais e a HbA, conforme observamos nos resultados funcionais.

A afinidade estaria, portanto definida como: Hb Chesapeake desArg > desArg > Chesapeake > J Cape Town > HbA.

Este resultado está de acordo com nossos dados experimentais, assim como alguns relatos da literatura que indicam a Hb desArg com altíssima afinidade em relação a HbA; e a Hb Chesapeake com maior afinidade ao oxigênio em relação a Hb J-Cape Town. (WIECHELMAN, K. J. et al., 1976, KILMARTIN, J. V., 1981).

- Aspectos estruturais em função do cloreto

Os espectros obtidos com a Hb Chesapeake em D₂O permitiram o estudo e a comparação das histidinas de superfície com a HbA na presença e na ausência de cloreto.

Existem diversas diferenças estruturais entre as duas Hbs, localizadas em diversas regiões da proteína. A substituição das argininas causa modificações na molécula que influenciam inclusive as histidinas de superfície, no entanto parecem não modificar o bolsão do heme, uma vez que não acontece perturbação significativa nas valinas ligadas ao heme especialmente para a Hb Chesapeake.

Diferenças e semelhanças ocorrem tanto na variação de pH quanto na presença e ausência de cloreto. No estado desoxigenado, a Hb Chesapeake a pH 6,84 parece mais afetada pelo cloreto que a pH 7,02 e o mesmo ocorre no estado CO. Já o inverso parece ocorrer com a HbA. A Hb Chesapeake tem as ressonâncias em pH 7,02 muito parecidas na presença e na ausência de cloreto.

Algumas modificações são padrão para as duas Hbs, tais como a junção das ressonâncias 4+4' na ausência de cloreto. Na estrutura desoxigenada as histidinas de 7 a 10 e na estrutura CO as histidinas de G, Y, J, I, K e L são afetadas tanto pela espécie de proteína quanto pelo cloreto e pH. Assim, ficaram difíceis de serem demarcadas com certeza. No entanto para efeito de comparação podemos analisar essas ressonâncias também.

As histidinas de superfície da Hb Chesapeake diferem em seus deslocamentos químicos, assim como a HbA, na presença ou ausência de cloreto. Isto é de se esperar, uma

vez que a presença de cloreto muda o ambiente eletrostático da solução, modificando as ressonâncias, que são bastante sensíveis ao tampão. Estudos realizados em tampão fosfato têm ressonâncias diferentes daquele realizado em tampão HEPES, por exemplo.

Em estudos anteriores, a demarcação das histidinas de superfície, bem como o valor de pK e a contribuição na liberação de prótons para a HbA foram estudados principalmente a partir da deleção de cada resíduo separadamente. Para cada novo mutante foram realizados estudos funcionais de efeito Bohr e de ^1H RMN; assim, a partir dos pKs encontrados foi possível determinar a contribuição (tanto positiva quanto negativa) de cada um desses resíduos na liberação de prótons para cada situação. (ver, por exemplo, BUSCH, M, R, et al, 1991).

Uma comparação dos resultados de efeito de cloreto da Hb Chesapeake e HbA não mostram modificações tão significativas e reforçam a proposta de que o efeito Bohr macroscópico é resultado de uma soma de pequenas modificações de pK de vários grupos espalhados pela proteína.

VI – CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- 1- A Arg 92 é um sítio específico de ligação de cloreto, uma vez que na ausência deste resíduo as Hbs modificadas não apresentam a estrutura Tx (T ligada a ânions), sendo a transição desoxi-oxi dada por To-R, fato observado pela variação de hidratação. Outra evidência se encontra nos resultados de efeito Bohr, que mostram que na ausência da Arg 92, na presença de cloreto, a oxigenação se caracteriza pela liberação de apenas 1 próton, enquanto a HbA libera 2 prótons.
- 2- A supressão das argininas 141 α e 92 α não modifica o efeito Bohr na ausência de ânions. Já na presença de cloreto, ambos resíduos influenciam na liberação de prótons. O resíduo Arg 141 exerce um papel na regulação do efeito Bohr na presença de cloreto, impedindo provavelmente a liberação do próton terciário (Tx – To), de forma que para a Hb desArg ocorra apenas a liberação do próton quaternário (To –R)
- 3- Na presença de IHP, as Hbs modificadas tem seu valor de p₅₀ e n₅₀ aumentados, indicando que este anion trava as proteínas no estado T, da mesma forma que ocorre com a HbA, a exceção da Hb Chesapeake desArg. Para esta Hb não há uma modificação significativa no valor de p₅₀ e n₅₀, indicando que a supressão das duas argininas diminui o efeito deste ânion.
- 4- Aspectos estruturais das proteínas estudadas no trabalho confirmam a alta afinidade das Hbs modificadas e sugerem que as Hbs com mutação na Arg 141 possuem o equilíbrio deslocado para a estrutura R, sendo portanto Hbs de maior afinidade. As mutantes apenas da posição 92 também tem afinidade maior ao oxigênio, em relação a HbA, porém a afinidade e cooperatividade são definidas pela natureza do resíduo. A seqüência de afinidade seria dada por: Hb Chesapeake desArg > Hb desArg > Hb Chesapeake > Hb J Cape Town > HbA
- 5- Os resultados concordam com a sugestão de que Hbs com maior semelhança na estrutura ligada que na desoxigenada possuem maior afinidade ao oxigênio e mostram que a substituição do resíduo Arg 92 afeta diversas regiões da molécula.
- 6- A presença de cloreto em solução modifica as ressonâncias das histidinas de superfície, porem não altera consideravelmente as regiões dos grupos heme. Isso

sugere que o deslocamento das histidinas com as mudanças do meio não determina a ligação de ânions direta à proteína. A influência do cloreto no efeito Bohr, é provavelmente devida a pequenas modificações de grupos espalhados pela molécula.

6.1) Próximos passos

Estudos de RMN na presença de tampão HEPES e ausência de íons fosfatos devem ser realizados para o maior entendimento estrutural das proteínas modificadas, já que na presença de tampão fosfato a estrutura Tx está estabilizada. Em relação a novas proteínas, um mutante híbrido mantendo a arginina 92 (possível sítio de ligação de cloreto) em um dímero e trocado em outro dímero, poderia prover mais evidências da regulação de cloreto, em termos das propriedades de afinidade e cooperatividade das subunidades.

Outros estudos interessantes poderiam explorar o papel da arginina 141 no efeito Bohr, assim como efeitos de IHP na Hb Chesapeake desArg.

VII - REFERÊNCIAS

- ADAIR,G. "The Hemoglobin System.VI. The Oxygen Dissociation Curve Of Hemoglobin." **Journal of Biological Chemistry** 63(2).529-545, 1925
- ANTONINI, E., et al. "Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobin." **J Biol Chem** 236: PC60-PC63, (1961).
- ANTONINI, E. e BRUNORI, M. "Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands" Amsterdam., 1971
- BALDASSARRE, J.J.; CHARACHE,S; JONES,R.T. e HO,C. " Electron paramagnetic resonance studies of spin-labeled hemoglobins, II-Roles of subunit interactions and of Intermediate structures in the cooperativity oxygenation of hemoglobin and the results on hemoglobin Yakina, J-Cape Town and carboxypeptidases A and B treated HbA" **Biochemistry** 9, n24: 4707-4713, 1970
- BALDWIN, J. M. "Structure and function of haemoglobin." **Prog Biophys Mol Biol** 29(3): 225-320,1975
- BARRICK,D., LUKIN,J. A., SIMPLACEANU,V. e HO,C. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Study of hemoglobin cooperativity" **Methods in Enzymology**, v 379 pp 28-56, 2004
- BENESCH,R.E., et al. "Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures." **Anal Biochem** 55(1): 245-8, 1973
- BENESCH,R. ., et al. " Cofactor binding and oxygen equilibria in haemoglobin". **Nature, New Biol.**, 234, 174-176, 1971
- BOHR,C.,HASSELBACH,K. e KROCH,A. "Ueber einen biologischen Beziehung wichtiger Einfluss den die Kohlensaurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung iibt" **Skand. Arch. Physiol.** 16, 401-412,1904
- BRUNO, S., et al. "High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin." **Protein Sci** 10(11): 2401-7. 2001
- BUSCH,M. R. e HO, C. " Effects of anions on the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin" **Biophysical Chemistry**, v 37 : 313-322, 1990
- CHARACHE, S., JENKINS, T. "Oxygen equilibrium of hemoglobin J Cape Town" **The Journal of Clinical Investigations**, V 50, 1554-1555, 1971
- CHIANCONE, E., et al. "Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of chloride binding to human oxy- and deoxyhaemoglobin." **J Mol Biol**,v 70(3): 675-88. 1972

- CHIANCONE, E., et al. "Identification of chloride-binding sites in hemoglobin by nuclear-magnetic-resonance quadrupole-relaxation studies of hemoglobin digests." **Eur J Biochem** 55(2): 385-90. 1975
- COLOMBO, M.F., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. "The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions." **J Biol Chem** 271(9): 4895-9. 1996
- COLOMBO, M.F., et al. "Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin." **Science** 256(5057): 655-9. 1992
- COLOMBO, M.F., et al. "Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allostereism." **Proc Natl Acad Sci** 91(22): 10517-20. 1994
- COLOMBO, M.F., SANCHES R. "Hydration-dependent conformational states of hemoglobin. Equilibrium and kinetic behavior." **Biophys Chem** 36(1): 33-9. 1990
- COLOMBO, M.F., SEIXAS F. A. V. "Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on O(2) binding." **Biochemistry** 38(36): 11741-8. 1999
- DAVIS, D.G.; LINDSTROM, T.R.; MOCK, N.H.; BALDASSARRE, J.J., CHARACHE, S. e Ho, C. "Nuclear Magnetic Resonance Studies of hemoglobins VI- Heme proton spectra of human deoxyhemoglobin and their relevance to the nature of co-operative oxygenation of hemoglobin" **Journal of Molecular Biology**, v60, 101-111, 1971
- EATON, W.A., HENRY E.R., HOFRICHTER, J., MOZZARELLI, A. "Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?" **Nat Struct Biol**, 6, 351-358, 1999
- FANG, T.Y. ; ZOU, M. ; SIMPLACEANU, V., HO, N., HO, C. « Assessment of role of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect of beta 143 histidine in the binding of 2,3 FPG in human normal adult hemoglobin . » **Biochemistry**, v 38, n40 13423-13432, 1999
- FANG, T.Y. ; ZOU, M. ; SIMPLACEANU, V. HO, N., HO, C. An additional H-bond in the alpha1beta2 interface as the structural basis for the low oxygen affinity and high cooperativity of a novel recombinant hemoglobin (beta L105W). **Biochemistry**, v 39, 13708-13718, 2000
- FASAN, G., GRANDGEORGE, M., VIGNERON, C., DELLACHERIE, E. "Preparation of unaltered hemoglobin from human placentas for possible use in blood substitutes". **J Biochem Biophys Methods**; 23: 53-66, 1991
- FRONTICELLI, C., BUCCI, E. "Conformational and functional characteristics of bovine hemoglobin." **Methods Enzymol**, 231: 150-63. 1994
- FRONTICELLI, C., et al. "Solvent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. Sensitivity of bovine hemoglobin to chloride ions." **J Biol Chem** 259(17): 10841-4. 1984

- FRONTICELLI, C., et al. "Allosteric modulation by tertiary structure in mammalian hemoglobins. Introduction of the functional characteristics of bovine hemoglobin into human hemoglobin by five amino acid substitutions." **J Biol Chem** 270(51): 30588-92. 1995
- GARRETT, R. H., GRISHAM, C. M. "**Biochemistry: Enzyme specificity and allosteric regulation**". Orlando, Saunders College Publishing. 1995
- GRAY, R. D.; GIBSON, Q. H. "Binding of carbon monoxide to alpha and beta chains in tetrameric mammalian hemoglobin" **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 5176, 1971.
- HALDANE, J. & LORRAIN-SMITH, J. **J. Physiol.** 20,497-520 1895.
- HILL, A. V. "The combination of hemoglobin with oxygen and with carbon monoxide." **Biochem. J** v. 7: 471-480, 1913.
- HO, C. **Hemoglobin and oxygen binding**. New York, Elsevier Biomedical. 1982
- HO, C "Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hemoglobin: cooperative interactions and partially ligated intermediates" **Advances in Protein Chemistry**,_v 43 :153-312, 1992
- HO, C. "Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Hemoglobin." **Methods in Enzymology**, v 232: 97-139, 1994
- HO, C.; RUSSU, I. M.; "How much do we know about the Bohr effect of hemoglobin?" **Biochemistry**, v 26 n 20 : 6329-6305, 1987
- HO, C.; DAVIS, D.G.; MOCK, N.H.; LINDSTROM, T. R. e CHARACHE, S. "Nuclear Magnetic Resonance Studies of hemoglobin. IV- The structure function of human adult hemoglobins A and Chesapeake and its implication to the nature of oxygenation of hemoglobin" **BBRC**, v38, n 4 :779-786,1970
- HO, C ; LINDSTROM, T.R., ". Functional Nonequivalence of α and β Hemes in Human Adult Hemoglobin". **Proc Natl Acad Sci U S A.** 69(7): 1707-1710,1972
- HUI, H. L., et al. "Structural and functional properties of human hemoglobins reassembled after synthesis in Escherichia coli." **Biochemistry**, v38(3): 1040-9, 1999.
- IKEDA-SAITO, M. "Studies on cobalt myoglobins and hemoglobins. The effect of the removal of the alpha-141 arginine residue on the functional and electronic properties of iron-cobalt hybrid hemoglobins." **J Biol Chem**, v255(18): 8497-502, 1980.
- IMAI, K. "Analysis of ligand binding equilibria." **Methods Enzymol** 76: 470-86, 1981.
- IMAI, K. "Measurement of accurate oxygen equilibrium curves by an automatic oxygenation apparatus." **Methods Enzymol** 76: 438-49, 1981.

- IMAI, K. **Allosteric effects in haemoglobin**. Cambridge, University Cambridge Press, 1982.
- IMAIZUMI, K., et al. "The linkage between the four-step binding of oxygen and the binding of heterotropic anionic ligands in hemoglobin." **J Biochem** 86(6): 1829-40, 1979.
- JOSHI, A. A., MCDONALD M. J. "Role of alpha and beta carboxyl-terminal residues in the kinetics of human oxyhemoglobin dimer assembly." **J Biol Chem** 269(11): 8549-53, 1994.
- KAVANAUGH, J. S., et al. "Structure and oxygen affinity of crystalline desArg141 alpha human hemoglobin A in the T state." **J Mol Biol** 248(1): 136-50, 1995.
- KILMARTIN, J. V. . "Removal of Specific C-terminal residues from human hemoglobin using carboxypeptidases A and B". **Methods in Enzymology**. **76**: 167-171, 1981.
- KILMARTIN, J. V., et al. "Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin." **Biochemistry** 19(14): 3189-83, 1980.
- KILMARTIN, J. V. , ROSSI-BERNARDI. L. "The binding of carbon dioxide by horse haemoglobin." **Biochem J** 124(1): 31-45, 1971.
- LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature** 227(5259): 680-5, 1970.
- LAMAR, G.N. et al, "Assignment of proximal histidines proton NMR peaks in myoglobin and hemoglobin" **Biochem Biophys Resear. Comm**,77:104-110, 1977
- LESK, A. M., et al. "Haemoglobin: the surface buried between the alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 2 dimers in the deoxy and oxy structures." **J Mol Biol** 183(2): 267-70, 1985.
- LUFKIN, J A e HO, C. "The structure-function relationship of hemoglobin in solution at atomic resolution" **Chemical Reviews**, v 104: 1219-1230, 2004
- MARTA, M., et al. "Anionic binding site and 2,3-DPG effect in bovine hemoglobin." **Biochemistry** 37(40): 14024-9, 1998.
- MARKLEY, J., "Observation of histidine residues in proteins by nuclear magnetic resonance spectroscopy." **Acc Chem Res**, 8 : 70-80, 1975
- MATHEWS, C. K. ,VAN HOLDE, K. E. **Biochemistry**. New Jersey, Prentice-Hall Inc., 2000
- MATTHEW J.B., HANANIA G.I., GURD F.R. "Electrostatic effects in hemoglobin: Bohr effect and ionic strength dependence of individual groups." **Biochemistry**. v15;18(10):1928–1936, 1979
- MONOD, J., et al. "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model." **J Mol Biol** 12: 88-118, 1965.
- NAGEL,R. L., GIBSON, QH e Charache, S. "Relation between structure and function in hemoglobin chesapeake." **Biochemistry**, v 6 n 8: 2395-2402, 1967

- PERUTZ, M. F., et al. "A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin." **J Mol Biol** 233(3): 536-45, 1993.
- PERUTZ, M. F., et al. "The chloride effect in human haemoglobin. A new kind of allosteric mechanism." **J Mol Biol** v239(4): 555-60, 1994.
- PERUTZ, M. F. e LEHMANN, H. "Molecular pathology of human haemoglobin" **Nature**, v 219:902-909, 1968
- PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.; "Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model". **Nature**, 13;219(150), 131-139, 1968.
- PLATEAU, P., GUERON, M. "Exchangeable proton NMR without base-line distortion using new strong-pulse sequences." **J. Am. Chem. Soc.** 7310-7311, 1982.
- RIGGS, A. "Preparation of blood hemoglobins of vertebrates." **Methods Enzymol** 76: 5-29, 1981.
- RIGGS, A. F., "The Bohr Effect" **Annual Reviews**, 50: 181-204, 1988
- RUSSU, I.M. e HO, C. "Assessment of roles of beta 146 histidyl and other histidyl residues in the Bohr effect of human normal and adult hemoglobin" **Biochemistry**, v 25n7: 1706-1716, 1986.
- RUSSU, I.M., HO, N e HO. C. "Role of the .beta.146 histidyl residue in the alkaline Bohr effect of hemoglobin" **Biochemistry**. 19, 1043-1052, 1980
- SAHU, C.S., et al "Insights into the Solution Structure of Human Deoxyhemoglobin in the Absence and presence of Allosteric Effector" **Biochemistry** v46, 9973-9980, 2007.
- SALVAY, A. G., et al. "The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin." **Biophys J** 84(1): 564-70, 2003.
- SEIXAS, F. A., et al. "Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A(0) fully stripped of any anions." **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr** 55(11): 1914-6, 1999.
- SEIXAS, F. A. V. Influência De Cloreto, 2,3DPG, ATP E IHP Na Estrutura E Função Das Hbs Humana E Bovina. Estudos Termodinâmicos E Cristalográficos. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.: 135, 2002.
- SHEN, T.-J., et al "Production of unmodified human adult hemoglobin in Escherichia coli." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v90, 8108-8112, 1993.

- SHEN, T.-J., et al "Production of human normal adult and fetal hemoglobins in *Escherichia coli*." **Protein Engineering**, 1085-1097, 1997.
- SHIBAYAMA, N., SAIGO S. "Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels." **J Mol Biol** v251(2): 203-9, 1995.
- SILVA, M. M., et al. "A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution." **J Biol Chem** v267(24): 17248-56, 1992.
- STRYER, L., TYMOCZKO, J. L., BERG, J.M., "Bioquímica" 6 edicao, Ed. Guanabara, RJ, 2008
- TAKAHASHI, S., LIN, A.K., AND HO, C. "Proton nuclear magnetic resonance studies of hemoglobins M Boston (α58E7His->Tyr) and M Milwaukee (β67E11 Val->Glu): Spectral assignments of hyperfine-shifted proton resonances and of proximal histidine(E7) NH resonances to the alpha and beta chains of HbA." **Biochemistry**, 19, 5196-5202, 1980
- TOSQUI, P "O papel do cloreto na estabilização de um novo estado alostérico das hemoglobinas S e des-Arg humanas e hemoglobina bovina" (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 100p, 2005
- TCS Corporation. Instructon Guide to HEMOX, 1995
- TSAY, C.H.; SHEN, T.J., HO, N. e HO, C. " Effects of substitution of lysine and aspartic acid for asparagines at beta 108 and of tryptophan for valine at alpha 96 on the structural and functional properties of human normal adult hemoglobin: roles of alpha1beta1 and alpha1beta2 subunit interfaces in the cooperative oxygenation process" **Biochemistry**, v 38, n 27: 8751-8761, 1999
- VAN BEEK, G. G. M., ZUIDERWEG, E. R. P. & DE BRUIN, S. H. " The Binding of Chloride Ions to Ligated and Unligated Human Hemoglobin and Its Influence on the Bohr Effect" **Eur. J. Biochem.** 99, 379-383, 1975.
- VAN HOLDE, K. E. J., **Principles Of Physical Biochemistry**. New Jersey, Prentice-Hall Inc., 1998
- VOET, D.; VOET, J. C. **Biochemistry**. 2.ed. Toronto: John Wiley & Sons,. p.215-250, 1995.
- WIECHELMAN, K. J.; FAIRBANKS, V.F. e HO, C. "Proton nuclear magnetic resonance studies on hemoglobin Malmo: implications of mutations at homologous mutations of the alpha and beta chains" **Biochemistry**, v15, n 7:1414-1420, 1976.
- WILLIAMS, R. C. & TSAY., K. "A convenient chromatografic method for the preparation of human hemoglobin." **Anal. Biochem.** v. 54: 137-145, 1973.

WYMAN, J., Jr. "Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look." **Adv Protein Chem** 19: 223-86, 1964.

YONETANI, T., et al "Global Allostery Model of Hemoglobin" **Journal of Biological Chemistry**, v 277, 34508 – 34520, 2002.

APÊNDICE A**PROTOCOLO DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE HBS RECOMBINANTES DE ACORDO COM O LABORATÓRIO DE HEMOGLOBINAS, CMU****Expressão das Hbs recombinantes:**

DIA 1: Proceder com a transformação a partir de células competentes. Crescer 1 ml de culturas em meio LB e inocular Placas de Petri (meio LB + Agar), deixar ON a 37°C

DIA 2: As culturas devem ter crescido durante a noite. Preparar 5 ml de meio LB e a partir das colônias formar eppendorfs com diferentes diluições. Colocar no shaker, a 37°C por 2 horas e checar a OD em 600 nm. A cultura com maior OD passamos agora para um erlenmeyer de volume 150 ml, com 25ml de Minimal Médium. Deixar no shaker a 32 °C, ON (300 rpm)

DIA 3 : Checar a OD do que cresceu. A partir deste valor, calculamos quanto colocar para que em 150 ml tenha um OD inicial de 0.1 a 0.2 (a diluição será mais ou menos 1/60 ou 1/30) Para 3 ml, adicionar 150ml de Minimal Medium + 0,4g de ampicilina e deixar ON no shaker a 32°C novamente, em erlenmeyers de 1L

Dia 4: Com as soluções já preparadas, adicionar a cultura e os tampões ao fermentador. Determinar os parâmetros e deixar ON.. Parâmetros: Temp: 28graus, Agit: 350 rpm, pH: 6,85, po2: cycle 0.15m/s, pulse: 00:10m/s se nsi:03,airel: 4L/min

Dia 5: Checar o consumo de glicose, O₂ e pH e acrescentar a segunda dose de hemina. Monitorar o crescimento pela OD, quando chegar em 7, induzir a expressão adicionando IPTG. Após 7 horas de indução, iniciar a centrifugação.

SOLUÇÕES:

Para 20 L de cultura usar: 1,4 g de ampicilina sódica, 0,43 g de IPTG e 0,45 g de hemina
Meio LB: Para 1L = 10g de triptona, 5g de yeast extract, 10 g de NaCl, ajustar pH para 7 com NaOH.

SOLUÇÕES PARA AUTOCLAVAR:

A) TAMPÃO FOSFATO, fazer 2L

77,9 g de K₂HPO₄ (MW:136,09)
204,75g de H₂O (MW:18,02)

B) TAMPÃO SO₄, fazer 2L

38 g de (NH₄)₂SO₄ (MW: 132,14)
28,5 g (Na₃ citrate)H₂O (MW:294,1)
1,43g de (MgSO₄) (MW: 120,37)

C) 20% GLICOSE (190g de dextrose) 950 ml

D) 25% GLCOSE (500g de dextrose) 2000 ml

Meio minimo

100ml do tampão fosfato ;100 ml do tampão sulfato ;20 ml da solução de 20% glicose
Metals: 3 ml; Vitaminas: 2,5ml; Thiamina: 2 ml;H₂O: 792,5 ML

Abaixo as composições:

Metal		PM			57ml	Metal Stock
FeCl ₃ .6H ₂ O	Ferric Chloride	270.3	Rm 647	0.45mM		149.8mM=40.5g/L
ZnCl ₂	Zinc Chloride	136.28	Rm641	0.029mM		9.5mM=1.3g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cobalt(ous) Chlori	237.93	Rm641	0.025mM		8.4mM=2.0g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sodium Molybdate dihydrate	241.9	Rm641	0.025mM		8.3mM=2.0g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	Calcium Chloride dihydrate	147.026	Rm647	0.020mM		6.8mM=1.0g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	Cupric Sulfate	249.68	Rm 647	0.015mM		5.1mM=1.27g/L
H ₃ BO ₃	Boric acid	61.83	Rm 647	0.024mM		8.1mM=0.5g/L
HCl	Hydrochloric acid		Rm 647	0.3ul/ml		100ml/L

Vitamin Stock					47.5ml	Vitamin Stock Sigma-Aldrich M 6895 MEM [100X]
NaCl	Sodium Chloride		Rm 647	145mM		8.5g/L
D-capantothenate	D-Pantothenic Acid-1/2Ca			0.25ug/ml		0.1g/L
Choline chloride				0.25ug/ml		0.1g/L
Folic acid				0.25ug/ml		0.1g/L
Myo-inositol				0.50ug/ml		0.2g/L
Nicotinamide				0.25ug/ml		0.1g/L
Pyridoxal-HCl				0.25ug/ml		0.1g/L

Ao final da expressão centrifugar até ficar com a massa celular.

Usamos os tubos de 1L na Sorvall 4 graus e 6500rpm 15min (rotor SLC4000)

Usamos tubos de 0,5L na Beckman (J2-MC) 4 graus e 8000rpm 10 min

Ao final medir a quantidade de massa celular:

Para guardar estocar no -80°C até a purificação

Rendimento de cada amostra em massa celular:

Chesapeake: 746 gramas purificando 250g rendeu 70ml de proteína a 20mg/ml

Chesapeake desArg: 653,47gramas

Cape Town:778,57 g

desArg: 789,87 g

Purificação de rHbs:

Para cerca de 250g de massa celular.

Dia 1:

1 – Adicionar 4ml de tampão de lise (40 mM Tris-HCl, pH 8.6 e 1mM benzamidinea,) por grama de massa celular, re-suspender em pulsos gentis.

2 – Levar para homogeneizar (Homogeneizador Avestin, EmulsiFlex-C5) em pressão entre 15000 e 20000 psi, a 4°C

3- Centrifugar 2:30h em Centrifuga Beckmann rotor J414 por 13500 rpm (4 graus)

4 – Recolher sobrenadante e submeter a CO, neste ponto pode-se fazer o teste PEI (Polyethyleneimine) em parte da amostra para checar a estabilidade da amostra. Se o SN for escuro e o precipitado claro indica uma boa expressão.

DIA 2:

1- Acrescentar solução PEI 10% (cerca de metade do volume total), sob agitação e no gelo

2- Centrifugar em centrífuga Sorvall por 30 minutos a 4 graus e 10000rpm

3 -Retirar o SN, que deve estar bem vermelho, e colocar em Vivaflow (Millipore) para concentração, até 200 mL

4 - Ao chegar em 200mL passar no Vivaflow o Q-Buffer (tampão da coluna Q: 20 mM Tris-HCl + 0.5mM EDTA + pH 8.5) para equilibrar. O tampão tem que estar filtrado em vácuo, o fluxo de entrada deve ser igual ao de saída agora, pois não vamos mais variar o volume.

5 – Deixar dialisando ON (no mesmo tampão para separar o precipitado) a 4°C

DIA 3:

1 - Após retirar do saquinho, centrifugar para separar alguns precipitados. (Beckman 30min, 10000rpm). Checar pH e condutividade novamente. (pH deve ser 8,4 e condutividade menor que 1)

2 - Aplicar na coluna Q (RESINA Q SEPHAROSE), equilibrada com tampão Q.Passar o tampão e checar a Abs em 260nm para ver toda a saída do DNA.

3 - Quando o DNA for eliminado, começar a eluição com tampão de eluição pH 6.6.

4 - Após a eluição, checamos a concentração.

5 – Concentrar no Stirred Cell até o volume chegar em 50ml

6 - A esta quantidade de amostra, adicionamos 3x a concentração de K_3FeCn_6 (estoque de 2.4mg ml) Deixar agitar por 1 hora.

7 - Preparar a coluna com resina G25 para filtrar o K_3FeCn_6 da Hb. Eluir com tampão fosfato de sódio 50mM a pH 6,8

Dia 5:

1 - Reconcentrar a metHb até 50ml novamente

2 - Aplicar ditonito de sódio (a mesma quantidade de K_3FeCn_6), sob agitação a reação é instantânea

3 - Aplicar na mesma coluna (já limpa) e separar o ditonito pelo peso molecular (ele ficará preso, passando o mesmo tampão)

4 - Ao final acertar o volume, aplicar no superloop e colocar no FPLC

5 - O gradiente no FPLC começa em 5% de B e vai ate 45% B (básico)para ver qual gradiente a Hb desprende da coluna. Acompanhando no gráfico de Abs, podemos ver a fração principal a certa porcentagem de B. Assim determinamos fluxo de começo e fim de gradiente de B. O fluxo de passagem e de 4ml/min. Para lavar e equilibrar são 6ml/Mn A coluna utilizada é Mono-S

6 - Ao final de coletar as amostras, novamente passar no CO, concentrar se for preciso e armazenar em nitrogênio líquido.

Characterization and oxygen binding properties of des-Arg human hemoglobin

P. Tosqui¹, C.R. Bonini-Domingos² and M.F. Colombo¹

¹Departamento de Física, ²Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Correspondence to: P. Tosqui, Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, 15054-000 São José do Rio Preto, SP, Brasil
E-mail: pritosqui@gmail.com

The role of chloride in the stabilization of the deoxy conformation of hemoglobin (Hb), the low oxygen affinity state, has been studied in order to identify the nature of this binding. Previous studies have shown that arginines 141 α could be involved in the binding of this ion to the protein. Thus, des-Arg Hb, human hemoglobin modified by removal of the α -chain C-terminal residue Arg141 α , is a possible model for studies of these interactions. The loss of Arg141 α and all the salt bridges in which it participates is associated with subtle structural perturbations of the α -chains, which include an increase in the conformational flexibility and further shift to the oxy state, increasing oxygen affinity. Thus, this Hb has been the target of many studies of structural and functional behavior along with medical applications. In the present study, we describe the biochemical characterization of des-Arg Hb by electrophoresis, high-performance liquid chromatography and mass spectroscopy. The effects of chloride binding on the oxygen affinity and on the cooperativity to des-Arg Hb and to native human hemoglobin, HbA, were measured and compared. We confirm that des-Arg Hb presents high oxygen affinity and low cooperativity in the presence of bound chloride and show that the binding of chloride to des-Arg does not change its functional characteristics as observed with HbA. These results indicate that Arg141 α may be involved in the chloride effect on Hb oxygenation. Moreover, they show that these residues contribute to lower Hb oxygen affinity to a level compatible with its biological function.

Key words: des-Arg hemoglobin; Oxygen affinity

Part of a Master's thesis presented by P. Tosqui to the Graduate Program in Molecular Biophysics, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Research supported by CNPq and FAPESP.

Received September 3, 2008. Accepted March 16, 2009

Introduction

Hemoglobin (Hb) is an allosteric protein found mainly in red cells whose main function is to deliver oxygen from the lungs to the tissues. Hbs are tetrameric and are composed by two α -chains and two β -chains, each containing a heme group to which a single oxygen molecule binds reversibly (1). To perform its function, Hb assumes different structural conformations with distinct O₂ affinities. The shift between these states is regulated by the presence of allosteric effectors such as organic phosphates and monovalent anions. These anions preferentially bind to the deoxy form (T-state), increasing the stability of the low-

affinity T-state compared to the high-affinity R-state, thus increasing p₅₀, the O₂ pressure at half saturation (2). In human red cells, 2,3-diphosphoglycerate is the main allosteric effector of hemoglobin A (HbA), whose binding has been very well described in the literature. This phosphate has high affinity for HbA, with binding occurring at a very specific site that consists of eight cationic residues located in the central cavity of the protein (3). However, it has been shown that HbA also binds monovalent anions that also stabilize the deoxy form, reducing its affinity for O₂. The most abundant of these physiological ions is the chloride ion (4).

The nature of the chloride modulation of Hb affinity for

O₂ has been the object of many studies in the past years, but no consensus has been reached about how this binding occurs. First it was suggested that this binding would involve specific sites, i.e., the N-terminal Val 1 β 2 and the guanidine group of Arg 141 α 1, the C-terminal residue (5-7). In other studies, Perutz et al. (8) proposed that the binding of chloride to Hb is not specific but is due to the opening of the central cavity during the T-R transition, in which the positively charged amino acids would attract the anions. In more recent studies, Fronticelli et al. (9), comparing human and bovine Hb, again identified specific chloride binding sites, justifying their findings about the different affinities of the two Hbs for oxygen (9-11).

In 1999, Hui et al. (12) proposed Arg141 α 1 and Arg141 α 2 as the chloride binding sites based on the comparison of crystallographic structure maps of deoxy HbA and chemically modified Hbs. Crystallographic studies carried out by our research group have also identified these arginines as chloride sites. This evidence was obtained by analyzing maps of different electronic densities of deoxy Hb crystallized in the total absence of anions and in the presence of high chloride concentrations. In the same study, arginines 92 α 1 and 92 α 2 were also identified as these possible sites. These four sites follow the chloride binding pattern identified for other proteins (Seixas FAV, Colombo MF, unpublished results).

des-Arg Hb, that loses Arg141 α 1 and Arg141 α 2, the presumed sites of chloride binding, is found *in vivo* in the placenta, where the carboxypeptidase-M enzyme, present in the microvillous syncytiotrophoblast, removes the arginine residues (13).

These residues play an important role in stabilizing the T structure by interaction with other amino acids. Arginine 141 α forms salt bridges with Lys127 α 2, Asp126 α 2, and Val α 2 (14,15), with a consequent increase in molecule flexibility that shifts the equilibrium to the high-affinity structure R and reduces the cooperativity value indicated by the Hill coefficient. Despite this structural alteration, there is no modification in the heme group region and the Tyr140 α residue is positioned in the same direction as in HbA (16). Because of these functional changes, des-Arg Hb has been used in vasoconstrictive studies and in the development of blood substitutes (17).

The connection of this structural and functional behavior in Hbs, possibly modulated by chloride binding, has led us to study the biochemical and functional properties of des-Arg Hb. One approach to the elucidation of this matter is to perform comparative studies of human Hb and chemically modified des-Arg Hb, obtained by the carboxypeptidase-B (CPB) hydrolysis, which specifically removes the 141 α 1 and 141 α 2 arginine residues (18).

Material and Methods

A blood sample was collected from a healthy non-smoking adult male by venipuncture using a heparinized syringe, after obtaining written informed consent. The purification procedure followed the method previously described by Colombo and Bonilla-Rodriguez (19), based on the protocol of Williams and Tsay (20) and was monitored by non-denaturing PAGE. The purified HbA was extensively deionized by several passages through an Amberlite MB-1 column.

des-Arg Hb was obtained from HbA by enzymatic cleavage, as previously described in the literature (21-24). C-terminal residues were removed by the digesting chains with CPB (grade COBC, Worthington, USA) in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, at an enzyme to substrate weight ratio of 1:100 at room temperature for approximately 2 h. The modified Hb was purified by gel filtration through a Sephadex G-25 (PD-10 column, GE Healthcare, USA) equilibrated with 10 mM HEPES-NaOH buffer, pH 6.9, for the removal of free arginine residues.

Once the arginine residues were removed from the solution, the sample was purified chromatographically on an ion-exchange column using DEAE A50 Sephadex, equilibrated with 10 mM HEPES-NaOH containing 0.1 M NaCl buffer, pH 7, for separation of des-Arg Hb from the CPB, on the basis of their isoelectric points: (pI = 7.1 for Hb vs pI = 6.0 for CPB) (25,26). HbA and des-Arg Hb were concentrated using Amycon concentrators and stored in liquid nitrogen until use.

The efficiency of the CPB hydrolysis was checked by ESI-Q-TOF mass spectrometry using a Q-TOF Micro apparatus equipped with an electrospray ionization source operated in the positive or negative ion mode. Samples were diluted in 50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid in ultrapure water and applied to the equipment using a syringe pump at a flow rate of 5 μ L/min. This procedure permits comparison of the molecular mass of Hb and the products. The difference in mass can be used to identify amino acids released by CPB treatment.

des-Arg Hb was characterized by electrophoretic methods and chromatography.

Isoelectric focusing

HbA and des-Arg Hb samples were analyzed by isoelectric focusing on agarose gel in the presence of the ampholytes, forming a linear pH gradient. The gel was positioned in a horizontal direction and placed on a cool platform. Electrolyte strips saturated with 1 M phosphoric acid and 1 M sodium hydroxide were placed at the anode and cathode extremes of the gel, respectively. The plati-

num electrode connected to the gel maintains the gel in contact with the electronic apparatus. The samples were applied to the center of the gel and subjected to an electrical field of 8 A, with a cathode and an anode pole at each extreme of the gel.

Electrophoretic methods

The HbA and des-Arg Hb samples were characterized by electrophoresis at alkaline pH on cellulose acetate with Tris-EDTA-boric acid (TEB) buffer at pH 8.6, and at acidic pH on agar gels (Oxoid, UK) with phosphate buffer at pH 6.2, as described by Bonini-Domingos (27).

Globin chain analysis

The α - and β -globin chains were separated by the urea-2 mercaptoethanol method and analyzed by electrophoresis in TEB at alkaline pH 8.6 on acetate cellulose according to the method described by Schneider (28). Acidic pH electrophoresis was carried out on cellulose acetate at pH 8.7 in TEB-urea-2 mercaptoethanol buffer and on a 12% polyacrylamide gel with 5% acetic acid buffer. When the electrophoresis was completed, amido black on Coomassie blue staining was used to detect protein, followed by destaining with 7% acetic acid and 30% methanol solution (29).

High-performance liquid chromatography

Hb and des-Arg Hb were separated on the basis of their ionic interactions with the cationic column by elution with two sodium phosphate buffers to form a pH gradient of increasing ionic strength. The apparatus contains 3 x 0.46-cm nonporous cation exchange resin, which was eluted at 2 mL/min (30). The elution profile of the column was standardized for quantitative screening of Hb variants using the heterozygote β thalassemia kit (BioRad, USA), containing the Hbs A2/F patterns, which allows the quantification of Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S, and Hb C. Protein elution was monitored inline by absorbance measurements at 415 and 690 nm as a function of time.

Oxygen binding curves

Oxygen binding experiments were performed with 60 μ M (heme) Hb in 10 mM HEPES-NaOH buffer, pH 7.2, at room temperature by the tonometric-spectrophotometric method (31). The protein concentrations were estimated using the extinction coefficients reported by Benesch et al. (32). Oxygen binding curves were measured in the presence and in the absence of 100 mM NaCl, and the functional parameters p_{50} and Hill's coefficient (n_{50}), a measure of cooperativity, were calculated from the Hill Plot by linear regression near half saturation.

Results and Discussion

HbA and des-Arg Hb (prepared from the same Hb sample) were submitted to mass spectrometry in order to assess the efficiency of arginine release and to determine if the Hb and its products were homogeneous (Figure 1). The masses of the human Hb chains are 15126.38 Da for the α -chain and 15867.24 Da for the β -chain. The masses of the des-Arg Hb are 14970.74 ± 0.16 Da for the α -chain and 15867.36 ± 0.21 Da for the β -chain. When the mass of the des-Arg α -chain is subtracted from that of the HbA α -chain, the difference is 155.99. This corresponds to the mass of one arginine residue, 156.17 per α -chain. No significant quantities of other proteins or α -chains were detected.

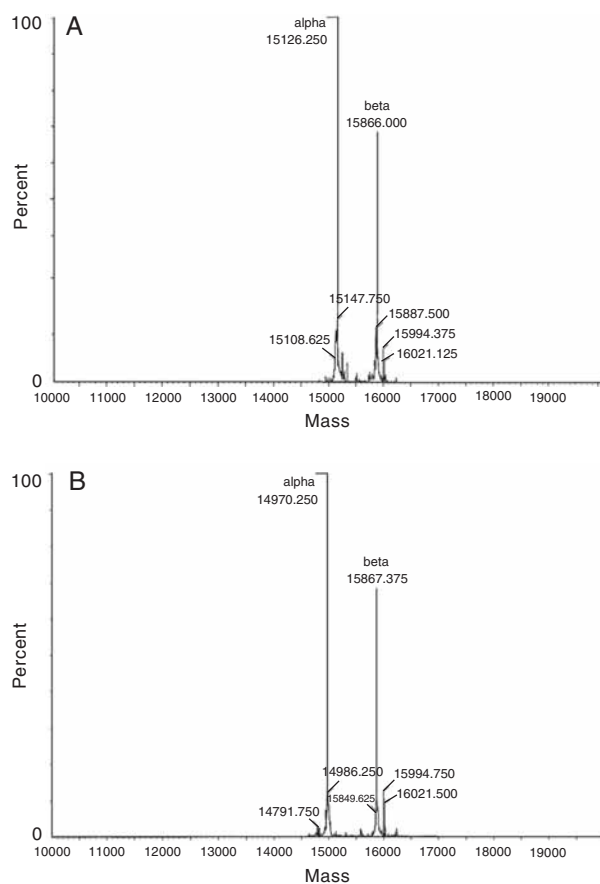


Figure 1. Mass spectrometric analysis of hemoglobin A (HbA), and des-Arg Hb. *A*, The masses of the HbA chains are 15126.38 Da for the α -chain and 15867.24 Da for the β -chain. *B*, The masses of the des-Arg Hb chains are 14970.74 ± 0.16 for the α -chain and 15867.36 ± 0.21 for the β -chain. The difference between the α -chains is ~ 156 Da, the exact mass of the arginine residue.

The methods used for the electrophoretic characterization of des-Arg Hb were those widely used in studies of Hb variants. The electrophoretic pattern of des-Arg Hb migration differs from that found for intact Hb. Figure 2 shows the

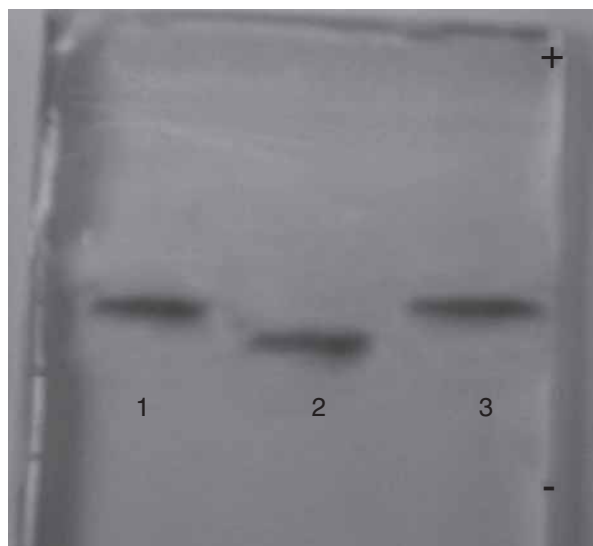


Figure 2. Isoelectric focusing of hemoglobin A (HbA) and des-Arg Hb. The volume applied for each sample was 10 μ L of the stock concentrations 7 mM/heme for des-Arg Hb and 11 mM/heme for HbA. *Lanes 1 and 3, des-Arg Hb; lane 2, HbA.* (+) = positive pole and (-) = negative pole. des-Arg Hb migrated more to the positive pole than HbA because of the loss of two positively charged arginine residues in each tetramer.

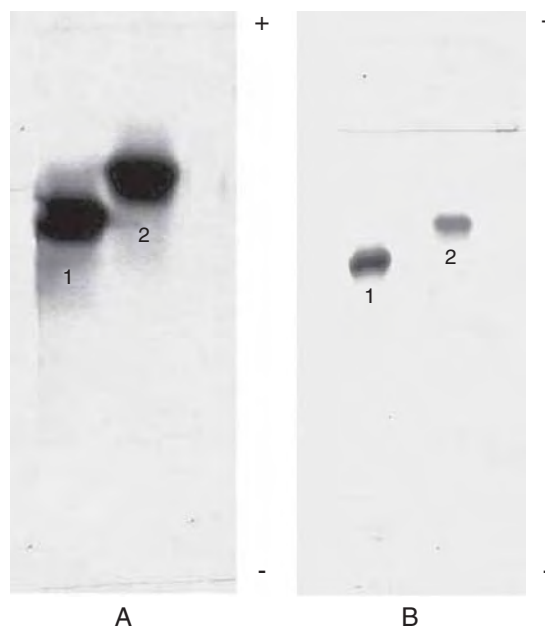
Figure 3. Electrophoresis of hemoglobin on cellulose acetate. *Lane 1, HbA; lane 2, des-Arg Hb.* *A,* Phosphate buffer, pH 6.2, stained with Coomassie blue. For each sample, 20 μ L of stock concentration of 11 mM/heme for HbA and 7 mM/heme for des-Arg Hb were applied. *B,* Tris-EDTA-boric acid buffer, pH 8.6, and Ponceau stain. For each sample, 15 μ L of stock concentration of 11 mM/heme for HbA and 7 mM/heme for des-Arg Hb were applied. The proteins migrate from the negative (-) to the positive pole (+) and in both cases des-Arg Hb migrated closer to the positive pole.

results of the isoelectric focusing experiment, which reveal a difference in the migration of the two Hbs. des-Arg Hb (lanes 1 and 3) migrates more towards the cathode than intact Hb (lane 2) due to the loss of two positively charged arginine residues.

Hb electrophoresis on cellulose acetate, using intact HbA (lane 1) as control and des-Arg Hb (lane 2) as the analyte, was performed both at acidic pH (6.2) and alkaline pH (8.6), as illustrated in Figure 3. The des-Arg Hb sample migrated towards the positive pole under both pH conditions, reaching a position closer to this cathodic region than the HbA sample. This fact can be explained as a consequence of the loss of two arginine residues with positive charges, leaving des-Arg Hb with a more negative charge than HbA.

Figure 4 shows the results of chain electrophoresis at acidic and alkaline pH. The α - and β -globin chains migrate towards the positive pole. The β -chains of HbA and des-Arg Hb are identical and therefore their migration profile was the same, whereas the α -chains had different patterns. The α -chain of des-Arg Hb migrated closer to the positive polar region than the α -chain of HbA due to the loss of the arginine residues, characterizing specific modification of the charge of the α -chain.

The HPLC chromatograms of Hb and des-Arg Hb are shown in Figure 5. des-Arg Hb is eluted at the position of the acetylated subfraction of HbA (P3). Acetylation of Hb eliminates to positive charges of lysines, residues at neutral pH, which makes the overall charge of the protein more



negative (33). The fact that des-Arg Hb presents the same chromatographic behavior as acetylated HbA is consistent with the loss of the positively charged residues by des-Arg Hb.

We determined the oxygen affinity of HbA and des-Arg Hb in the presence and in the absence of chloride ions (Figure 6). The lines through the experimental points represent the best non-linear fit of the parameters of the integrated Hill plot (which takes the functional form of the logistic equation) to the data. These parameters are shown

in Table 1.

The results show the different affinities for oxygen in each condition, represented by the sigmoidal adjustments of the curves. The oxygen binding curves are shifted to the left for des-Arg Hb in the absence and in the presence of chloride compared to the curves for HbA under the same conditions. This behavior shows that des-Arg Hb has a higher affinity for oxygen than HbA since the saturation of the protein requires a lower amount of oxygen than that needed for HbA, in both cases. Therefore, a lower p_{50}

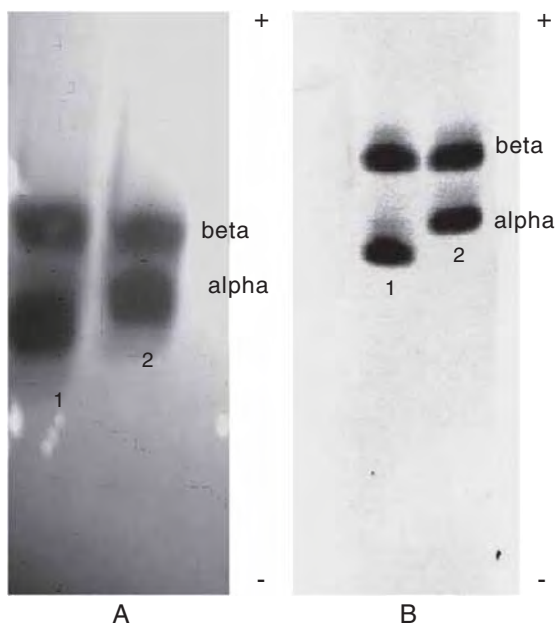


Figure 4. Globin chain electrophoresis. *Lane 1* indicates HbA and *lane 2* indicates des-Arg Hb. *A*, Tris-EDTA-boric acid (TEB) buffer, pH 5.0, on 12% polyacrylamide gel with 5% acetic acid buffer. For each sample, 3 μ L of stock concentration of 11 mM/heme for HbA and 7 mM/heme for des-Arg Hb were applied. The gel was stained with Comassie blue for protein detection. *B*, TEB buffer, pH 8.6, in cellulose acetate. For each sample, 50 μ L of stock concentration of 11 mM/heme for HbA and 7 mM/heme for des-Arg Hb were applied. The gel was stained with amido black for protein detection. Both electrophoretic runs were carried out in the presence of 8 M urea and 1 M mercaptoethanol. The chains migrate from the negative (-) to the positive (+) pole. The β chains of HbA and des-Arg Hb are identical; however, the α -chains present different patterns of migration, with des-Arg Hb being closer to the positive pole compared to the α -chains of HbA.

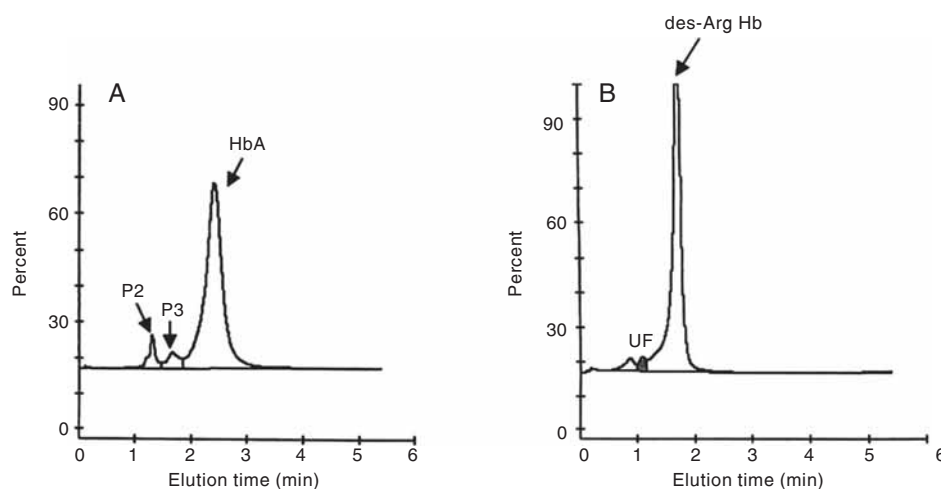


Figure 5. Cation exchange high-performance liquid chromatography of human Hb and the elution times (t). *A*, Chromatogram of HbA: t = 2.4. The glycosylated (P3): t = 1.66 and acetylated (P2): t = 1.3 forms of Hb are also shown. *B*, Chromatogram of des-Arg Hb, with the peak shifted to the acetylated fraction P3: t = 1.71. Also an unknown fraction (U): t = 0.88, and fetal (F): t = 1.81 Hb are present in small amounts.

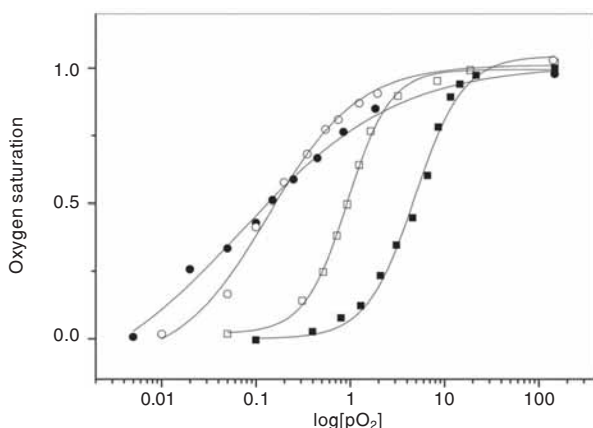


Figure 6. Oxygen binding curves of des-Arg Hb in 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.2, in the absence (open circles) and in the presence (filled circles) of 100 mM NaCl. HbA in 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.2, in the absence (open squares), and in the presence (filled squares) of 100 mM NaCl. All experiments were carried out with Hb concentration of 60 μ M/heme, at room temperature. All data curves were fitted with the best non-linear fit of the parameters of the integrated Hill plot, and the shift to the right of HbA (open and filled squares) indicates its lower affinity for oxygen compared to des-Arg Hb.

Table 1. Oxygen affinities and cooperativities of HbA and des-Arg Hb.

	HbA	des-Arg Hb
p_{50} (mmHg)		
- chloride	1.0 \pm 0.4	0.17 \pm 0.01
+ chloride	5.6 \pm 0.5	0.14 \pm 0.01
n_{50}		
- chloride	2.2 \pm 0.20	1.0 \pm 0.07
+ chloride	2.3 \pm 0.20	0.6 \pm 0.01

Data are reported as means \pm SD. p_{50} = oxygen pressure at half saturation; n_{50} = Hill's coefficient indicating the cooperativity; Hb = hemoglobin. The buffers used were 10 mM HEPES in the absence or in the presence of 100 mM NaCl, at pH 7.2 and 25°C. The hemoglobin concentration was 60 μ M/heme.

References

- Baldwin JM. Structure and function of haemoglobin. *Prog Biophys Mol Biol* 1975; 29: 225-320.
- Baldwin JM. A model of co-operative oxygen binding to haemoglobin. *Br Med Bull* 1976; 32: 213-218.
- Imai K. *Allosteric effects in haemoglobin*. Cambridge: Cambridge University Press; 1982.
- Antonini E, Brunori M. *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*. Amsterdam: Frontiers of Biology; 1971.
- Chiancone E, Norne JE, Forsen S, Antonini E, Wyman J. Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of chloride binding to human oxy- and deoxyhaemoglobin. *J Mol Biol* 1972; 70: 675-688.
- Chiancone E, Norne JE, Forsen S, Bonaventura J, Brunori M, Antonini E, et al. Identification of chloride-binding sites in hemoglobin by nuclear-magnetic-resonance quadrupole-relaxation studies of hemoglobin digests. *Eur J Biochem* 1975; 55: 385-390.

value for des-Arg Hb in all cases compared to the value for HbA indicates its high affinity for oxygen, which was confirmed for different concentrations of chloride (Tosqui P, Colombo MF, unpublished results).

Table 1 shows the p_{50} and the cooperativity (n_{50}) values for both hemoglobins in the presence and in the absence of chloride. Both Hbs show a higher affinity for oxygen in the absence of chloride, in agreement with the fact that chloride stabilizes the deoxy state. However, when we consider only the curves for des-Arg Hb, we notice that the results for the presence and absence of chloride are similar, a fact that could indicate the loss of chloride binding sites.

Taken together, the results show the characterization of des-Arg Hb, and reflect the structural change in the functional behavior of this Hb. The increased oxygen affinity is a consequence of the loss of stability of the deoxy-generated quaternary structure, in which the arginines play an important role. Furthermore, this shift of the equilibrium for the oxygenated state, in the absence and presence of chloride, could act together with the loss of possible binding sites of this anion.

The physiological mechanism of this interaction has not been fully elucidated, but the biochemical analysis of des-Arg Hb can be used to identify a pattern of high-affinity hemoglobins in clinical studies.

Acknowledgments

We thank Dr. Marcelo Matos Santoro, Universidade Federal de Minas Gerais, for help with the mass spectrometry measurements.

7. Kilmartin JV, Fogg JH, Perutz MF. Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. *Biochemistry* 1980; 19: 3189-3193.
8. Perutz MF, Fermi G, Poyart C, Pagnier J, Kister J. A novel allosteric mechanism in haemoglobin. Structure of bovine deoxyhaemoglobin, absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J Mol Biol* 1993; 233: 536-545.
9. Fronticelli C, Bucci E, Orth C. Solvent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. Sensitivity of bovine hemoglobin to chloride ions. *J Biol Chem* 1984; 259: 10841-10844.
10. Fronticelli C, Sanna MT, Perez-Alvarado GC, Karavitis M, Lu AL, Brinigar WS. Allosteric modulation by tertiary structure in mammalian hemoglobins. Introduction of the functional characteristics of bovine hemoglobin into human hemoglobin by five amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1995; 270: 30588-30592.
11. Marta M, Patamia M, Colella A, Sacchi S, Pomponi M, Kovacs KM, et al. Anionic binding site and 2,3-DPG effect in bovine hemoglobin. *Biochemistry* 1998; 37: 14024-14029.
12. Hui HL, Kavanaugh JS, Doyle ML, Wierzba A, Rogers PH, Arnone A, et al. Structural and functional properties of human hemoglobins reassembled after synthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1999; 38: 1040-1049.
13. Fasan G, Grandgeorge M, Vigneron C, Dellacherie E. Preparation of unaltered hemoglobin from human placentas for possible use in blood substitutes. *J Biochem Biophys Methods* 1991; 23: 53-66.
14. Kilmartin JV, Rossi-Bernardi L. The binding of carbon dioxide by horse haemoglobin. *Biochem J* 1971; 124: 31-45.
15. Ikeda-Saito M. Studies on cobalt myoglobins and hemoglobins. The effect of the removal of the alpha-141 arginine residue on the functional and electronic properties of iron-cobalt hybrid hemoglobins. *J Biol Chem* 1980; 255: 8497-8502.
16. Kavanaugh JS, Chafin DR, Arnone A, Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, et al. Structure and oxygen affinity of crystalline desArg141 alpha human hemoglobin A in the T state. *J Mol Biol* 1995; 248: 136-150.
17. Michel B, Igic R, Leray V, Deddish PA, Erdos EG. Removal of Arg141 from the alpha chain of human hemoglobin by carboxypeptidases N and M. *Circ Res* 1996; 78: 635-642.
18. Antonini E, Wyman J, Zito R, Rossi-Fanelli A, Caputo A. Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobin. *J Biol Chem* 1961; 236: C60-C63.
19. Colombo MF, Bonilla-Rodriguez GO. The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. *J Biol Chem* 1996; 271: 4895-4899.
20. Williams RC Jr, Tsay KY. A convenient chromatographic method for the preparation of human hemoglobin. *Anal Biochem* 1973; 54: 137-145.
21. Bonaventura J, Bonaventura C, Giardina B, Antonini E, Brunori M, Wyman J. Partial restoration of normal functional properties in carboxypeptidase A-digested hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 2174-2178.
22. Kilmartin JV. Removal of specific C-terminal residues from human hemoglobin using carboxypeptidases A and B. *Methods Enzymol* 1981; 76: 167-171.
23. Joshi AA, McDonald MJ. Role of alpha and beta carboxyl-terminal residues in the kinetics of human oxyhemoglobin dimer assembly. *J Biol Chem* 1994; 269: 8549-8553.
24. Englander JJ, Louie G, McKinnie RE, Englander SW. Energetic components of the allosteric machinery in hemoglobin measured by hydrogen exchange. *J Mol Biol* 1998; 284: 1695-1706.
25. Folk JE, Piez KA, Carroll WR, Gladner JA. Carboxy-peptidase B. 4. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J Biol Chem* 1960; 235: 2272-2277.
26. Wyman J Jr. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv Protein Chem* 1964; 19: 223-286.
27. Bonini-Domingos CR. *Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias*. 1st edn. São José do Rio Preto: Editora HN; 2006.
28. Schneider RG. Differentiation of electrophoretically similar hemoglobins - such as S, D, G, and P; or A2, C, E, and O - by electrophoresis of the globin chains. *Clin Chem* 1974; 20: 1111-1115.
29. Alter BP, Goff SC, Efremov GD, Gravely ME, Huisman TH. Globin chain electrophoresis: a new approach to the determination of the G gamma/A gamma ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Br J Haematol* 1980; 44: 527-534.
30. Papadea C, Cate JC. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. *Clin Chem* 1996; 42: 57-63.
31. Rossi-Fanelli A, Antonini E. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. *Arch Biochem Biophys* 1958; 77: 478-492.
32. Benesch RE, Benesch R, Yung S. Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal Biochem* 1973; 55: 245-248.
33. Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 466-469.