

Valmir Fadel

**Estrutura Cristalográfica da Hemoglobina
Isolada do Lobo Guará (*Chrysocyon brachiurus*)**





1910000927





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

VALMIR FADEL

ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA HEMOGLOBINA ISOLADA DO LOBO GUARÁ (*Chrysocyon brachiurus*).

**ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO JR.
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO O. BONILLA-RODRIGUEZ**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre em Física, área de concentração - Biofísica Molecular. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.



927/00

São José do Rio Preto - SP
2000

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CÂMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

AGRADECIMENTOS

PROCESSO Nº 0563/00
CANDIDATO: Valmir Fadel
ASSUNTO: Defesa de Dissertação de Mestrado
TÍTULO: "ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA HEMOGLOBINA
ISOLADA DO LOBO GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*)."

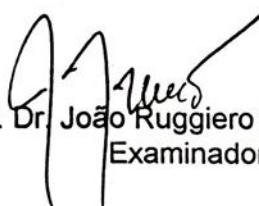
PARECER

A dissertação apresenta resultados cristalográficos interessantes sobre a estrutura da hemoglobina do lobo-guará. O candidato fez uma exposição sólida dos resultados e respondeu de forma segura a todas as questões levantadas pelos membros da banca. A dissertação está bem escrita e apresenta de forma coerente os resultados da pesquisa realizada pelo candidato. O candidato foi aprovado por unanimidade. Com distinção e louvel.

São José do Rio Preto, 28 de março de 2000.


Prof. Dr. Walter Figueira de Azevedo Junior
Presidente


Prof. Dr. Igor Polikarpov
Examinador


Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. pela orientação segura e dedicada na realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo na convivência diária e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo pela contribuição constante na elaboração e análise crítica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Johnny Rizzieri pela colaboração prestativa na análise deste trabalho no Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ruggiero pelo apoio prestado como Coordenador do Programa de Pós Graduação.

A todo o corpo docente do Departamento Física, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade e companheirismo, propiciando um ambiente de trabalho produtivo, harmonioso e acolhedor.

Aos colegas do Grupo de Biocristalografia: Carla, David, Fernanda, Henrique, Márcia e Plínio pela ajuda e harmoniosa convivência.

Aos colegas Adriana, Alexandre, Benatti, Bernadete, Cecília, Dulcinéia, Fábio, Fátima, Flávio, Gerson, Gláucia, Hamilton, Janaína, Milton, Neide, Norma, Osmar, Ocimar, Priscilla, Raquel, Renato, Ricardo, Rubens, Sandra, Selma pela gostosa convivência durante todo o tempo.

Meu muito obrigado, mais uma vez, aos amigos Fernanda e Flavio pela paciência, amizade por toda a ajuda.



Ao pessoal da linha de Cristalografia de Proteínas do LNLS pelo apoio e amizade durante as coletas de dados e cursos lá realizados: Dr. Igor Polikarpov, Dra. Paula Kuser, José R. Brandão Neto, Lee Wen Hwa. e Ricardo Aparício

Aos funcionários Barbosa, Ilva e Paulo pelo auxílio técnico prestado.

Aos membros do Grupo de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Física da Usp-São Carlos, por lá ter iniciado minha carreira científica, de onde possuo somente boas lembranças.

Aos meus pais José e Lourdes e meus irmãos Marli, Valdir, Valter e Valmor pelo apoio que sempre recebi, indispensável para ter chegado até aqui.

Aos meus amigos da graduação Mário e Márcio, da FEB Álvaro, Antônio, Caetano, Wagner e aos meus amigos Alfredo, Batata, Carmen, Cristina, Dory, Miro, Nelson, Sônia, Tereza e Zéca, pela amizade e pela confiança e apoio no cumprimento de mais esta etapa.

Ao meu filho Ian por ser quem é.



ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
OBJETIVOS	1
1 - INTRODUÇÃO ÀS HEMOGLOBINAS	2
Diferenças Estruturais entre oxiHb e desoxiHb	6
Mudanças na estrutura terciária entre a oxiHb e a desoxiHb	6
Interações inter-subunidades na Hb	8
A metahemoglobina (metaHb)	8
O efeito Bohr	9
A ligação do 2,3-Difosfoglicerato (DPG)	11
Hemoglobinas de Mamíferos	11
Hemoglobina nos Caninos	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 – DESCRIÇÃO RESUMIDA DA CRISTALIZAÇÃO E DA PURIFICAÇÃO	13
2.2–COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X	14
2.3 – SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	14
2.4 – REFINAMENTO	16
2.5 - MEDIDAS FUNCIONAIS	20
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1 – CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X	21
3.2 – SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	22
3.3 – REFINAMENTO	25
3.4 – DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA	26
3.5 - COMPARAÇÃO COM A HEMOGLOBINA HUMANA	34
APÊNDICE A – DIFRAÇÃO DE RAIOS X	48
ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UM ÁTOMO	48
FATOR DE ESPALHAMENTO ATÔMICO	49
FATOR DE TEMPERATURA B	50
ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UMA MOLÉCULA	50
ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UM CRISTAL	51
A DENSIDADE ELETRÔNICA	53
FUNÇÃO DE PATTERSON	54



APÊNDICE B - SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR	56
A FUNÇÃO ROTAÇÃO	57
A FUNÇÃO TRANSLAÇÃO	58
APÊNDICE C – REFINAMENTO	60
REFINAMENTO DE CORPO RÍGIDO	63
REFINAMENTO POSICIONAL	63
REFINAMENTO POR DINÂMICA MOLECULAR OU <i>SIMULATED ANNEALING</i>	64
REFINAMENTO DO FATOR B	66
APÊNDICE D - MEDIDAS FUNCIONAIS	67
CURVAS DE OXIGENAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO BOHR	67
APÊNDICE E-TABELA COM AS ESTRUTURAS DE HB RESOLVIDAS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	02
Figura 1.2	05
Figura 1.3	09
Figura 2.1	16
Figura 2.2	19
Figura 3.1	24
Figura 3.2	27
Figura 3.3	28
Figura 3.4	28
Figura 3.5	29
Figura 3.6	32
Figura 3.7	36
Figura 3.8	38
Figura 3.9	41
Figura 3.10	41
Figura 3.11	42
Figura 3.12	43
Figura 3.13	44
Figura 3.14	45
Figura 3.15	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	03
Tabela 1.2	06
Tabela 3.1	22
Tabela 3.2	23
Tabela 3.3	23
Tabela 3.4	24
Tabela 3.5	31
Tabela 3.6	33
Tabela 3.7	34
Tabela 3.8	38
Tabela 3.9	42



LISTA DE ABREVIATURAS

Hb	– hemoglobina.
Oxi	– oxigenada.
Desoxi	– desoxigenada.
pO_2	– pressão parcial de oxigênio.
pCO_2	– pressão parcial de dióxido de carbono.
DPG	– 2,3-Difosfoglicerato.
hHb	– Hemoglobina humana.
IgHb	– Hemoglobina de Lobo Guará.
P_{50}	- Pressão parcial para saturar 50% dos sítios de ligação.
PDB	- <i>Protein Data Bank</i>
CCP4	- <i>Collaborative Computational Project n°4</i>



OBJETIVOS

A expansão do conhecimento da bioquímica e da fisiologia da hemoglobina depende grandemente do estudo de sua ocorrência na natureza. Grande esforço tem sido empreendido no estudo da hemoglobina humana e de suas variáveis mutantes. Isto pode ser observado quando constata-se que a grande maioria das estruturas tridimensionais de hemoglobinas depositadas no bancos de dados de proteínas (PDB) são de hemoglobinas humanas (Apêndice E).

Um outro caminho a ser seguido é a observação sistemática de hemoglobinas animais onde diferenças estruturais podem ser relacionadas com comportamentos bioquímicos, fisiológicos e de desenvolvimento evolucionário. Embora existam aproximadamente 50 seqüências primárias de hemoglobinas animais determinadas, apenas 7 hemoglobinas de mamíferos tem suas estruturas tridimensionais depositadas: duas hemoglobinas porcina, uma cervídea, uma bovina e três eqüinas. Nenhuma estrutura de hemoglobina canina encontra-se depositada no PDB.

Este trabalho apresenta a cristalização e resolução da estrutura tridimensional da hemoglobina isolada do canino brasileiro Lobo Guará (*Chrysocyon brachiurus*). O estudo desta hemoglobina visa realizar comparações com a hemoglobina humana, para identificar as bases estruturais de possíveis diferenças ou similaridades funcionais entre elas.



1 - INTRODUÇÃO ÀS HEMOGLOBINAS (Lesk, 1991)

A hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio dos órgãos captadores (pulmões e brânquias principalmente) para os demais tecidos e parte do gás carbônico no sentido inverso.

A habilidade de transportar O_2 é conferida à hemoglobina pela presença de quatro grupos prostéticos: os hemes. Esta estrutura planar possui um átomo de ferro (Fe^{2+}) no centro, onde uma molécula de oxigênio (O_2) se liga.

A molécula da hemoglobina freqüentemente é um tetrâmero composto por 2 pares de cadeias distintas: duas cadeias α e duas cadeias β como pode ser visto na Figura 1.1. Na hemoglobina normal de um humano adulto cada cadeia α possui 141 aminoácidos e cada cadeia β possui 146 aminoácidos. A cada uma destas cadeias está ligado um grupo heme, de forma que uma molécula de hemoglobina pode transportar até 4 moléculas de oxigênio.

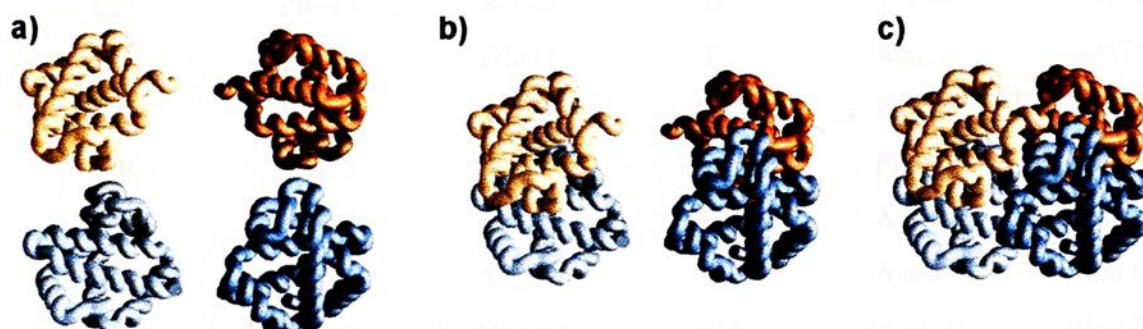


Figura 1.1 - Hemoglobina humana (Hb A₀). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (marrom claro e marrom escuro), com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias β (azul claro e azul escuro) com 146 resíduos de aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O_2 . Estruturalmente, os quatro monômeros (a) ligam-se compondo dímeros (b) que formam o tetrâmero (c) da hemoglobina.

Cada uma das cadeias α ou β possuem estruturas secundárias formadas exclusivamente por hélices e regiões de interligações destas hélices,

além das regiões terminais. Classicamente estas regiões são identificadas por letras. Os resíduos de aminoácidos em cada uma das cadeias podem ser identificados por seu número de ordem na sequência primária (por ex. Ile10 α é o décimo resíduo da cadeia alfa) ou pela letra identificadora da estrutura secundária e o número de ordem dentro destas estruturas (IleA8 α é o oitavo resíduo da hélice A da cadeia alfa). A Tabela 1.1 relaciona estas estruturas e sua localização dentro da sequência primária de cada cadeia.

Tabela 1.1 - Identificação das estruturas secundárias dentro da sequência primária das cadeias α e β da hHb (Imai, 1982). As letras simples em negrito indicam hélices e as letras duplas indicam *corners*, exceto NA e HC que indicam os amino-terminais e os carboxi-terminais respectivamente.

CADEIA ALFA			CADEIA BETA		
Hélice/Corner	do Resíduo n°	ao Resíduo n°	Hélice/Corner	Do Resíduo n°	Ao Resíduo n°
NA	Val1	Leu2	NA	Val1	Leu3
A	Ser3	Gly18	A	Thr4	Val18
AB	Ala19		B	Asn19	Val34
B	His20	Ser35	C	Tyr35	Phe41
C	Phe36	Tyr42	CD	Phe42	Ser49
CD	Phe43	Ser49	D	Thr50	Gly56
D	His50	Gly51	E	Asn57	Ala76
E	Ser52	Ala71	EF	His77	Thr84
EF	His72	Ala79	F	Phe85	Cys93
F	Leu80	Ala88	FG	Asp94	Val98
FG	His89	Val93	G	Asp99	His117
G	Asp94	His112	GH	Phe118	Phe122
GH	Leu113	Phe117	H	Thr123	His143
H	Thr118	Ser138	HC	Lys144	His146
HC	Lys139	Arg141			

Para executar sua função fisiológica efetivamente a hemoglobina deve capturar o oxigênio tão eficiente quanto possível, e liberá-lo facilmente nos

outros tecidos. Para realizar esta tarefa, a hemoglobina possui alta afinidade por oxigênio à alta saturação de O_2 e baixa afinidade à baixa saturação de O_2 . A ligação de O_2 é dita cooperativa, pois a ligação de um oxigênio facilita a ligação de outros oxigênios.

In vivo, a hemoglobina pode apresentar duas estruturas quaternárias distintas. Uma é a estrutura T, característica da forma desoxiHb (não ligada), e tem baixa afinidade ao oxigênio; a outra é a estrutura R, característica da forma oxiHb (4 moléculas de oxigênio ligadas) e tem alta afinidade ao oxigênio

Nos eritrócitos (glóbulos vermelhos), as hemoglobinas encontram-se num equilíbrio das duas formas; a concentração de formas parcialmente ligadas é baixa. A ligação de oxigênio induz mudanças estruturais que alteram a energia livre relativa entre as duas formas, mudando o equilíbrio em favor da forma de alta afinidade. Partindo da estrutura desoxigenada, a ligação parcial de oxigênio (duas ou três moléculas) é suficiente para mudar o equilíbrio em favor do outro estado, que capturará os oxigênios restantes com maior afinidade. Contrariamente, começando com a forma totalmente oxigenada, a perda de um ou dois oxigênios muda o equilíbrio para a forma de baixa afinidade, estimulando a liberação dos oxigênios restantes.

A afinidade por oxigênio da estrutura R é similar em magnitude, à afinidade das subunidades α e β isoladamente. A afinidade por oxigênio da estrutura T é muito menor: a razão entre as constantes de ligação do primeiro e do quarto oxigênio é 1:150-300, dependendo das condições. Portanto, é a estrutura T que é especial, a qual possui sua afinidade por oxigênio “artificialmente” reduzida. Na terminologia de Monod, Wyman e Changeaux (Monod *et al.*, 1965), a reduzida afinidade por oxigênio da estrutura T é

conseguida através de “restrições” estruturais que colocam a estrutura em uma forma “tensa” de alta energia livre, enquanto que a estrutura R encontra-se “relaxada” com baixa energia livre, com afinidade por oxigênio igual à dos monômeros isolados.

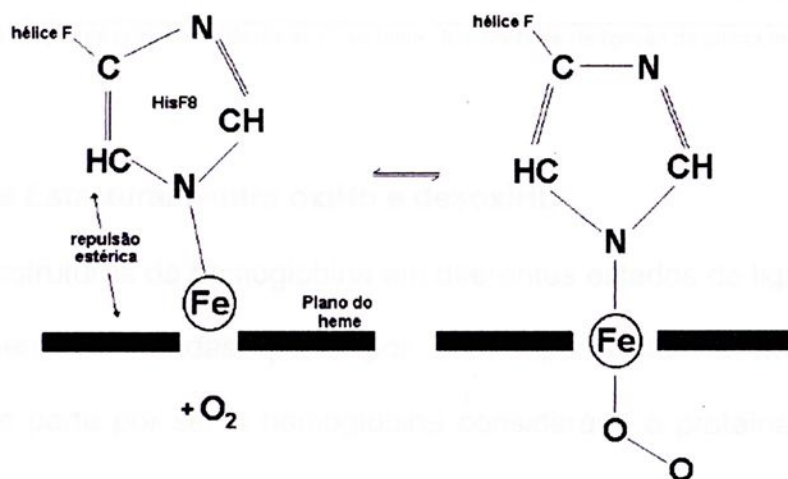


Figura 1.2 - Na oxigenação, o ferro se move para dentro do plano do grupo heme. A histidina F8, juntamente com os resíduos de aminoácidos a ela ligados é puxada, acompanhando o movimento do ferro (Figura adaptada de Murray *et al*, 1993).

A ligação do oxigênio é acompanhada por uma mudança no estado do ferro. No estado desoxigenado, o ferro possui 5 ligantes – os quatro nitrogênios do grupo heme e a histidina proximal, e está num estado Fe^{2+} com spin alto e raio iônico de $2.06\text{\AA}$. No estado oxigenado, o ferro possui 6 ligantes – os 5 anteriores mais o oxigênio, e está em um estado Fe^{2+} com spin baixo e raio iônico de $1.98\text{\AA}$. O raio é importante porque a distância dos nitrogênios ao centro do heme é $2.03\text{\AA}$; isto implica que o ferro permanecerá no plano dos nitrogênios na oxiHb, mas não na desoxiHb (Figura 1.2). A Tabela 1.2 sumariza propriedades e nomenclatura das formas oxigenada e desoxigenada da hemoglobina.

Tabela 1.2 – Propriedades e nomenclatura das formas oxigenada e desoxigenada da Hb a.

PROPRIEDADES	OXIHB	DESOXIHB
Afinidade ao oxigênio	Alta ($k_4=0,17\text{mmHg}$)	Baixa ($k_1=26\text{mmHg}$)
Estado de spin do ferro	Spin baixo	Spin alto
Raio do Fe^{++}	$1,98\text{\AA}$	$2,06\text{\AA}$
MWC Terminologia	Estado relaxado (R)	Estado tenso (T)

k_1 =constante de ligação da primeira molécula de O_2 ao heme; k_4 =constante de ligação da quarta molécula de O_2 ao heme.

Diferenças Estruturais entre oxiHb e desoxiHb

As estruturas da hemoglobina em diferentes estados de ligação tem sido intensivamente estudadas, parte por sua importância na medicina e na fisiologia, e parte por ser a hemoglobina considerada a proteína padrão para estudos dos mecanismos do fenômeno alostérico e das relações estrutura/função nas macromoléculas biológicas.

As comparações entre as estruturas da oxiHb e da desoxiHb mostram mudanças na estrutura terciária das subunidades individuais e na estrutura quaternária, ou seja, na geometria relativa das subunidades e nas interações nas interfaces. Estas mudanças estão acopladas: a estrutura quaternária é determinada pela maneira como as subunidades se agrupam, as quais dependem das formas de suas superfícies. Mudanças na estrutura terciária alteram as formas das superfícies, modificando a maneira como elas se agrupam.

Mudanças na estrutura terciária entre a oxiHb e a desoxiHb

As mudanças na estrutura terciária das cadeias α e β são similares, mas não idênticas. No grupo heme, na desoxiHb, o ferro está fora do plano dos

nitrogênios. Existem duas razões para isto: (a) o raio atômico do ferro com spin alto e (b) a repulsão estereoquímica entre os nitrogênios do grupo heme e o N ϵ da histidina proximal. Além disto, os nitrogênios do grupo heme estão afastados do plano dos carbonos do anel porfirínico do heme de 0,16Å na cadeia α e de 0,10Å na cadeia β .

A ligação entre o oxigênio e o ferro deve, na ausência de mudanças estruturais, criar tensão na estrutura: o grupo heme deve modificar-se para tornar-se planar, e o ferro deve mover-se para o plano do heme. As interações estereoquímicas entre a histidina proximal e o grupo heme, e a posição do *corner* FG (região entre o C-terminal da hélice F e o N-terminal da hélice G) em relação ao grupo heme, oferecem resistência a estas mudanças. Na cadeia β , existe uma barreira adicional: o posicionamento da ValE11 (valina 11 da hélice E) na região do espaço a ser ocupada pelo oxigênio.

Na oxiHb estes impedimentos estéricos são aliviados pelas mudanças na estrutura terciária. O *corner* FG é empurrado para fora, permitindo à hélice F mover-se acompanhando o movimento da histidina proximal e do ferro. Descrevendo estas mudanças localmente, em relação ao grupo heme, acontece um deslocamento da hélice F de aproximadamente 1Å, acompanhada de uma rotação em relação ao plano heme, em ambas cadeias. O efeito destas mudanças é permitir uma reorientação da histidina proximal, de tal forma que o ferro pode colocar-se no plano do heme. Associada ao deslocamento da hélice F acontecem mudanças conformacionais no *corner* FG.

Para estabelecer uma relação entre as mudanças na estrutura terciária e quaternária, deve-se descrever as mudanças na estrutura terciária em termos

de seus efeitos na forma da subunidade inteira. As descrições de mudanças locais ao redor do grupo heme são importantes para entender a energética das ligações, mas é inapropriada para observar influências das mudanças da estrutura terciária na estrutura quaternária.

Interações inter-subunidades na Hb

O tetrâmero que compõe a hemoglobina pode ser tratado como um par de dímeros: $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$. Na transformação alostérica, as interfaces de $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ mantêm sua estrutura, assim como as porções da molécula adjuntas destas interfaces, incluindo as regiões B, C, G e H de ambas subunidades e a hélice D da cadeia β . A mudança alostérica envolve uma rotação de 15° do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao dímero $\alpha_2\beta_2$ ao redor de um eixo aproximadamente perpendicular à interface. O movimento equivale ao movimento de uma tesoura, com as cadeias α_1 e α_2 correspondendo às lâminas e as cadeias β_1 e β_2 correspondendo aos cabos, conforme Figura 1.3.

Como a estrutura da interface $\alpha_1\beta_1$ é conservada, esta região pode ser tomada como referência para descrever mudanças na estrutura terciária que provocam mudanças na superfície da molécula, que influem nas alterações da estrutura quaternária.

A metahemoglobina (metaHb) (Antonini, 1971)

Cerca de 1 a 2% da hemoglobina encontrada no sangue humano são metahemoglobinas. Esta forma é produto da oxidação do Fe^{++} (ferroso) em Fe^{+++} (férico). MetaHb pode ser gerada de diversas formas, como por

exemplo, devido à baixa estabilidade da oxiHb, que em solução se autoxida. Esta transformação pode acontecer também nos cristais de oxiHb, sem mudança na estrutura cristalina. A estrutura quaternária da metaHb é igual à estrutura da oxiHb, exceto por moléculas de solvente, que presumivelmente ligam-se a cada um dos ferros do grupo heme.

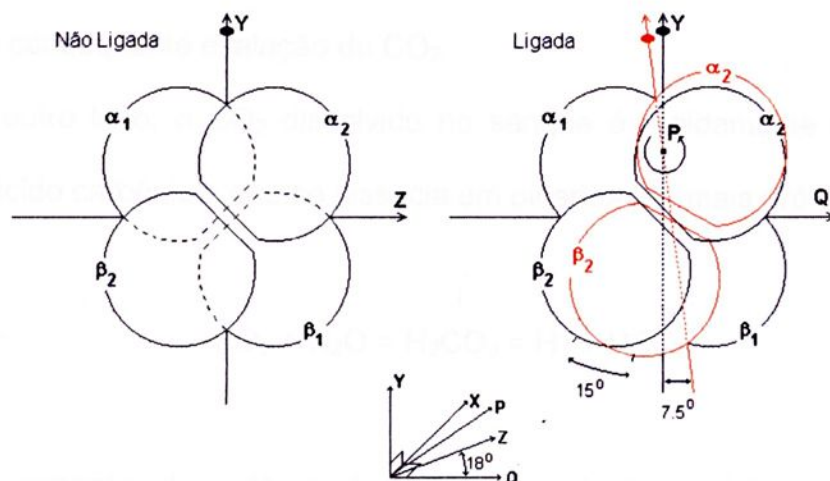


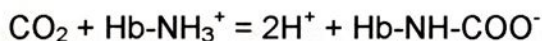
Figura 1.3 - Diagrama ilustrando a mudança na estrutura quaternária que acompanha a ligação de oxigênio à hemoglobina. A ligação provoca uma ligeira mudança da posição do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao dímero $\alpha_2\beta_2$ (ou vice-versa). No diagrama da estrutura ligada os dimeros $\alpha_1\beta_1$ estão superpostos, e os dimeros $\alpha_2\beta_2$ representados em negro (não ligada) e vermelho (ligada). A posição do dímero $\alpha_2\beta_2$ ligada é obtida pela rotação de 12-15° em torno do eixo P, deslocando 1Å para baixo ao longo de P. O eixo P é perpendicular ao eixo de simetria Y e a relação entre os eixos de visão e os eixos moleculares padrões são mostradas no diagrama central inferior (figura adaptada de Baldwin & Chothia, 1979).

O efeito Bohr (Murray, 1993)

In vivo o equilíbrio do sistema Hb-O₂ varia com a concentração de íons H⁺ e com a pCO₂ do meio, fenômeno este conhecido como efeito Bohr.

No desempenho de sua função biológica, o sangue transporta CO₂ dos tecidos para ser exalado pelos pulmões. Parte deste transporte, aproximadamente 15%, é carregado diretamente pela hemoglobina. O CO₂

reage com o grupo amino N-terminal da hemoglobina, formando um carbamato e liberando prótons que contribuem para o efeito Bohr:



Nos pulmões, a oxigenação da hemoglobina é acompanhada pela expulsão e conseqüente exalação do CO_2 .

Por outro lado, o CO_2 dissolvido no sangue é rapidamente hidratado, formando ácido carbônico, que se dissocia em bicarbonato mais próton:



Este excesso de prótons é absorvido pela hemoglobina na razão aproximada de 0,5 prótons para cada oxigênio liberado, contribuindo para a capacidade tamponante do sangue. Nos pulmões, o processo é revertido, isto é, quando o oxigênio liga-se à hemoglobina, prótons são liberados. Os prótons ligam-se ao íon bicarbonato, formando ácido carbônico, que é substrato da anidrase carbônica que, por desidratação deste ácido, libera CO_2 , que é exalado.

Grande parte do efeito Bohr é dependente da ligação de ânions à hemoglobina. Na hemoglobina humana, a parte independente de ânions do efeito Bohr é devida à mudança do pK_a da HisHC3 β (His146 β) que participa de uma ligação de hidrogênio doando próton ao AspFG1 β (Asp94 β) quando na forma T, e aceitando próton do seu próprio NH, quando no estado R.



A parte dependente de ânions do efeito Bohr é atribuído aos resíduos de aminoácidos ValNa1 α (Val1 α) e LysEF6 β (Lys82 β), pois esta parte do efeito Bohr é inibida quando estes resíduos de aminoácidos são alterados. Perutz *et al.* (1998) postula que esta influência é devida à condensação de íons cloreto na cavidade central do tetrâmero, quando em sua forma T, neutralizando excessos de cargas positivas e diminuindo a afinidade pelo oxigênio através da alteração da distribuição eletrostática da hemoglobina.

A ligação do 2,3-Difosfoglicerato (DPG)

Em adição ao efeito dos prótons, a função intracelular da hemoglobina é também mediada pela existência de fosfatos orgânicos. Nos tecidos periféricos, a escassez de oxigênio produz acúmulo de DPG. Ligando-se à desoxiHb, o DPG diminui a afinidade da Hb pelo O₂, permitindo que a hemoglobina libere o oxigênio nos capilares dos tecidos. Uma molécula de DPG liga-se a cada tetrâmero na entrada da cavidade central formada pelas quatro subunidades. Esta cavidade possui tamanho suficiente para a ligação do DPG apenas quando a hemoglobina encontra-se na forma T. Na hemoglobina humana, a ligação do DPG se dá através da formação de pontes salinas entre os oxigênios do DPG e as duas cadeias β , via grupo amino N-terminal (ValNA1) e pela LysEF6 e HisH21.

Hemoglobinas de Mamíferos

Nos mamíferos, a presença de DPG nas células divide-os em 2 grupos, os com abundância de DPG nos eritrócitos e aqueles onde a presença de DPG



nestas células é inexpressiva ou inexistente (Bunn, 1981). No primeiro grupo, a Hb apresenta alta afinidade intrínseca por oxigênio, enquanto o segundo grupo apresenta baixa afinidade. Diferenças estruturais foram verificadas entre estes dois grupos (Perutz *et al*, 1980). Os caninos, juntamente com os humanos, pertencem ao primeiro grupo, portanto suas hemoglobinas devem apresentar semelhanças estruturais.

Hemoglobina nos Caninos

Estudos evolucionários tem comprovado que cães (Tsuda, 1997) e canídeos sul-americanos (Wayne, 1987) são geneticamente próximos e possuem como ancestral comum um tipo de lobo. Esta proximidade genética é reafirmada pela conhecida possibilidade de intercruzamento entre os gêneros de caninos. A hemoglobina de cão (*Canis familiaris*) já tem sua seqüência primária determinada (Brimhall, 1977) e depositada no banco de seqüências SWISS-PROT (HBA_CANFA, n°P01952 para a cadeia alfa e HBB_CANFA n°P02056 para a cadeia beta). Esta hemoglobina apresenta uma dupla possibilidade na ocupação da posição 130 da cadeia α : alanina ou treonina ocupam esta posição na proporção de 1:2 (Runkel, 1974). A hemoglobina de coiole (*Canis latrans*) também tem sua seqüência primária determinada, assim como o segmento correspondente na hemoglobina de lobo (Runkel, 1974), ambos não apresentando esta variabilidade (somente a Thr130 α foi encontrada), embora não se possa afirmar que esta duplicidade somente é encontrada em cães, uma vez que poucos espécimes dos gêneros citados foram estudados.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – DESCRIÇÃO RESUMIDA DA CRISTALIZAÇÃO E DA PURIFICAÇÃO (Smarra, 1999)

Purificação

O sangue foi coletado de um espécime adulto de *Chrysocyon brachiurus* usando-se seringas heparinizadas. Os eritrócitos foram lavados seis vezes por centrifugação, em solução tampão 50mM Tris-HCl pH 8,5 contendo 1,7% de NaCl e 1mM EDTA. Usando-se a mesma solução tampão, sem cloreto, foi realizada a hemólise, e os debris celulares foram removidos por centrifugação (1.100g for 2 horas) e por filtração (membrana Millipore 1.6 μ m).

Fosfatos orgânicos e outras moléculas pequenas foram removidos pela passagem da solução através de gel Sephadex G-25 e várias passagens por Amberlite MB-1.

Hemoglobina I foi purificada por cromatografia de troca iônica usando-se DEAE-Sephadex e um gradiente linear entre 50mM Tris-HCl pH 9.0 e bis-Tris 50mM pH 6.5.

A hemoglobina purificada obtida foi deionizada usando Amberlite MB-1 como descrito previamente, concentrada e estocada em nitrogênio líquido até sua posterior utilização.

Cristalização

A hemoglobina purificada foi dissolvida em água deionizada. A proteína foi colocada na presença de 50 soluções para cristalização, utilizando-se o

método de difusão de vapor, sistema *hanging drop*, segundo o método da matriz esparsa (Jancarik & Kim, 1991).

Os cristais foram obtidos em diversas destas condições. Os melhores cristais foram conseguidos após uma semana em gotas contendo 7 μ l de solução de hemoglobina numa concentração de 12mg/ml misturada com igual volume de 30% de polietilenoglicol 1500. O cristais foram montados em capilares de vidro para a coleta de dados de difração de raios X.

2.2—COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Dados de difração de raios X de comprimento de onda de 1,37Å foram coletados utilizando-se fonte de luz síncrotron na estação PCr do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS (Polikarpov, Pérles *et al*, 1998 e Polikarpov, Oliva *et al*, 1998), utilizando-se placa de imagens de 34,5cm da MAR Research e uma distância cristal/detetor de 160.0mm, à temperatura ambiente. Usando-se oscilações de 0.7°, 90 imagens foram coletadas e os dados foram processados à resolução de 1,86Å, usando-se o programa DENZO e escalonado pelo programa SCALEPACK (Otwinowski, 1993).

2.3 – SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR

A estrutura dos cristais de IgHb foi determinada por substituição molecular usando-se o programa computacional AMoRe (Navaza, 1994). Este programa, integrante do pacote CCP4 (*Collaborative Computational Project* nº4) compõe-se de diversas rotinas específicas para cada etapa do procedimento de substituição molecular. Os dados de difração de raios X foram



primeiramente convertidos para o formato específico do pacote CCP4 utilizando-se a rotina F2MTZ e ordenado pela rotina SORTING. Das coordenadas atômicas do dímero ($\alpha_1\beta_1$) da oxi-hHbA (grupo espacial P4₁2₁2) depositada no PDB (Shaanan, 1983), código de acesso 1HHO, foi gerado o segundo dímero ($\alpha_2\beta_2$), que juntamente com o primeiro, formaram o tetrâmero usado como modelo de procura. Todas as moléculas de água e moléculas de fosfatos foram removidas do modelo de procura e os fatores de temperatura B foram ajustados para 20.00Å². O grupo heme foi mantido no modelo. Utilizando-se a rotina TABLING as coordenadas atômicas do modelo foram transladadas, para que seu centro de massa coincidisse com a origem, e rodadas de maneira que seus eixos de inércia principais permanecessem paralelos aos eixos ortogonais.

As funções de rotação (*cross-rotation*) foram calculadas utilizando-se a rotina ROTING, nos intervalos de resolução 10-4,5 Å, 8-3 Å, e 6-3 Å com passos de 2,5° e raio de integração de 25Å. As rotações que apresentaram maiores valores para o coeficiente de correlação CC (Equação B.2) foram selecionadas e utilizadas na rotina TRAINING, para a procura da translação ideal, utilizando-se o mesmo intervalo de resolução. No intuito de confirmar o grupo espacial, as funções de rotação e de translação foram novamente computadas para os grupos espaciais P222, P222₁, P2₁2₁2 e P2₁2₁2₁, na melhor faixa de resolução encontrada.

Sobre as melhores coordenadas obtidas pelas translações e rotações aplicadas, como descrita anteriormente, foi aplicado refinamento de corpo rígido utilizando a rotina FITING. O melhor modelo foi escolhido baseado na magnitude do fator R e no coeficiente de correlação CC. Este modelo foi



utilizado no refinamento da estrutura, como descrito a seguir. A Figura 2.1 esquematiza o processo de substituição molecular.

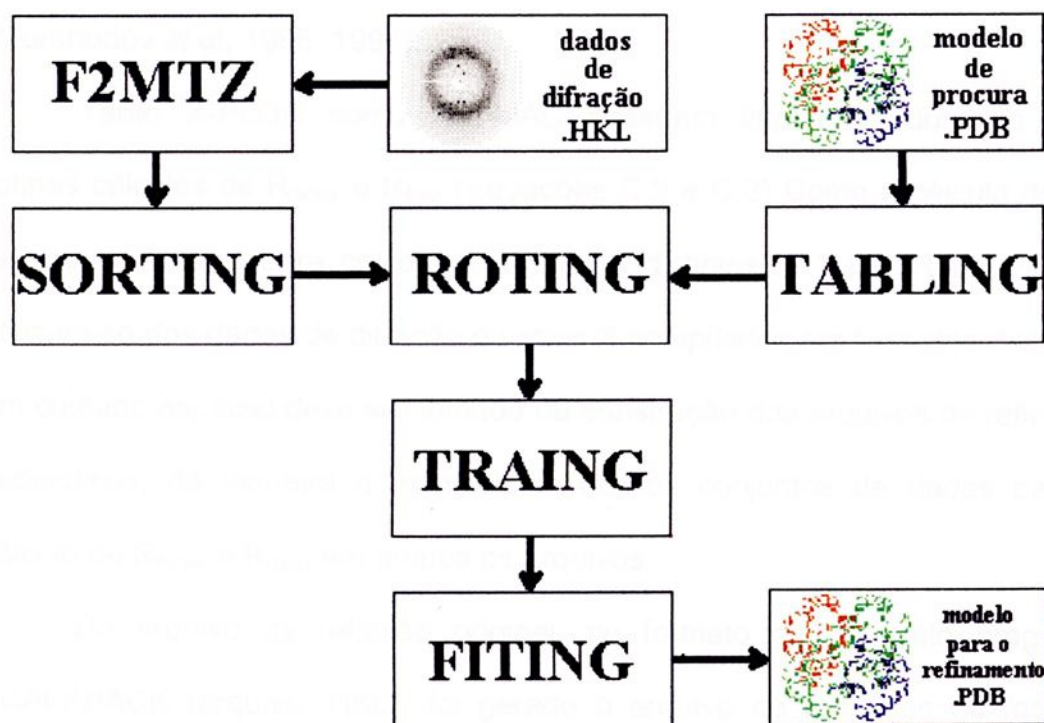


Figura 2.1- Diagrama de fluxo do protocolo de substituição molecular seguindo o programa AMORE, do pacote de programas CCP4 (Collaborative Computational Project nº 4)

2.4 – REFINAMENTO

O procedimento de refinamento da estrutura gerada pela substituição molecular iniciou-se pela substituição da sequência principal, originalmente da hemoglobina humana, pela sequência da hemoglobina de cão (*Canis familiaris*) (Brimhall, 1977). Para tanto primeiramente foi gerado um mapa da densidade eletrônica 2Fo-Fc, utilizando o resultado da substituição molecular como modelo. A troca das seqüências primárias foi realizada utilizando-se o programa XTALVIEW (McRee, 1992), retirando o resíduo a ser substituído e inserindo o novo resíduo, levando-se em consideração o mapa de densidade

eletrônica. Ao final deste procedimento obteve-se o modelo inicial para prosseguir-se com o refinamento. Várias opções de refinamento foram testadas, utilizando-se os programas X-PLOR (Brünger, 1992) e REFMAC (Murshodov *et al*, 1996, 1997).

Tanto X-PLOR como REFMAC possuem implementados em suas rotinas cálculos de R_{factor} e R_{free} (Equações C.2 e C.3) Como o cálculo destes fatores se fazem sobre conjuntos de dados distintos, e X-PLOR e REFMAC utilizam-se dos dados de difração de raios X compilados em formatos distintos, um cuidado especial deve ser tomado na construção dos arquivos de reflexões específicos, de maneira a manter os mesmos conjuntos de dados para o cálculo de R_{factor} e R_{free} , em ambos os arquivos.

Do arquivo de reflexão original, no formato gerado pelo programa SCALEPACK (arquivo .HKL), foi gerado o arquivo de reflexões no formato específico para programas CCP4 (arquivo .MTZ), utilizando-se a rotina F2MTZ. Em seguida foi gerado um conjunto completo de reflexões pela rotina UNIQUEIFY, sendo nesta etapa selecionado 10% dos dados para o cálculo do R_{free} . Deste arquivo foi gerado um novo arquivo de reflexões no formato X-PLOR, utilizando-se a rotina MTZ2VARIOUS.

Refinamentos completos utilizando-se cada um dos programas e combinações dos mesmos foram realizados. A seguir é descrito o procedimento que apresentou melhor resultado, considerando-se os valores de R e o aspecto geral dos mapas de densidade eletrônica.

O modelo foi submetido a três procedimentos de refinamento utilizando-se o programa X-PLOR. Inicialmente, ao arquivo de coordenadas atômicas do modelo foram acrescentados os átomos de hidrogênio e gerado um arquivo

com as informações de restrições estereoquímicas do modelo (generate.inp). Na primeira etapa de refinamento propriamente dito, foram realizados ciclos de refinamento de corpo rígido (rigid.inp) tomando como corpos rígidos independentes cada uma das cadeias α_1 , α_2 , β_1 e β_2 . Numa segunda etapa, foram efetuados ciclos de refinamento posicional convencional, utilizando-se minimização por gradiente conjugado (positional.inp). Este refinamento foi precedido da execução de uma rotina de checagem (check.inp), que verifica impedimentos estéricos e calcula o “peso” dos termos energéticos de raios X. Na terceira etapa foi realizado o refinamento posicional utilizando-se o método de *Slow Cooling Simulated Annealing*.

A seguir, uma nova etapa de refinamento posicional, conjugado com refinamento do fator B, foi efetuado utilizando-se o programa REFMAC. Para tanto, o arquivo de coordenadas do modelo no estágio atual foi reformatado, ou seja, os hidrogênios foram retirados através da rotinas PDBSET, e novo arquivo de restrições estereoquímicas foi gerado, no formato específico do pacote CCP4, através da rotina PROTON. Após este passo, foi efetuado um refinamento isotrópico do fator de temperatura B (Brefinement.inp), utilizando-se novamente o programa X-PLOR.

Neste ponto, a primeira checagem do modelo foi realizada utilizando-se o programa XFIT do pacote XTALVIEW (McRee, 1992). Utilizando-se a rotina fofc.inp (X-PLOR), um novo arquivo de reflexões contendo os fatores de estrutura observados e os calculados para o modelo atual, foi gerado no formato específico para uso no XTALVIEW (formato Scripps). Um mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ foi calculado e o modelo final destas etapas de refinamento foi inspecionado para a realização das correções manuais

necessárias. A seguir, novo mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$ foi gerado para ser utilizado no procedimento automático de procura de moléculas de água, através do mesmo programa XFIT. Sendo assim, novos arquivos de coordenadas e restrições foram gerados (generate.inp) e mais um ciclo de refinamento posicional convencional e do fator B foi efetuado utilizando o programa X-PLOR.

Nova checagem foi realizada no programa XFIT, excluindo-se as moléculas de água localizadas em posições sem a correspondente densidade eletrônica, além daquelas que apresentaram fator de temperatura B superior a $60\text{\AA}^2$, chegando-se assim ao modelo refinado.

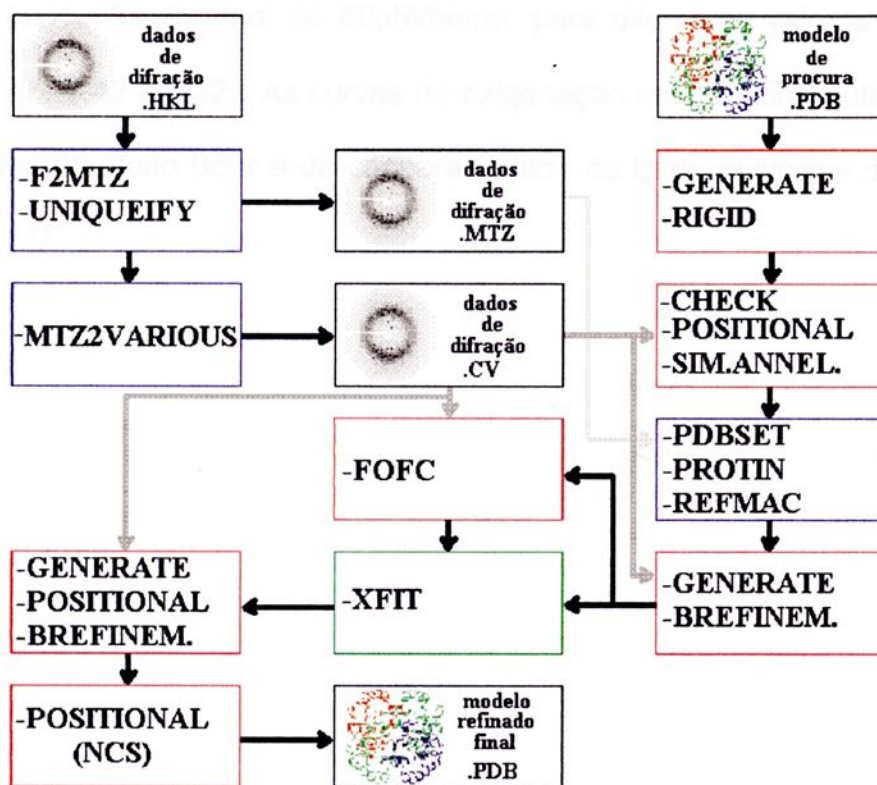


Figura 2.2 - Diagrama do procedimento utilizado no refinamento da IgHb. As setas negras indicam a progressão do refinamento das coordenadas e as setas cinzas, o fornecimento de dados de difração de raios X a cada passo. Quadros azuis indicam que as rotinas utilizadas pertencem ao pacote CCP4, quadros vermelhos as rotinas pertencentes ao programa X-PLOR e nos quadros verdes, ao programa XFIT.

Finalizando, realizou-se mais uma etapa de refinamento posicional utilizando-se X-PLOR, com a inclusão de restrições devido à simetria não cristalográfica (eixo de ordem 2) no tetrâmero da hemoglobina (dímero $\alpha_1\beta_1$ simétrico ao dímero $\alpha_2\beta_2$), chegando-se então forma ao modelo refinado final.

A Figura 2.2 mostra um fluxograma do refinamento descrito.

2.5 - MEDIDAS FUNCIONAIS

Complementarmente aos estudos estruturais da IgHb foram realizadas medidas de curvas de oxigenação da IgHb, em função do pH. As curvas foram medidas com a IgHb dissolvida em solução tampão de Hepes 10mM e NaCl 0,1mM na concentração final de 60 μ M/heme, para diferentes valores de pH (6,6; 6,8; 7,15; 7,42 e 7,82). As curvas de oxigenação obtidas foram utilizadas para medidas do efeito Bohr e da cooperatividade da IgHb, conforme descrito no Apêndice D.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS X (Smarra *et al.*, 1999)

Os cristais de IgHb obtidos, adequados para difração de raios X, apresentaram dimensões de aproximadamente 1,5 x 0,7 x 0,5mm. Dados de difração de raios X foram coletados no intervalo de resolução de 100,00 à 1,7Å e quando indexados mostraram pertencer ao grupo de Laue primitivo ortorrômbico, com parâmetros de cela $a=54,2(1)\text{Å}$, $b=87,7(1)\text{Å}$ e $c=133,4(1)\text{Å}$ (valores finais obtidos após refinamento destes parâmetros, utilizando-se todas as imagens coletadas), Assumindo-se que a unidade assimétrica contém um tetrâmero de peso molecular 64,5kDa, foi encontrado um volume de Matthews $V_m=2,46\text{Å}^3\text{Da}^{-1}$ que, considerando-se ser o volume específico da proteína igual a $0,74\text{cm}^3\text{g}^{-1}$, fornece um volume parcial de solvente no cristal igual a 50% e uma densidade calculada de $1,18\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Das 90 imagens coletadas, foram observados 131925 spots correspondentes a 50259 reflexões independentes, Uma estatística detalhada dos dados coletados é apresentada na Tabela 3,1, Conforme critério apresentado nas notas para autores da *Acta Crystallographica D*, dados que apresentaram R_{merge} superior a aproximadamente 20% foram desconsiderados para efeito de determinação da resolução da estrutura (a estatística parcial para os dados considerados está destacada na Tabela 3.1).



3.2 – SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR

As 50259 reflexões obtidas foram ordenadas e 19 ausências sistemáticas foram verificadas. Uma análise destas 19 reflexões mostra que reflexões com índices de Miller $h00$, $0k0$ e $00l$ embora coletadas, apresentam intensidade inferior ao desvio padrão das intensidades $\sigma(I)$, o que indica a presença de três eixos de roto-translação (2_1). Sendo assim, foram excluídas do conjunto de reflexões.

Tabela 3.1- – Estatística detalhada dos dados de difração de raios X síncrotron para um cristal de IgHb.

Completeza = (# reflexões observadas / # reflexões possíveis),

Redundância = média das reflexões ponderada pelo # de observações,

$R_{\text{merge}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$ onde I é a intensidade de uma reflexão e $\langle I \rangle$ é o valor médio da intensidade desta reflexão

Resolução (Å)	Número de reflexões independentes	Completeza (%)	Redun- dância	R_{merge} (%)
100,00 – 4,59	3174	81,6	2,79	2,9
4,59-3,64	3442	93,4	2,71	2,9
3,64-3,18	3493	95,6	2,61	3,8
3,18-2,89	3498	95,9	2,65	4,9
2,89-2,68	3472	96,4	2,65	6,5
2,68-2,52	3476	96,0	2,65	7,9
2,52-2,40	3434	95,9	2,65	9,2
2,40-2,29	3433	96,0	2,64	11,1
2,29-2,21	3433	95,4	2,64	13,0
2,21-2,13	3359	94,5	2,62	16,4
2,13-2,06	3360	93,8	2,60	20,4
Sub-Total	37574	94,1	2,66	9,0
2,06–2,00	3329	94,0	2,56	26,3
2,00–1,95	3294	92,1	2,58	36,1
1,95–190	3263	91,7	2,54	45,3
1,90–1,86	2799	78,7	2,38	58,3
Total	50259	92,7	2,62	5,0

Utilizando-se o grupo espacial $P2_12_12_1$, foram calculadas as funções de rotação para 3 diferentes faixas de resolução, e os melhores resultados foram utilizados para o cálculo da translação (Tabela 3.2). O melhor resultado foi obtido para a faixa de resolução de 6,0Å a 3,0Å, apresentando coeficiente de correlação de 57,6% e fator R de 41,9%,

Tabela 3.2 – Ângulos de rotação e distâncias fracionárias de translação, juntamente com os respectivos valores de Coeficiente de Correlação (CC) e Fator R, obtidas para distintas faixas de resolução na substituição molecular do cristal de IgHb,

Resolução (Å)	α (°)	β (°)	γ (°)	Tx	Ty	Tz	CC (%)	R (%)
10,0 – 4,5	89,62	79,24	173,29	0,0919	0,0096	0,4143	53,0	42,5
8,0 – 3,0	89,96	80,27	172,13	0,0947	0,0103	0,4135	57,6	42,0
6,0 – 3,0	89,98	80,29	172,03	0,0949	0,0100	0,4135	57,6	41,9

As funções de rotação e translação foram recalculadas usando-se a faixa de resolução de 6,0Å a 3,0Å para os quatro grupos espaciais que pertencem ao sistema primitivo ortorrômbico, e os resultados obtidos (Tabela 3.3) confirmaram a opção inicial pelo grupo espacial $P2_12_12_1$. A Figura 3.1 mostra o empacotamento da IgHb na cela unitária, com 4 tetrâmeros por cela unitária.

Tabela 3.3 – Ângulos de rotação e distâncias fracionárias de translação juntamente com os respectivos valores de Coeficiente de Correlação (CC) e Fator R, obtidas para distintos grupos espaciais do sistema ortorrômbico, na faixa de resolução de 6,0Å a 3,0Å para o cristal de IgHb,

Grupo Espacial	α (°)	β (°)	γ (°)	Tx	Ty	Tz	CC (%)	R (%)
P222	89,93	80,28	171,91	0,9989	0,3285	0,0567	30,8	52,1
P222 ₁	89,93	80,28	171,91	0,3446	0,0105	0,3755	39,4	48,6
P2 ₁ 2 ₁ 2	89,93	80,28	171,91	0,3436	0,0593	0,1639	38,7	49,0
P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	89,98	80,29	172,03	0,0949	0,0100	0,4135	57,6	41,9

Finalizando-se o procedimento de substituição molecular, realizou-se um refinamento de corpo rígido, o que não implicou em variação significativa dos parâmetros de rotação e translação, e em nada alterou os valores do coeficiente de correlação e do fator R. Os valores finais do processo de substituição molecular são sumarizados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4– Sumário de dados da coleta de raios X e da substituição molecular do cristal de IgHb

Número de reflexões medidas	131,925
Número total de reflexões únicas	50,240
Faixa de resolução dos dados	Mínima = 72,548Å Máxima = 1,864Å
Parâmetros de cela	$a = 54,2\text{Å}$; $b = 87,7\text{Å}$; $c = 133,4\text{Å}$
Grupo Espacial	$P2_12_12_1$
Rotação	$\alpha = 89,94^\circ$; $\beta = 80,41^\circ$; $\gamma = 171,89^\circ$
Translação (unidades fracionárias)	$T_x = 0,0949$; $T_y = 0,0106$; $T_z = 0,4136$
Coeficiente de Correlação	57,6%
Fator R	41,9%

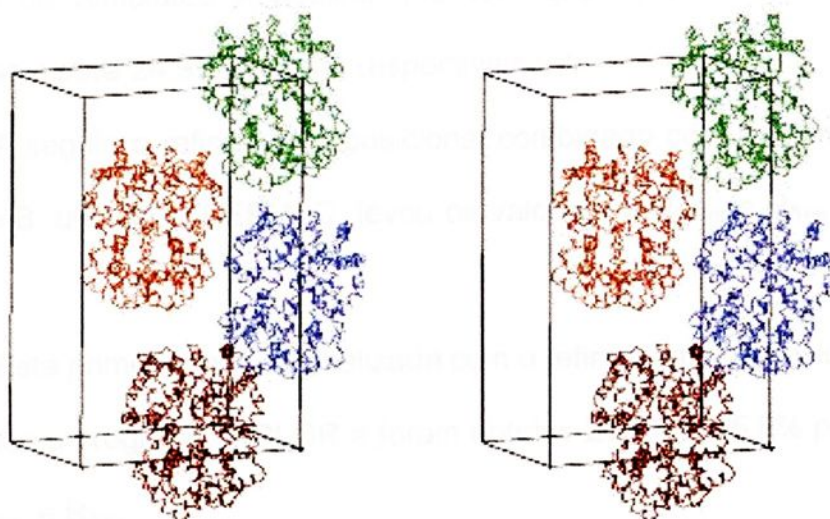


Figura 3.1 – Visão estéreo do empacotamento cristalino da IgHb, pertencente ao grupo espacial $P2_12_12_1$.

3.3 – REFINAMENTO

Ao conjunto original de 50.240 reflexões foram adicionadas e marcadas 3.694 reflexões que pertencem à faixa de resolução utilizada, mas que não foram coletadas, formando um conjunto completo de dados para esta faixa de resolução, totalizando 53.934 reflexões. Ainda do total inicial de 50.240 reflexões, 10% delas foram marcadas para serem utilizadas no cálculo de R_{free} .

Do modelo oriundo da substituição molecular, após a troca da seqüência primária, foram calculados os valores dos fatores R e R_{free} e encontrou-se respectivamente, 41,2% e 41,3%.

Na primeira parte do processo de refinamento utilizando X-PLOR os valores de R_{factor} e R_{free} tiveram o seguinte comportamento: com o refinamento de corpo rígido, utilizando-se o tetrâmero completo como corpo rígido, os valores caíram para 36,2% e 35,6%, respectivamente; Após a realização do refinamento posicional convencional foi obtida uma redução destes valores para 28,35% e 32,55%. Novo refinamento posicional, desta vez utilizando-se o método de *Simulated Annealing*, fez com que os valores de R_{factor} e R_{free} baixassem para 24,9% e 33,3% respectivamente.

A seguir, o refinamento posicional combinado com refinamento do fator térmico B, utilizando REFMAC, levou os valores de R_{factor} e R_{free} para 23,1% e 28,5%.

Esta primeira fase foi finalizada com o refinamento dos valores do fator B utilizando o programa X-PLOR e foram obtidos 21,1% e 25,8% para os valores de R_{factor} e R_{free} .



Após a inclusão de 308 moléculas de água, do ajuste manual das cadeias laterais e novo refinamento dos fatores térmicos B, chegou-se aos valores de 19,8% para R_{factor} e 25,5% para R_{free} .

Finalmente, um novo ciclo de refinamento posicional, com restrições não cristalográficas, levou os valores de R_{factor} e R_{free} para 19,4% e 24,6%, respectivamente. A Figura 3.2 apresenta a evolução dos valores de R_{factor} e de R_{free} durante o processo de refinamento.

3.4 – DESCRIÇÃO DA ESTRUTURA

A seqüência primária da IgHb não foi ainda determinada. Como as seqüências primárias das hemoglobinas do cão labrador doméstico (*Canis familiaris*), do coiote (*Canis latrans*) e do lobo canadense (*Canis lupus*) já estão determinadas (Runkel, 1974 e Brimhall, 1977) e por lobos e coiotes serem tidos como precursores próximos dos cães (Tsuda, 1997 e Wayne, 1987), foi utilizada a seqüência primária depositada para as cadeias α e β do cão doméstico, como seqüência primária da IgHb. Uma análise detalhada do mapa de densidade eletrônica a 1.87Å de resolução, mostrou que na posição do resíduo de aminoácido Ala130 α havia excesso de densidade eletrônica, indicando, pela sua forma (Figuras 3.3 e 3.4) que aquela posição deveria ser ocupada por uma valina ou treonina.

Seqüenciamento da hemoglobina canina posterior ao depositado indicou a existência de 2 variedades de cadeia α , uma contendo alanina na posição 130 e outra contendo treonina na mesma posição. O Seqüenciamento das

hemoglobinas do coiote e do lobo (Runkel, 1974) indicaram somente a presença de treonina na posição 130 α .

Desta forma, assumiu-se como seqüência principal da IgHb a mesma seqüência principal da Hb canina com treonina na posição 130 α , embora, devido ao fato das amostras sangüíneas utilizadas serem oriundas de apenas uma espécie, impossibilite afirmar de que esta é a única possibilidade para a seqüência primária da IgHb.

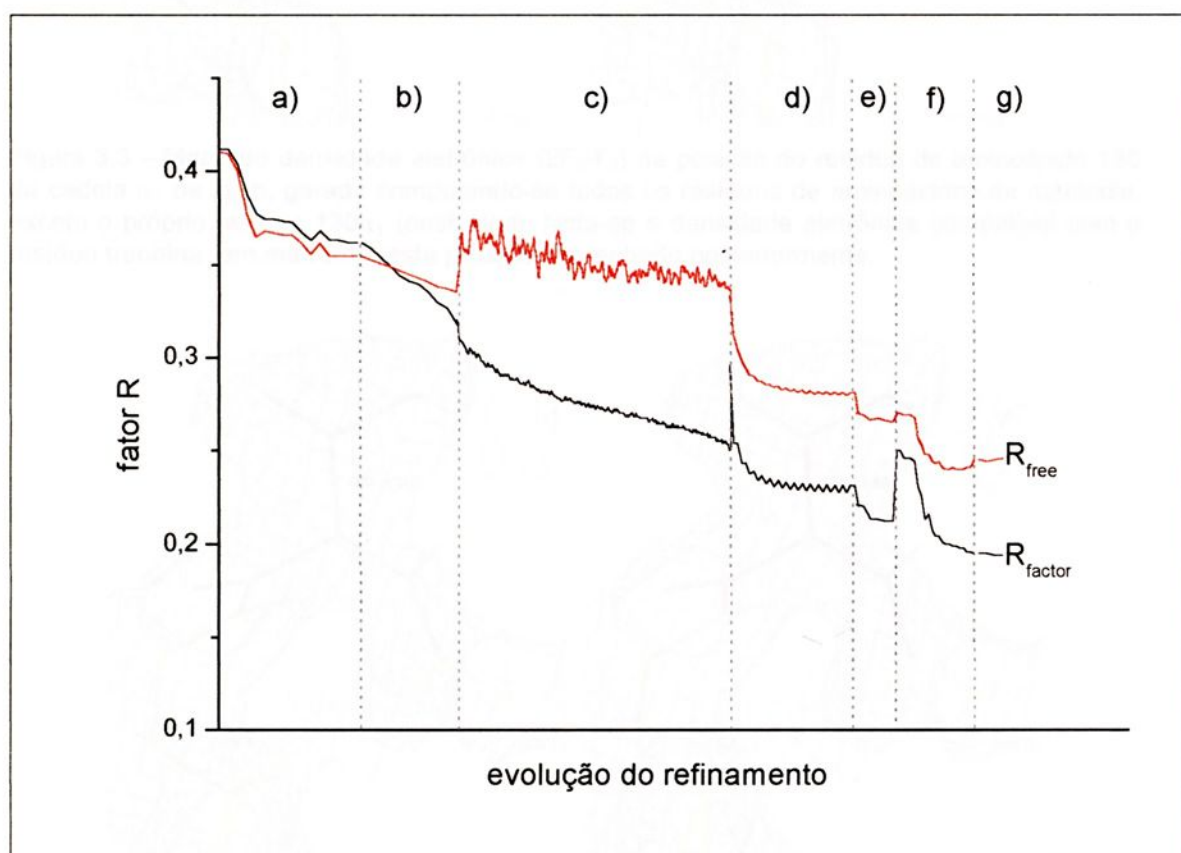


Figura 3.2 – Desenvolvimento dos valores de R_{free} e R_{factor} durante o processo de refinamento. Cada estágio do refinamento está identificado como: a) refinamento de corpo rígido; b) refinamento posicional; c) refinamento *simulated annealing*; d) refinamento posicional e do fator B; e) refinamento do fator B; f) refinamento posicional após inclusão das moléculas de água; g) refinamento posicional com restrições não cristalográficas. Em todos os passos do refinamento utilizou-se o programa X-PLOR, exceto no passo (d) onde utilizou-se o programa REFMAC. O eixo horizontal não respeita escala entre os diferentes estágios.

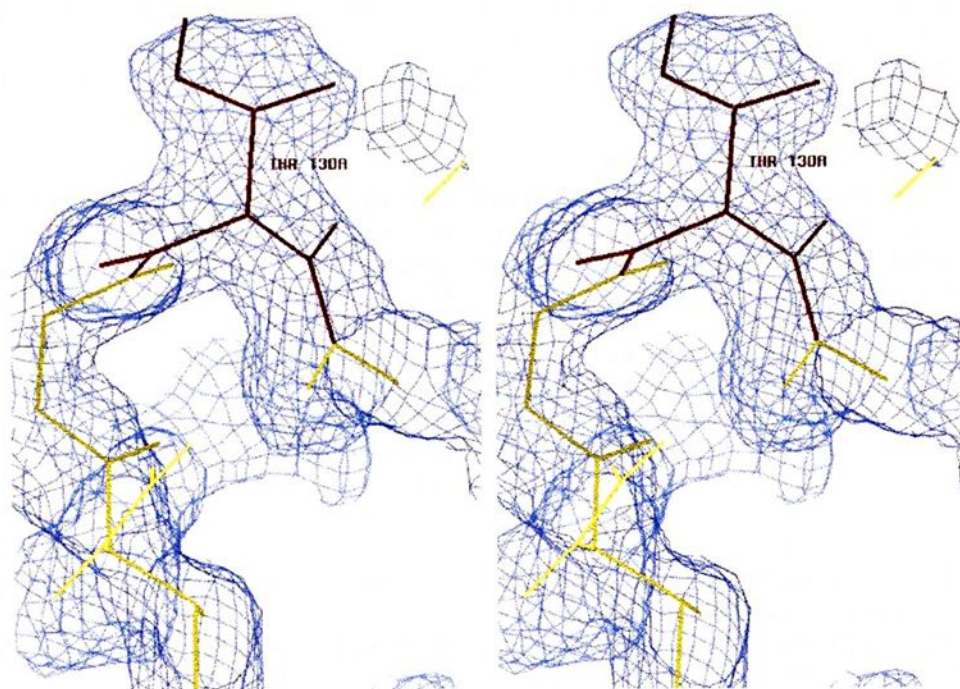


Figura 3.3 – Mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c$) na posição do resíduo de aminoácido 130 da cadeia α_1 da IgHb, gerado computando-se todos os resíduos de aminoácidos da molécula, exceto o próprio resíduo 130 α_1 (*omit map*). Nota-se a densidade eletrônica compatível com o resíduo treonina (em marrom) nesta posição, desenhado posteriormente.

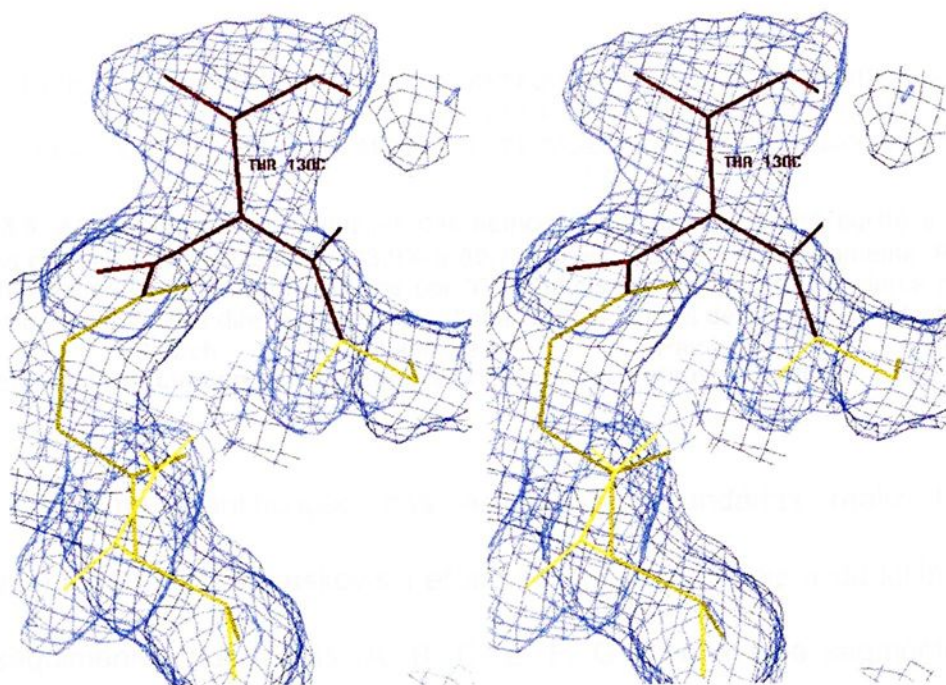


Figura 3.4 – Mapa de densidade eletrônica ($2F_o - F_c$) na posição do resíduo de aminoácido 130 da cadeia α_2 da IgHb, gerado computando-se todos os resíduos de aminoácidos da molécula, exceto o próprio resíduo 130 α_2 (*omit map*). Nota-se a densidade eletrônica compatível com o resíduo treonina (em marrom) nesta posição, desenhado posteriormente.

	10	20	30	40	50
α lgHb	VLSPADKTNI	KSTWDKIGGH	AGDYGGEALD	RTFQSFPTTK	TYFPHFDLSP
	iiiiiiiiiii	issidisisi	iisiisiii	ididiiiiii	iiiiiiiiiid
α hHb	VLSPADKTNV	KAAGWKVGAH	AGEYGAEALE	RMFLSFPTTK	TYFPHFDLSH
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
α lgHb	GSAQVKAHGK	KVADALTTAV	AHLDDLPGAL	SALSDLHAYK	LRVDPVNFKL
	iiiiiiiisii	iiiiiiiisii	iisiisiii	iiiiiiiisii	iiiiiiiisii
α hHb	GSAQVKGHGK	KVADALTNAV	AHVDDMPNAL	SALSDLHAHK	LRVDPVNFKL
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	
α lgHb	LSHCLLVTLA	CHHPTEFTPA	VHASLDKFFT	AVSTVLTSKY	R
	iiiiiiiiiii	didisiiii	iiiiiiiiss	iiiiiiiiiii	i
α hHb	LSHCLLVTLA	AHLPAEFTPA	VHASLDKFLA	SVSTVLTSKY	R
	110	120	130	140	
	10	20	30	40	50
β lgHb	VHLTAEKSL	VSGLWGKVV	DEVGGEALGR	LLIVYPWTQR	FFDSFGDLST
	iiiiidiii	issiiiiiii	iiiiiiiiiii	iisiiiiiii	iisiiiiiii
β hHb	VHLTPEEKSA	VTALWGKVV	DEVGGEALGR	LLVYPWTQR	FFESFGDLST
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
β lgHb	PDAVMSNAKV	KAHGKKVLNS	FSDGLKNLDN	LKGTFAKLSE	LHCDKLHVDP
	iiiiisidii	iiiiiiiiss	iiiiidsiii	iiiiidiii	iiiiiiiisii
β hHb	PDAVMGNPKV	KAHGKKVLGA	FSDGLAHLN	LKGTFAKLSE	LHCDKLHVDP
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	
β lgHb	ENFKLLGNVL	VCVLAHFFGK	EFTPQVQAAY	QKVVAGVANA	LAHKYH
	iiisiiiiiii	iiiiiiiiiii	iiidiiiiii	iiiiiiiiiii	iiiiiii
β hHb	ENFRLLGNVL	VCVLAHFFGK	EFTPPVQAAY	QKVVAGVANA	LAHKYH
	110	120	130	140	

Figura 3.5. Alinhamento das seqüências das hemoglobinas de lobo guará (lgHb) e humana (hHb). As cadeias α e β apresentam 83,0% e 89,7% de identidade, respectivamente. Resíduos de aminoácidos idênticos são marcados por "i", resíduos de aminoácidos similares por "s" e resíduos de aminoácidos diferentes por "d". (Alinhamento e índices de identidade calculados por BCM Search Launcher: Pair-wise Sequence Alignment, <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/alignment.html>)

Conforme identificação das estruturas secundárias realizada pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), cada cadeia α da lgHb possui sete seguimentos helicoidais (A, B, C, E, F, G e H) e sete segmentos não helicoidais (NA, AB, CE, EF, FG, GH e HC) e cada cadeia β possui oito segmentos helicoidais (A, B, C, D, E, F, G e H) e sete segmentos não

helicoidais (NA, AB, CD, EF, FG, GH e HC). A Figura 3.7 mostra a seqüência primária e as estruturas secundárias da IgHb, comparativamente à hHb.

Como a unidade assimétrica da IgHb é um tetrâmero completo, cada cadeia foi refinada individualmente. Desta forma, as semelhanças estruturais entre os pares de cadeias α s e β s são um bom indicador da qualidade da estrutura encontrada (Borgstahl, *et al.*, 1994). A superposição das duas cadeias α refinadas sem simetria não cristalográfica apresentam desvio rms para a cadeia principal (exceto 5 resíduos de aminoácidos N- e C-terminais) igual a 0,20Å. O mesmo foi feito para as cadeias β , as quais apresentam desvio rms igual a 0,32Å, mostrando que o refinamento convergiu independentemente para cadeias correspondentes, de maneira similar.

Após realização de refinamento posicional utilizando-se simetria não cristalográfica, as superposições das cadeias α s e β s apresentaram desvio rms iguais a 0,06Å e 0,05Å, respectivamente.

O desvio rms médio do modelo em relação aos dados de difração de raios X foi calculado através da rotina SIGMAA (Read, 1986) do pacote CCP4 e obteve-se um erro de 0,3Å para as coordenadas atômicas.

O mapa de densidade eletrônica final apresenta ótima concordância com o modelo obtido. Apenas 6 resíduos de aminoácidos (3 terminais e 3 localizados em *corner*) num total de 574, apresentam falhas na densidade da cadeia principal. São eles os resíduos de aminoácidos Asn80 da cadeia β_1 e Tyr145 e His146 da cadeia β_1 ; Val1 da cadeia α_2 e Asn80 e Leu81 da cadeia β_2 . Outros 42 resíduos de aminoácidos apresentam alguma segmentação na densidade eletrônica da cadeia lateral, 8 na cadeia α_1 ; 17 na cadeia β_1 , 6 na

cadeia α_2 e 11 na cadeia β_2 . Como se verifica na Tabela 3.5, a grande maioria de resíduos de aminoácidos que apresentam falhas na densidade eletrônica são resíduos de aminoácidos terminais ou resíduos de aminoácidos de cadeia lateral longa, e estão localizados na superfície da molécula. Portanto são resíduos de aminoácidos com alta mobilidade, justificando a ausência de densidade eletrônica.

Vemos também que o *corner* EF da cadeia β possui alta mobilidade, devido à alta incidência de resíduos de aminoácidos pertencentes a esta estrutura secundária, apresentando segmentação em sua densidade eletrônica.

Por terem importante participação na parte do efeito Bohr independente de íons, a imprecisão na densidade eletrônica dos resíduos de aminoácidos Tyr145 e His146 da cadeia β_1 , impossibilitam comparações eficazes na elucidação desta parte do efeito Bohr.

Tabela 3.5 – Resíduos de aminoácidos com segmentação na densidade eletrônica da cadeia lateral. Entre parênteses está indicada a estrutura secundária a que pertence o resíduo e sua posição naquela estrutura. Em negrito estão indicados os resíduos de aminoácidos que também apresentam falhas na densidade eletrônica da cadeia principal.

Cadeia α_1	Cadeia β_1		Cadeia α_2	Cadeia β_2
Lys7 (A5)	Lys8(A5)	Lys87(F3)	Val1(NA1)	His2(NA2)
Lys11(A9)	Ser9(A9)	Glu90(F6)	Lys16(A14)	Lys65(E9)
Lys16(A14)	Asp21(B3)	Leu91(F7)	Lys56(E5)	Lys66(E10)
Lys56(E5)	Asp52(D3)	Lys95(FG2)	Lys99(G6)	Asn77(EF1)
Asp75(EF4),	Lys66(E10)	Lys104(G6)	Lys139(HC1)	Asp79(EF3)
Lys90(FG2)	Asn77(EF1)	Lys120(GH3)	Arg141(HC3)	Asn80(EF4)
Lys99(G6)	Asp79(EF3)	Tyr145(HC2)		Leu81(EF5)
Lys139(HC1)	Asn80(EF4)	His146(HC3)		Lys82(EF6)
	Lys82(EF6)			Lys87(F3)
				Glu90(F6)
				Lys95(FG2)

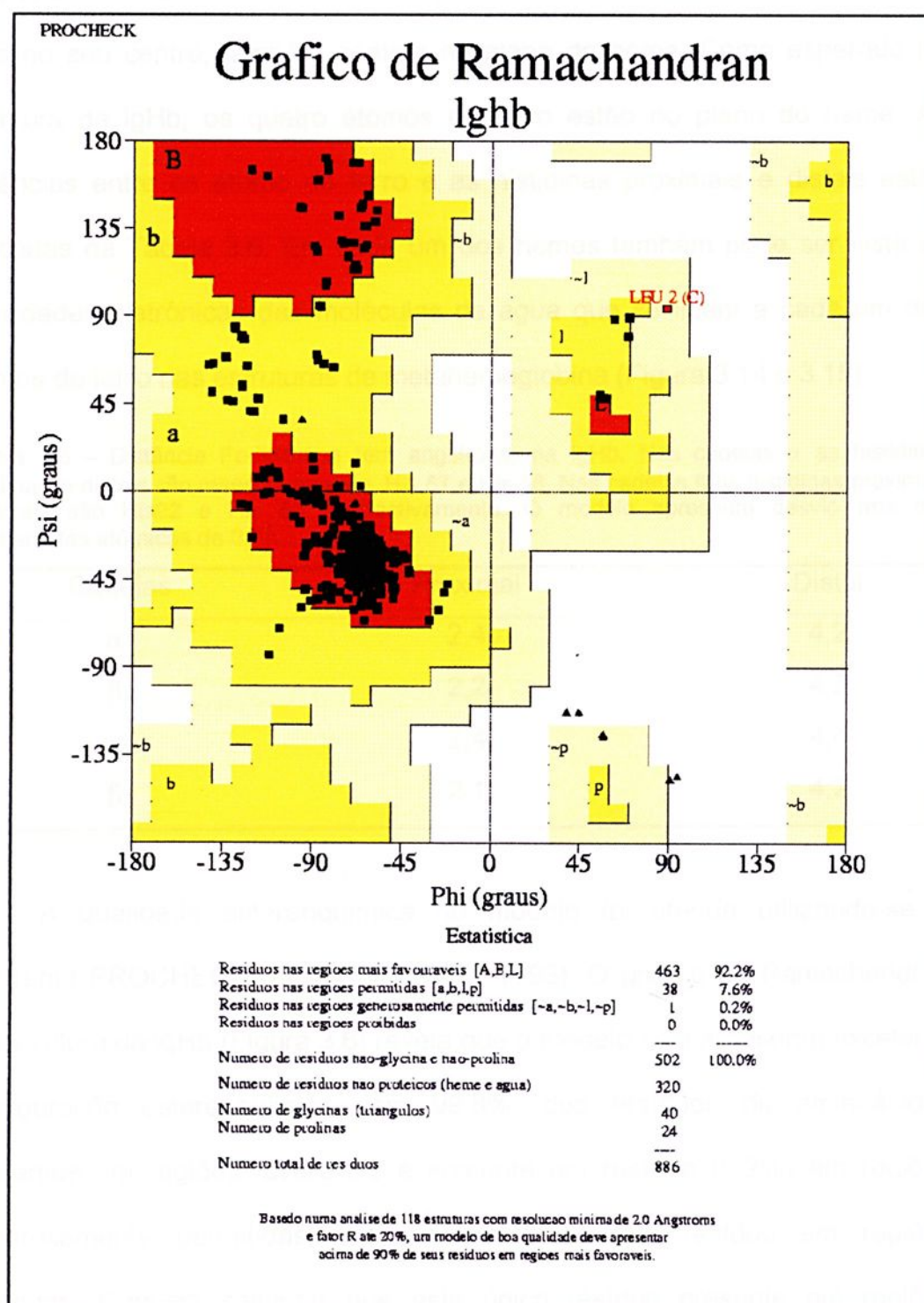


Figura 3.6 - Gráfico de Ramachandran da estrutura final da IgHb calculado pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Nas estruturas de hemoglobinas ligadas, todos os átomos pertencentes ao grupo heme formam uma estrutura planar (Shaanan, 1983), com o átomo de ferro no seu centro, também contido no plano do heme. Como esperado na estrutura da IgHb, os quatro átomos de ferro estão no plano do heme. As distâncias entre os átomo de ferro e as histidinas proximais e distais estão indicadas na Tabela 3.6. Em cada um dos hemes também pode ser vista as densidades eletrônicas das moléculas de água que se ligam a cada um dos átomos de ferro nas estruturas de metahemoglobina (Figura 3.14 e 3.15).

Tabela 3.6 – Distância Fe-histidina (em angstrons) na IgHb. Nas cadeias α as histidinas proximais e distais são respectivamente, His 87 e His 58. Nas cadeias β as histidinas proximais e distais são His92 e His 63, respectivamente. O modelo apresenta desvio rms das coordenadas atômicas de 0,3Å.

Cadeias	Proximal	Distal
α_1	2,4	4,2
β_1	2,2	4,2
α_2	2,4	4,4
β_2	2,1	4,2

A qualidade estereoquímica do modelo foi aferida utilizando-se o programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). O gráfico de Ramachandran da estrutura da IgHb (Figura 3.6) revela que o modelo final apresenta excelente configuração estereoquímica com 99,8%, dos resíduos de aminoácidos presentes em regiões favoráveis e somente um resíduo (0,2%) em regiões generosamente permitidas, não possuindo nenhum resíduo em regiões proibidas. Convém salientar que este único resíduo presente em regiões generosamente permitidas (Leu2C) pertence ao N-terminal, região com alta flexibilidade, e portanto com baixa definição no mapa de densidade eletrônica. O modelo apresenta excelente esterequímica com desvios rms dos

comprimentos de ligação e ângulos de ligação iguais a 0.013Å e 1,71°, respectivamente, juntamente com outros parâmetros estereoquímicos apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Valores de coeficientes de confiabilidade do refinamento e parâmetros estereoquímicos para a estrutura final da IgHb, calculados por X-PLOR (geomanal.inp).

Estatísticas finais do refinamento da IgHb

R factor (%)	19,4
R free (%)	24,6
Desvio rms da idealidade dos comprimentos das ligações (Å)	0,013
Desvio rms da idealidade dos ângulos da ligações (°)	1,71
Desvio rms da idealidade dos ângulos diédricos (°)	21,17
Desvio rms da idealidade dos ângulos diédricos impróprios (°)	1,93

3.5 - COMPARAÇÃO COM A HEMOGLOBINA HUMANA

Tomou-se como referência para as nossas comparações a estrutura R da oxiHb A humana depositada no *Protein Data Bank* (PDB) sob código 1HHO (Shaanan, 1983). Também depositada no PDB existe uma segunda estrutura para hemoglobina humana ligada, a R2 sob código de acesso 1BBB (Silva, 1992). Para decidir-se qual estrutura utilizar-se nas comparações, efetuou-se a superposição do tetrâmero da IgHb sobre os tetrâmeros destas duas hemoglobinas humanas. Os valores encontrados foram 0,76Å para a estrutura R e 1,62Å para a estrutura R2. Estes valores claramente indicam que a estrutura da IgHb encontra-se na forma R.

Todas as superposições e cálculos de desvios rms foram realizadas utilizando-se o programa ProFit V1.8¹. Nas superposições foram superpostas

¹©Dr. Andrew C.R. Martin, SciTech Software, 1992-8.



somente as cadeias principais das hélices B, G e H dos monômeros α s e β s. Estas hélices, que compõem o chamado sistema BGH, fazem parte do núcleo interno destes monômeros que compõem as moléculas das hemoglobinas, e são estruturalmente mais conservadas nas transições R $\rightarrow$ T nas diferentes hemoglobinas. Os desvios rms foram calculados para todos os átomos da cadeia principal, exceto os 5 resíduos de aminoácidos dos N-terminais e C-terminais de cada um dos monômeros.

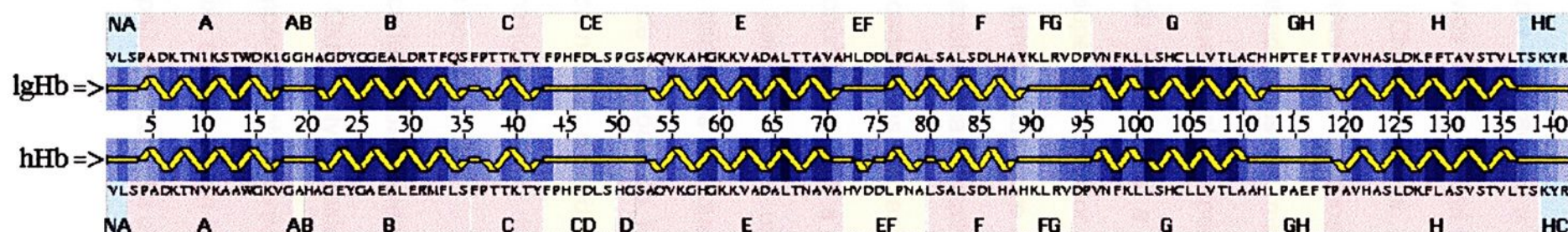
As duas hemoglobinas comparadas, oxiHb humana e IgHb, possuem estruturas secundárias, terciárias e quaternárias extremamente próximas, como pode ser verificado nas Figuras 3.7 e 3.9.

Pequenas diferenças quanto à estrutura secundária podem ser identificadas na Figura 3.7. A mais visível delas é a identificação distinta das estruturas secundárias na IgHb e na hHb. As definições de limites de estruturas secundárias são em geral imprecisas (Lesk, 1991). De fato, para diferentes propósitos, diferentes definições são utilizadas. Historicamente, a identificação para a hHb mostrada na Figura 3.7 tem sido utilizada, embora algumas regiões pareçam não concordar com esta identificação, e aqui foi mantida. Quanto à IgHb, a regra utilizada tem o objetivo de salientar as estruturas encontradas.

Quando compara-se as estruturas secundárias propriamente ditas, observa-se que as hélices E e G da cadeia α e E da cadeia β apresentam um resíduo a mais na IgHb do que na hHb, e a hélice B da cadeia β apresenta 3 resíduos de aminoácidos a mais na IgHb do que na hHb. Estas diferenças não são significativas pelas razões apresentadas anteriormente.



Cadeia α



Cadeia β

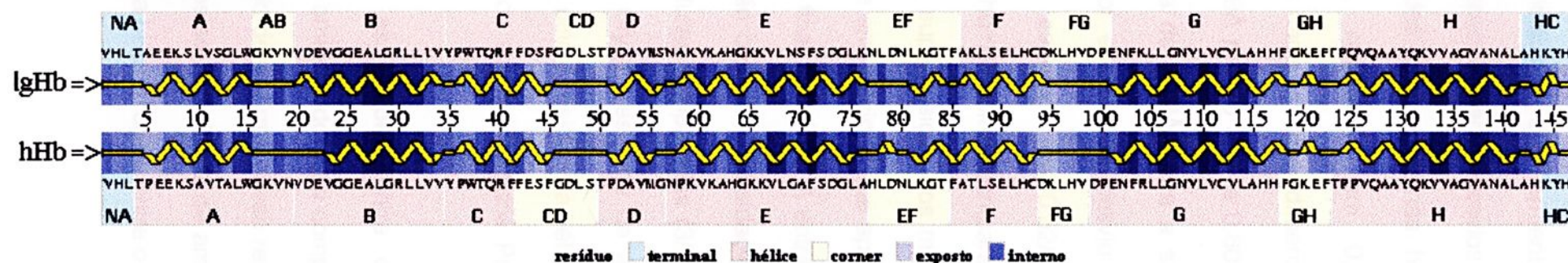


Figura 3.7 – Comparação entre as estruturas secundárias da hemoglobina do Lobo Guará (IgHb) e da hemoglobina humana (hHb) gerado pelo programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). As letras maiúsculas são utilizadas para identificar as estruturas secundárias (hélices e *corners*). A identificação destas estruturas na hHb segue o padrão atualmente utilizado para localização dos resíduos de aminoácidos, enquanto na IgHb a identificação foi feita no sentido de identificar as estruturas secundárias encontradas.

Na superposição de cada um dos monômeros da IgHb sobre a hHb isoladamente, seguindo-se os critérios indicados anteriormente, foi encontrado para cada uma das cadeias α e β , respectivamente, desvios rms de 0,51Å e 0,51Å. Desvios rms teóricos esperados para proteínas homólogas foram calculados (Chothia *et al.*, 1986), resultando em 0,55Å e 0,48Å, respectivamente. Na superposição de cada um dos dímeros isoladamente, foram encontrados desvios rms de 0,59Å para o $\alpha_1\beta_1$ e 0,60Å para o dímero $\alpha_2\beta_2$, sendo que o valor esperado era de 0,52Å. Para a superposição dos tetrâmeros da IgHb sobre a hHb, foi encontrado desvio rms de 0,76Å, levemente superior ao valor teórico esperado de 0,52Å. Estes valores confirmam a similaridade entre as duas hemoglobinas comparadas.

Uma análise mais detalhada da superposição dos monômeros mostra que, para as cadeias α s, os resíduos de aminoácidos que apresentam desvios rms mais pronunciados são: a metade final da hélice A entre os resíduos de aminoácidos Ser12 e Lys16, uma região com alta densidade de resíduos de aminoácidos diferentes nas duas estruturas comparadas (3/5); a região entre os resíduos de aminoácidos His45 e Gly51, resíduos de aminoácidos que compõem o *corner* CE; o resíduo Ala71, último resíduo da hélice E, que na hHb termina no resíduo anterior; os resíduos de aminoácidos Pro114 e Thr115, pertencentes ao *corner* GH.

Nas cadeias β s, destacam-se as regiões: entre os resíduos de aminoácidos Glu6 e Gly16, resíduos de aminoácidos que compõem a hélice A, que pelo comportamento decrescente do desvio rms nessa região, indica uma rotação do eixo da hélice com centro nos seus resíduos de aminoácidos finais; o resíduo Asp43, que substitui um Glu na hHb; a região entre os resíduos de



Tabela 3.8 – Valores rms da superposição das hélices B G e H da IgHb sobre a estrutura da hemoglobina humana ligada R para a cadeia principal, exceto os 5 resíduos terminais.

Estrutura R (Shaanan, 1983)		
	RMS calc. (Å)	RMS teórico (Å)
α_1 sobre α_1	0,51	0,55
β_1 sobre β_1	0,51	0,48
$\alpha_1\beta_1$ sobre $\alpha_1\beta_1$	0,59	0,52
IgHb sobre hHb	0,76	0,52

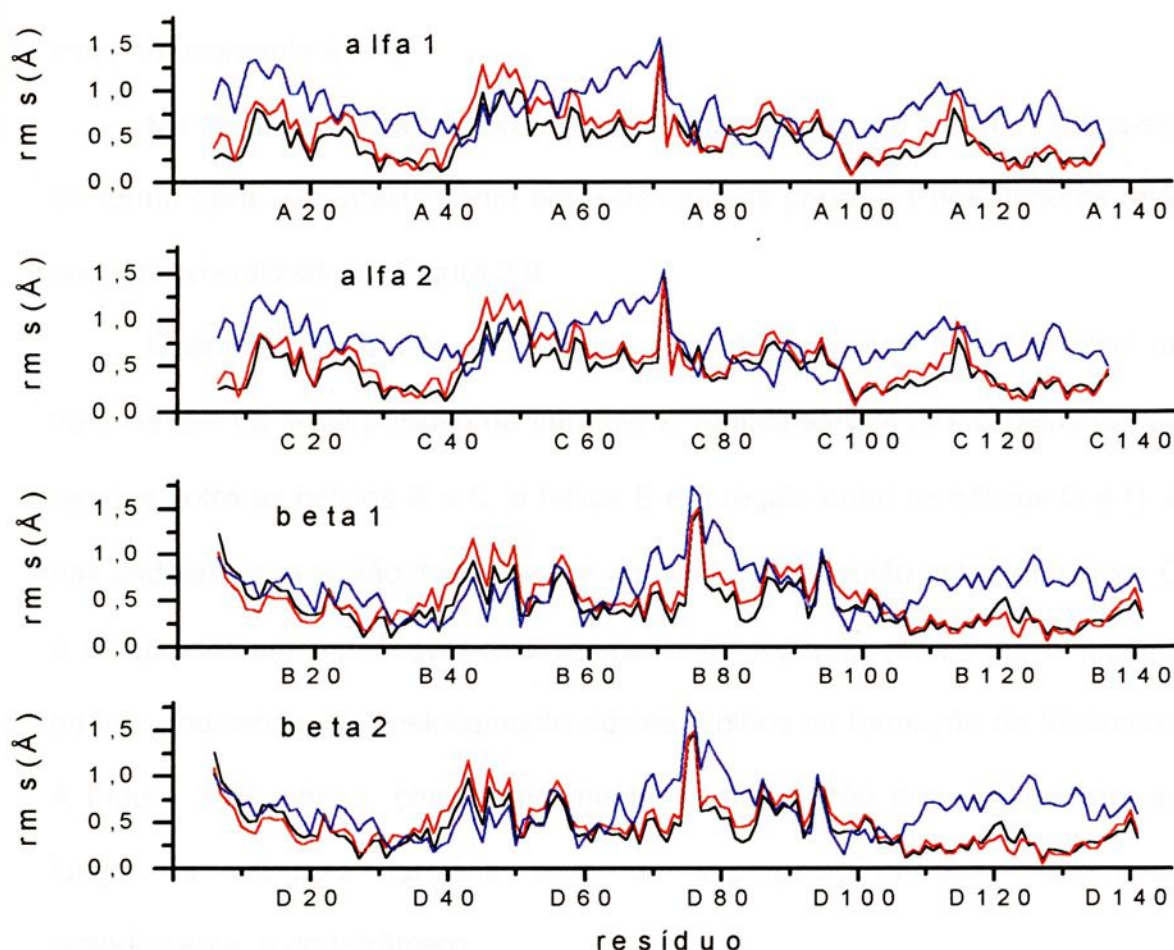


Figura 3.8 – Gráficos das superposições da cadeia principal dos monômeros α_1 α_2 β_1 β_2 da IgHb sobre a hHb. A linha preta refere-se à superposição de cada uma das cadeias individualmente, a linha vermelha à superposição dos dímeros $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$ e a linha azul refere-se à superposição do tetrâmero completo. Percebe-se que a superposição dos monômeros e dos dímeros não apresentam diferenças, enquanto que na superposição do tetrâmero os desvios rms diferem dos desvios das superposições anteriores.

aminoácidos Gly46 e Ser49, que compõem o *corner* ED; os resíduos de aminoácidos Leu75 e Lys76, resíduos de aminoácidos terminais da estrutura da hélice E, que na hHb estende-se somente até o resíduo de aminoácido Leu75; os resíduos de aminoácidos Cys94 e Asp95, resíduos de aminoácidos terminais da hélice F, que na hHb alcança somente o resíduo Cys94.

A superposição dos dímeros isoladamente apresenta um padrão de desvios rms ao longo das cadeias que acompanha o padrão da superposição dos monômeros isoladamente como pode ser visto na Figura 3.10, indicando que a formação dos dímeros na IgHb não induz diferenciação suplementar, comparativamente à hHb.

Na formação do tetrâmero da IgHb, em comparação à hHb, verifica-se, de forma geral, um afastamento entre as cadeias principais dos dímeros, que pode ser visualizado na Figura 3.9.

Quando compara-se os desvios rms das cadeias isoladas com os desvios rms da superposição do tetrâmero, verifica-se que nas cadeias α s, as regiões entre as hélices A e C, a hélice E e a região entre as hélices G e H, e nas cadeias β s, a região da hélice E e *corner* EF, e a região entre as hélices G e H apresentam um desvio rms ligeiramente superior, mantendo o mesmo padrão, indicando um deslocamento destas regiões na formação do tetrâmero. A Figura 3.10 mostra, comparativamente, a distribuição dos desvios rms ao longo da estrutura terciária para as superposições dos monômeros isoladamente, e do tetrâmero.

Como existe densidade eletrônica bem definida no mapa de $2F_o - F_c$ para a cadeia principal nas regiões citadas, conclui-se que estas diferenças estruturais entre a hHb e a IgHb são reais.



Das medidas funcionais verifica-se que a IgHb apresenta praticamente o mesmo efeito Bohr alcalino que a hHb pois o número de prótons liberados com a oxigenação total da IgHb é $nH=2,5$ e $2,4$ para a hHb (Castro, 1999), como pode ser visto na Figura 3.11. Parte do efeito Bohr alcalino é dependente da distribuição de cargas na cavidade central (Perutz *et al.* 1998). Na forma T (desoxigenada) a cavidade central é substancialmente eletropositiva e na transição R→T íons cloreto ligam-se nesta cavidade neutralizando este excesso de carga central. Diferenças na distribuição de cargas desta cavidade podem indicar diferenças no efeito Bohr alcalino.

Uma verificação visual do potencial eletrostático na superfície das cavidades centrais da IgHb e da hHb pode ser efetuada através da Figura 3.12, gerada pelo programa GRASP (Nicholls, 1993). Muito embora na sua forma T (desoxigenada) o potencial eletrostático na cavidade central seja substancialmente eletropositivo, pode-se ver que, embora os potenciais eletrostático nas cavidades centrais das estruturas R sejam substancialmente eletronegativos, são extremamente semelhantes nas duas hemoglobinas, o que pode justificar a igualdade do efeito Bohr alcalino na IgHb e na hHb.

Quando compara-se o posicionamento dos hemes na estrutura, verifica-se que as distâncias dos hemes às histidinas são comparáveis com as encontradas nas oxi-Hb humana (Tabela 3.9). As superposições dos hemes da hHb e da IgHb (Figura 3.13) também mostram que o bolsão dos hemes nas duas estruturas são compatíveis e portanto, não devem haver diferenças funcionais entre a IgHb e a hHb, oriundas da interface heme-proteína

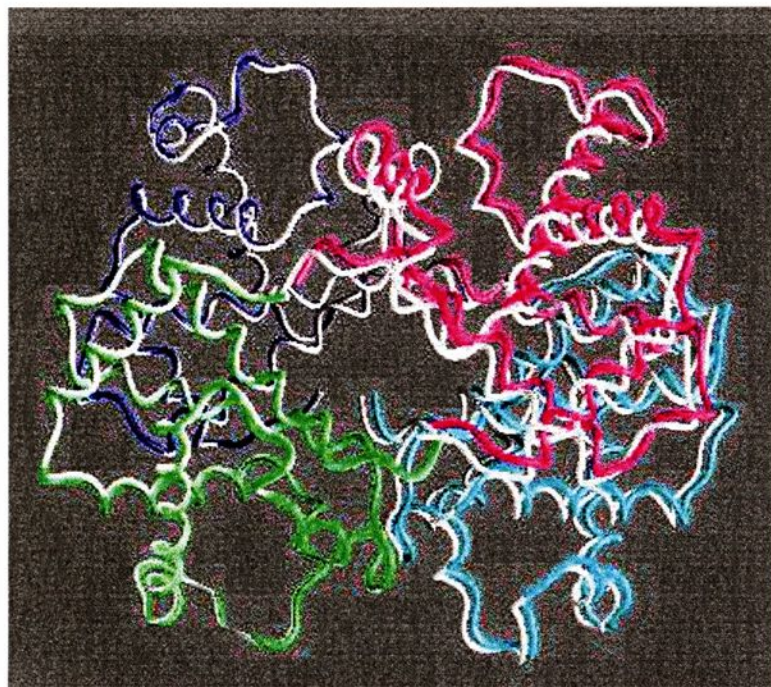


Figura 3.9 – Representação das cadeias principais dos tetrâmeros da IgHb (em cores) sobre a hHb (branca) com um dímero (à direita) superposto. Nota-se a igualdade entre os dímeros e um distanciamento entre as cadeias principais dos dímeros da IgHb maior do que entre os dímeros da hHb.

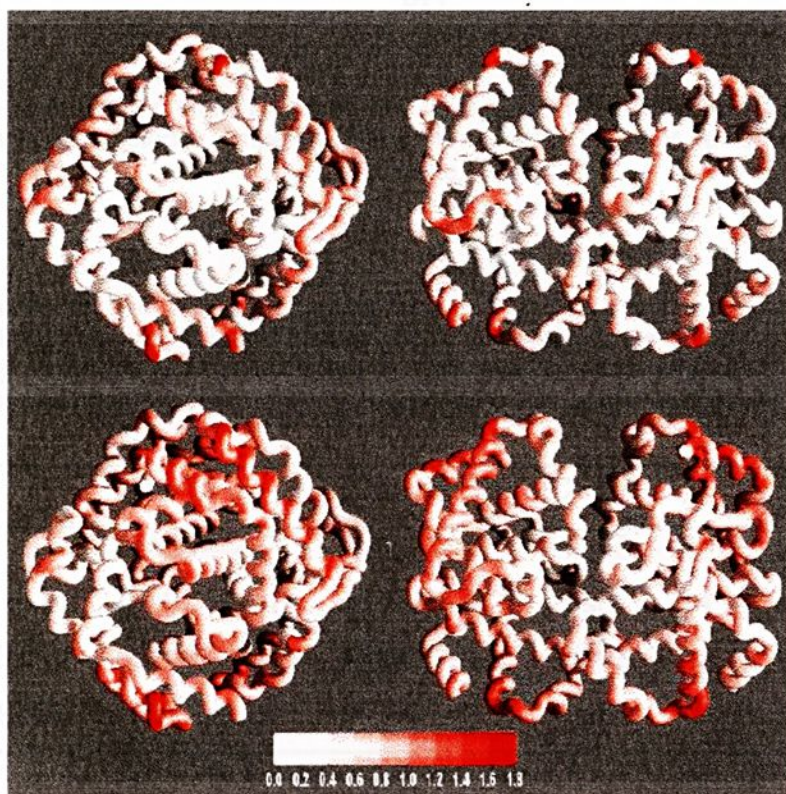


Figura 3.10 – Imagem frontal e lateral da IgHb, coloridas por rms conforme escala, em Angstroms. As figuras superiores estão coloridas pelo rms da superposição dos monômeros da IgHb sobre a hHb e pode-se visualizar diferenças pontuais entre as estruturas. As figuras inferiores estão coloridas pelo rms da superposição do tetrâmero, onde pode-se visualizar deslocamentos de estruturas secundárias completas.

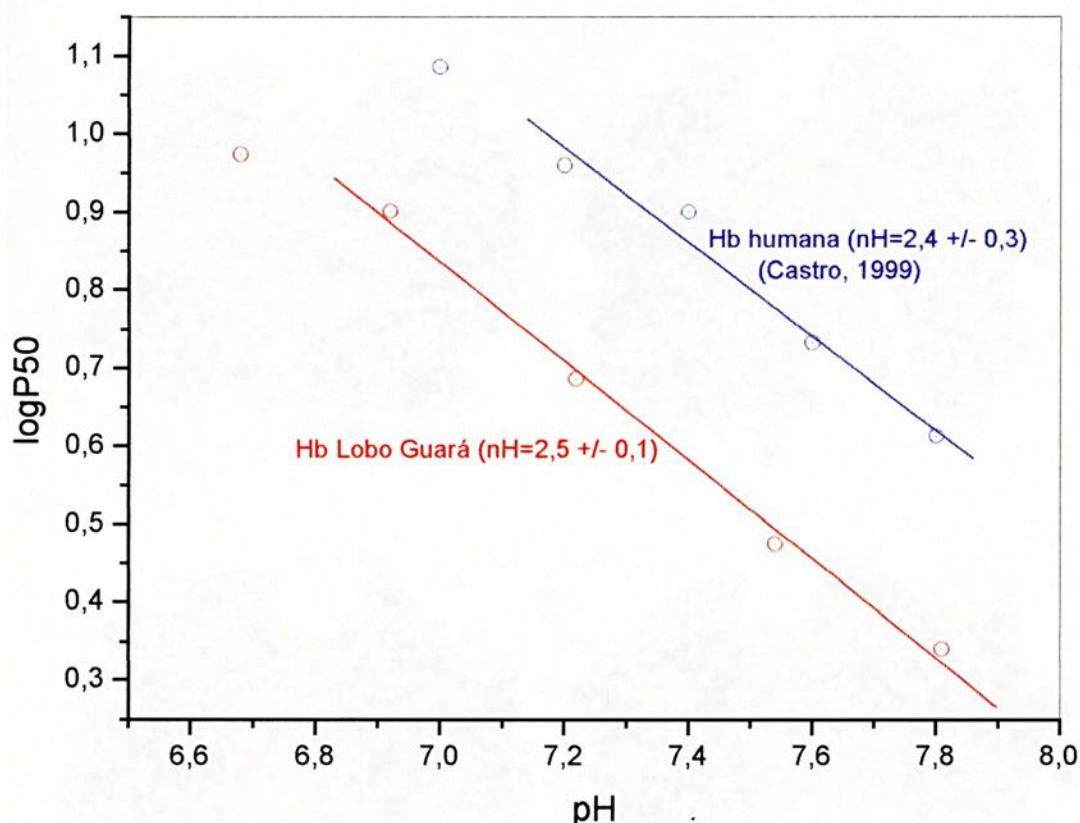


Figura 3.11 – Número de prótons liberados com a oxigenação total da hHb e da lgHb (efeito Bohr) dissolvidas em solução tampão de Hepes 10mM e NaCl 0,1mM na concentração de 60 μ M/heme.

Tabela 3.9 – Distâncias Fe-histidina (em angstroms) nas estruturas das hemoglobinas oxihHb e lgHb. His58 e His63 são as histidinas distais, His 87 e His92 são as histidinas proximais nas cadeias α e β , respectivamente. A frente da identificação de cada hemoglobina, entre parêntesis está indicado o desvio rms nas coordenadas atômicas calculado para cada molécula.

Molécula	Cadeia α_1	Cadeia β_1	Cadeia α_2	Cadeia β_2
LgHb (0,3Å)	His58 – 4,2	His63 – 4,2	His58 – 4,2	His63 – 4,2
	His87 – 2,4	His92 – 2,2	His87 – 2,4	His92 – 2,1
Oxy hHb (0,35Å) (Shaanan, 1983)	His58 – 4,3	His63 – 4,2	His58 – 4,3	His63 – 4,2
	His87 – 1,9	His92 – 2,1	His87 – 1,9	His92 – 2,1

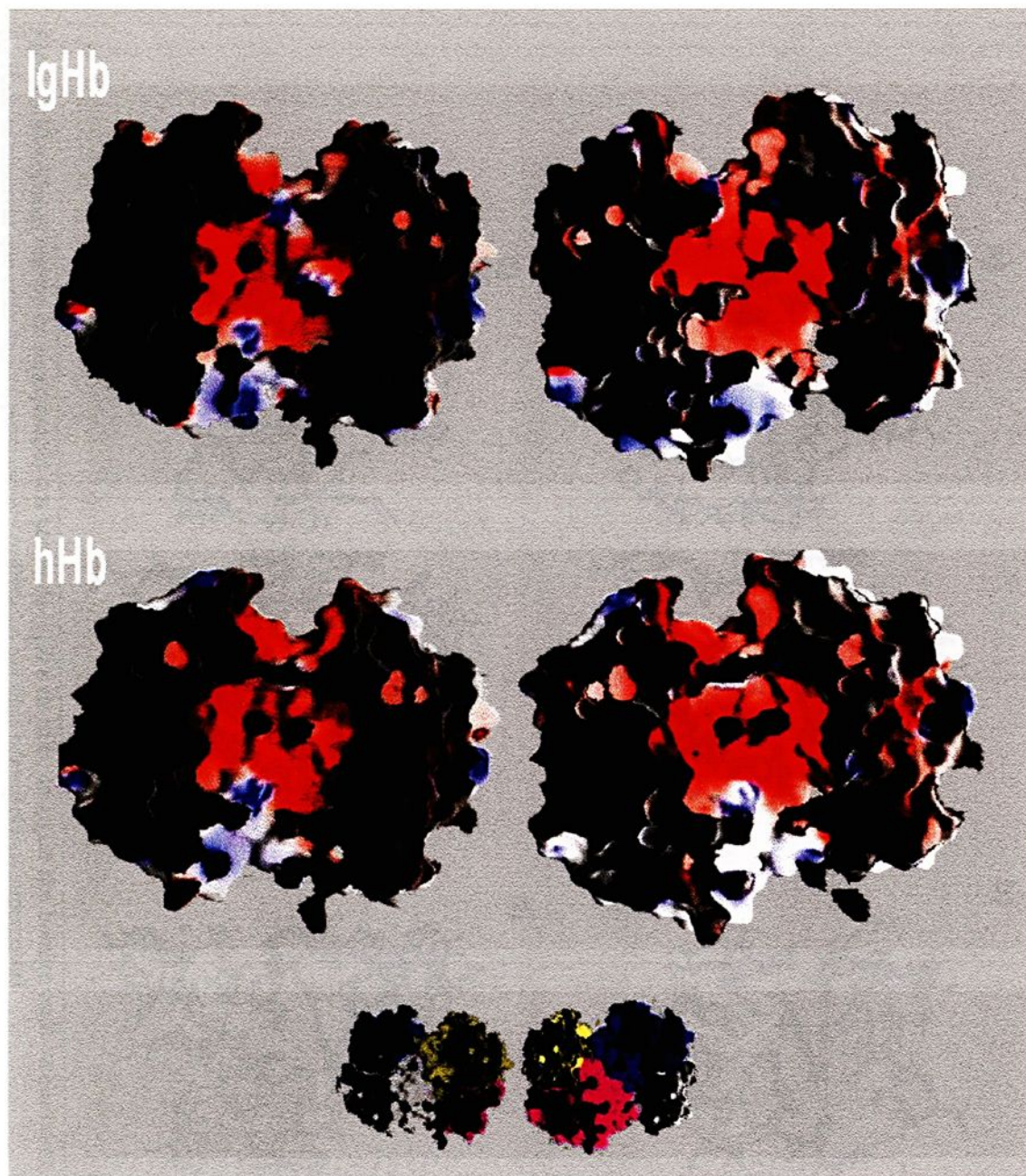


Figura 3.12 – Potencial eletrostático na cavidade central da IgHb e da hHb calculado com GRASP (Nicholls *et al*, 1993) representado desde $-8k$ (vermelho) até $8k$ (azul) com regiões neutras em branco. As regiões negras indicam a ausência de superfície. As duas imagens representam um corte da molécula pelo plano central que contém um eixo vertical de simetria de ordem 2, sendo a figura da direita a parte anterior do corte e a figura da esquerda a parte posterior, rodada de 180° ao longo do eixo vertical. A parte superior de cada figura é formada pelas cadeias α_1 e α_2 e a parte inferior pelas cadeias β_1 e β_2 . Nota-se a similaridade entre a distribuição dos potenciais eletrostáticos da cavidade central das duas moléculas, indicando a semelhança no efeito Bohr alcalino das duas hemoglobinas. Na figura pequena pode-se ver a cadeia α_1 em amarelo, α_2 em azul, β_1 em rosa e β_2 em branco.

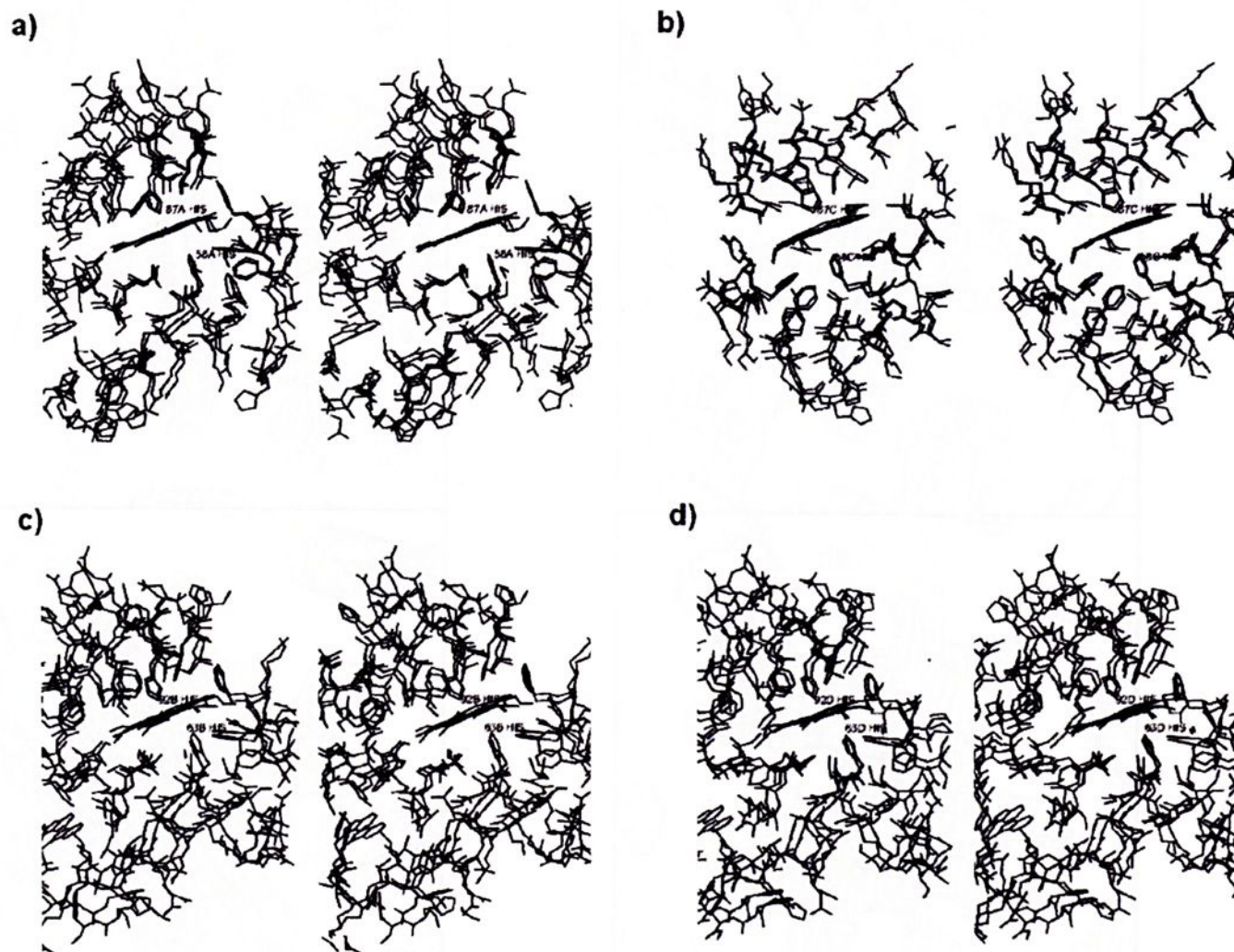
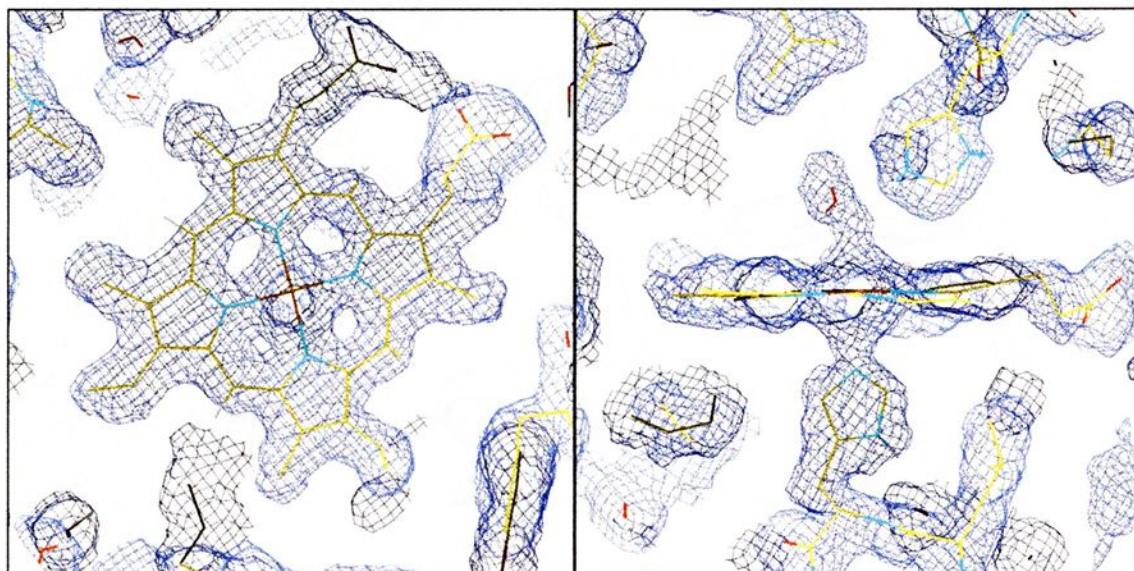


Figura 3.13 – Visões estéreo da superposição dos hemes da IgHb e da hHb, na região dos bolsões onde localizam-se estes hemes. Os monômeros são: a) α_1 , b) α_2 , c) β_1 e d) β_2 . Pode-se observar que estas regiões permanecem inalteradas nas duas hemoglobinas superpostas.

a)



c)

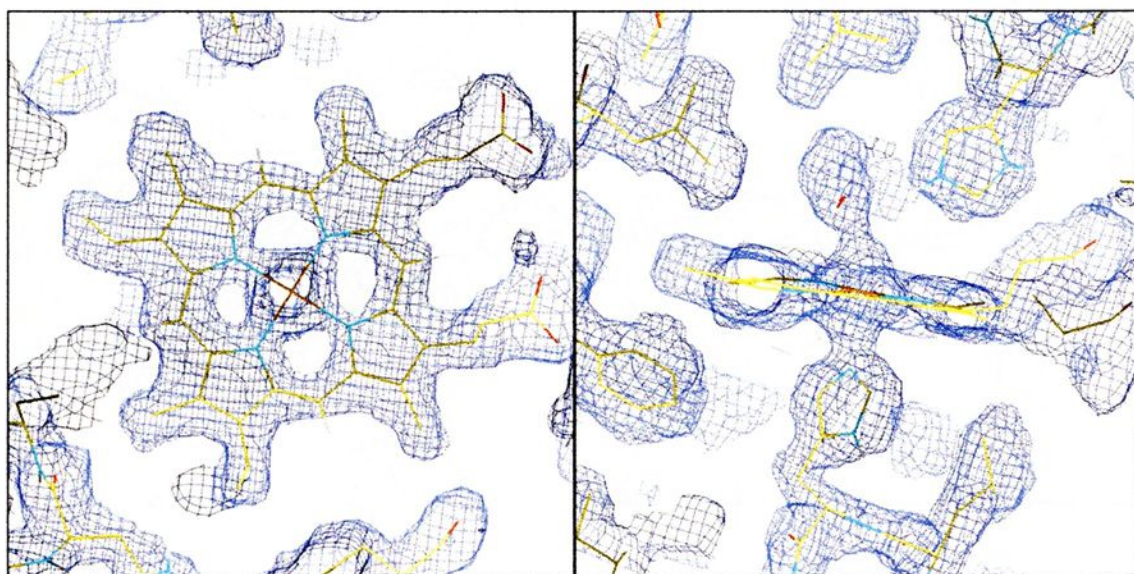
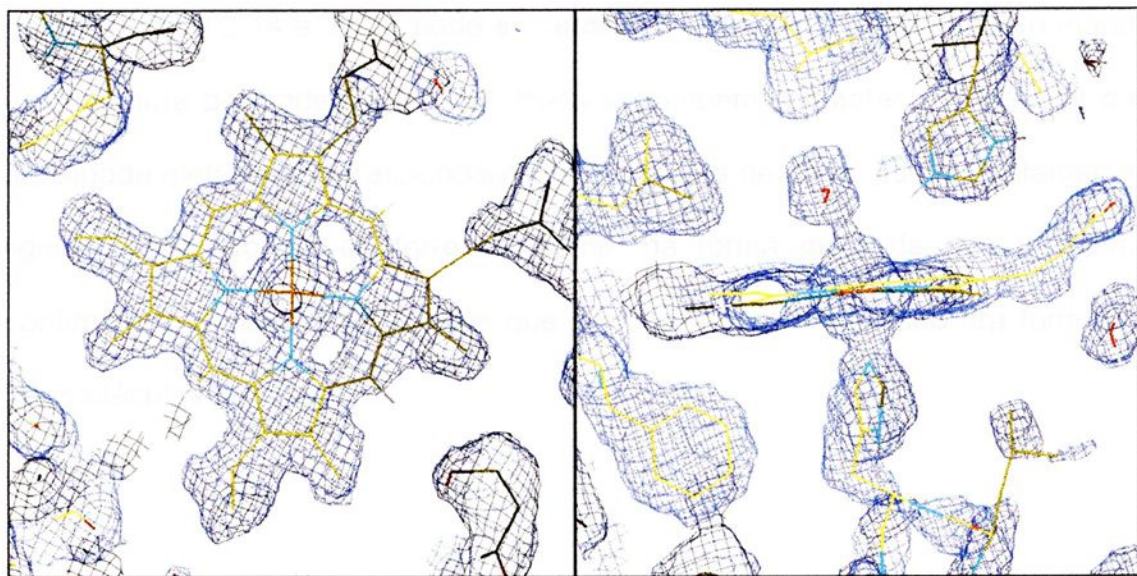


Figura 3.14 – Vistas frontal e lateral do mapa de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ contornado a 1σ , da região dos hemes dos monômeros α_1 (a) e α_2 . (c). Nas vistas laterais pode-se constatar a presença de densidade eletrônica correspondente às moléculas de água ligadas ao heme.

b)



d)

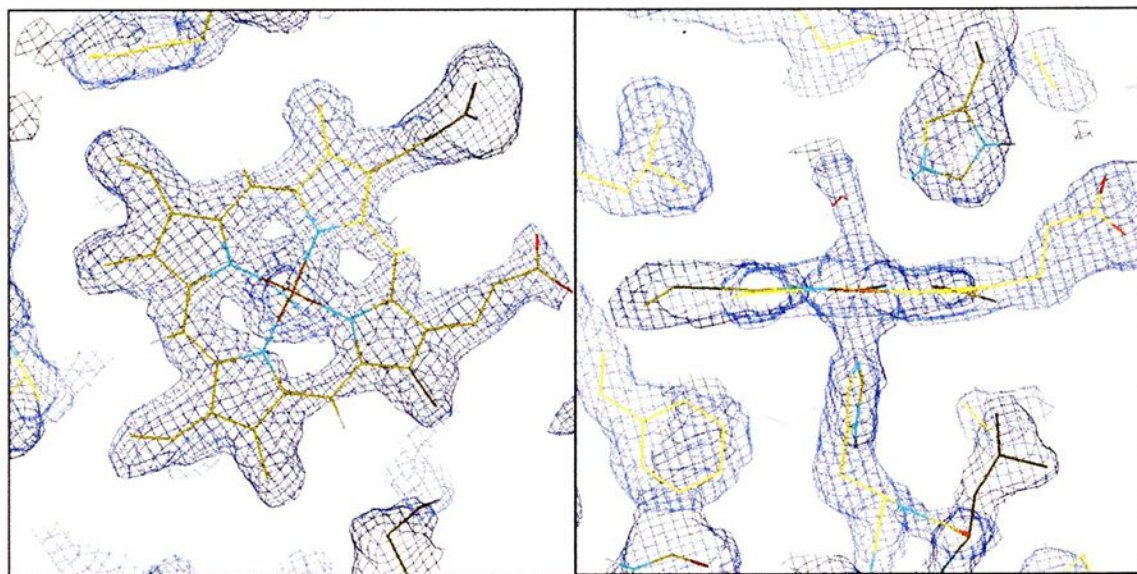


Figura 3.15—Vistas frontal e lateral do mapa de densidade eletrônica $2F_0 - F_c$ contornado a 1σ , da região dos hemes dos monômeros β_1 (b) e β_2 (d). Nas vistas laterais pode-se constatar a presença de densidade eletrônica correspondente às moléculas de água ligadas ao heme.

Inspecionando-se o mapa de densidade eletrônica $2F_0-F_c$ na região dos hemes (Figura 3.14 e 3.15), pode-se verificar a boa concordância entre o mapa e a estrutura do modelo proposto. Pode-se também constatar a existência de densidade eletrônica correspondente às moléculas de água, que supostamente ligam-se aos átomos de ferro do heme, na forma meta da hemoglobina, confirmando a nossa hipótese de que o cristal de IgHb difratado era formado por moléculas de metaHb.

APÊNDICE A – DIFRAÇÃO DE RAIOS X

(Drenth, 1994 e Blundell, 1976)

ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UM ÁTOMO

Um feixe de raios X quando interage com a matéria é espalhado por dois processos distintos:

Espalhamento Compton: Devido ao comportamento de partícula da radiação. Os fótons incidentes são desviados de sua trajetória pelo átomo com perda de energia. É um espalhamento incoerente, e portanto ignorado em cristalografia por difração de raios X.

Espalhamento Thomson: Quando radiação eletromagnética com frequência ω incide em uma carga livre, esta carga oscila por ação dos campos elétrico e magnético, na mesma frequência da radiação incidente. Esta carga acelerada emite radiação nesta mesma frequência, defasada de 180° em relação à radiação incidente, mas em fase para qualquer ângulo de espalhamento. Esta é a radiação espalhada importante para a cristalografia de difração de raios X.

A intensidade da radiação espalhada $I_{2\theta}$ é dada por:

$$I_{2\theta} = I_0 \frac{ne^4}{2r^2m^2c^4} (1 + \cos^2 2\theta) \quad \text{A.1}$$

onde I_0 é a intensidade do feixe de radiação não polarizada incidente, n é o número de cargas espalhadoras efetivas, e é a carga do elétron, r é distância do centro espalhador, m é a massa da carga, c é a velocidade da luz e 2θ é o

ângulo entre o feixe espalhado e o feixe incidente. A presença das quantidades m^2 e c^4 no denominador indica dois fatos importantes: 1) em um átomo, os principais centros espalhadores são os elétrons, uma vez que a massa do próton é aproximadamente 2000 vezes maior que a massa do elétron e 2) a intensidade da radiação espalhada é bastante fraca.

FATOR DE ESPALHAMENTO ATÔMICO

Em um átomo, o elétron não é uma carga livre. Ele está ligado ao núcleo e ocupa uma região limitada do espaço. Portanto, sua carga deve ser representada por uma distribuição espacial de carga $\rho(\mathbf{r})$.

Quando incide-se um feixe de radiação com direção $\mathbf{s}_0$ no centro de um sistema de coordenadas, a radiação espalhada por um átomo numa direção $\mathbf{s}$ é:

$$f(\mathbf{S}) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{do} \\ \text{átomo}}} \rho(\mathbf{r}) \cdot \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{v} \quad \text{A.2}$$

onde $f(\mathbf{S})$ é o *fator de espalhamento atômico*, $\mathbf{S}$ é igual a $(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$ e $\mathbf{r}$ é a posição da densidade de carga espalhadora $\rho(\mathbf{r})d\mathbf{v}$.

Como usualmente assume-se que a densidade de carga de todos os átomos é esfericamente simétrica, e consequentemente centro simétrico, o fator de espalhamento atômico também é esfericamente simétrico e real. O fator de espalhamento atômico da maioria dos átomos foram calculados e encontram-se tabelados na International Tables of Crystallography, Volume III.

FATOR DE TEMPERATURA B

A expressão derivada para o fator de estrutura assume o átomo em repouso. Na verdade, o átomo possui movimento térmico e isto afeta a intensidade do espalhamento por um fator

$$T(iso) = \exp \left[-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right] \quad A.3$$

com

$$B = 8\pi^2 \overline{u^2}$$

onde u é o deslocamento térmico e (iso) indica a vibração isotrópica.

ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UMA MOLÉCULA

Para um átomo deslocado de $\mathbf{r}_1$ do centro de coordenadas tem-se um fator de espalhamento

$$f_1 = \int \underset{\substack{\text{volume} \\ \text{do} \\ \text{átomo}}}{\rho(\mathbf{r})} \exp(2\pi i(\mathbf{r} + \mathbf{r}_1) \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{v} = f_1 \exp(2\pi i \mathbf{r}_1 \cdot \mathbf{S}) \quad A.4$$

A radiação espalhada total de uma molécula é a soma da contribuição de cada átomo que a compõe, ou seja:

$$G(\mathbf{S}) = f_1 + f_2 + f_3 + \dots f_N = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S}) \quad A.5$$



ESPALHAMENTO DE RAIOS X POR UM CRISTAL

A radiação espalhada por uma molécula é, $G(\mathbf{S})$. Para moléculas arranjadas em um retículo cristalino com vetores unitários $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ e $\mathbf{c}$, a posição de um átomo qualquer em relação ao átomo correspondente da molécula na cela unitária é obtida pela translação de $\mathbf{d} = n_a\mathbf{a} + n_b\mathbf{b} + n_c\mathbf{c}$. Para uma molécula qualquer do retículo cristalino terá a radiação espalhada dada por:

$$G_n(\mathbf{S}) = G(\mathbf{S}) \exp(2\pi i \mathbf{d}_n \cdot \mathbf{S}) \quad \text{A.6}$$

e a radiação total do cristal composto de T moléculas será dada por:

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{n=0}^T G_n(\mathbf{S}) = \sum_{n=0}^T G(\mathbf{S}) \exp(2\pi i \mathbf{d}_n \cdot \mathbf{S})$$

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{n=0}^T G(\mathbf{S}) \exp[n_{ai}(2\pi i \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}) + n_{bi}(2\pi i \mathbf{b} \cdot \mathbf{S}) + n_{ci}(2\pi i \mathbf{c} \cdot \mathbf{S})] \quad \text{A.7}$$

Como T é muito grande (10^5 em um cristal de 1mm) parcelas da soma acima que possuam diferentes orientações deverão anular-se em média e somente teremos superposição construtiva quando

$$\begin{aligned} 2\pi \mathbf{a} \cdot \mathbf{S} &= 2\pi h \\ 2\pi \mathbf{b} \cdot \mathbf{S} &= 2\pi k \\ 2\pi \mathbf{c} \cdot \mathbf{S} &= 2\pi l \end{aligned} \quad \text{A.8}$$



com h , k e l inteiros. Estas são as *Equações de Laue* e os inteiros h , k e l são os chamados índices de Miller

Escrevendo a posição dos átomos em coordenadas fracionárias obtemos:

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{S} \quad \text{A.9}$$

onde $\mathbf{r}_j = a\mathbf{x}_j + b\mathbf{y}_j + c\mathbf{z}_j$ e x_j , y_j e z_j são as coordenadas fracionárias do j ésimo átomo.

Alternativamente podemos rescrever a equação acima usando as equações de Laue e teremos então:

$$\mathbf{F}(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) \quad \text{A.10}$$

Esta é a equação para o *Fator de Estrutura* $\mathbf{F}(hkl)$, que também pode ser escrita em função do módulo e da fase de $\mathbf{F}(hkl)$ como:

$$\mathbf{F}(hkl) = F(hkl) \exp i\alpha(hkl) \quad \text{A.11}$$

Quando coletamos raios X difratados por um cristal, a atual tecnologia permite somente medirmos a intensidade $I(hkl)$ da radiação espalhada que é dada por:

$$I(hkl) = \mathbf{F}(hkl) \cdot \mathbf{F}^*(hkl) = F(hkl)^2 \quad \text{A.12}$$



e portanto toda informação a respeito da fase da radiação espalhada é perdida.

A DENSIDADE ELETRONICA

Quanto desejamos “resolver” uma estrutura utilizando raios X, nosso desejo é descobrir como encontra-se distribuída a densidade eletrônica nesta molécula. Para obtermos a densidade eletrônica temos a equação para o Fator de Estrutura

$$F(\mathbf{S}) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{da} \\ \text{cela} \\ \text{unitária}}} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{v} \quad \text{A.13}$$

que multiplicada por $\exp(-2\pi i \mathbf{r}' \cdot \mathbf{S})$ e integrando-se sobre todo o volume do espaço recíproco encontramos

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{\substack{\text{volume} \\ \text{do} \\ \text{espaço} \\ \text{recíproco}}} F(\mathbf{S}) \exp(-2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{v}_s \quad \text{A.14}$$

Vemos portanto que a densidade eletrônica é a transformada de Fourier do fator de estrutura.

Dos experimentos de difração obtemos um numero finito de valores de $F(hkl)$, portanto a integral acima deve ser repassada para uma somatória sobre todos os índices de Miller. Temos então

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) \exp i \alpha(hkl) \exp 2\pi i(hx + ky + lz) \quad \text{A.15}$$

Nesta equação fica explícita a necessidade de conhecermos o módulo e a fase dos fatores de estrutura, mas somente podemos obter diretamente da difração de raios X o módulo. A descoberta das fases é portanto o problema fundamental na determinação da estrutura de qualquer cristal.

FUNÇÃO DE PATTERSON

A função de Patterson pode ser calculada a partir de um conjunto de dados de difração e é definida como:

$$P(\mathbf{u}) = \int \rho(\mathbf{r}) \rho(\mathbf{r} + \mathbf{u}) dv \quad \text{A.16}$$

volum
da
cela
unitária

onde $\mathbf{u} = \mathbf{u}(u \ v \ w)$ é um vetor deslocamento. A função de Patterson é um mapa vetorial de distâncias interatômicas da estrutura. Fazendo uso da equação para a densidade eletrônica obtemos:

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V^2} \sum_h \sum_{h'} F_h F_{h'} \exp(-2\pi i \mathbf{h}' \cdot \mathbf{u}) \int \exp(-2\pi i (\mathbf{h} + \mathbf{h}') \cdot \mathbf{x}) dv \quad \text{A.17}$$

volum
da
cela
unitária

que pode ser simplificada para

$$P(\mathbf{u}) = \frac{2}{V} \sum_{hkl} F(hkl)^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad \text{A.18}$$

como $P(\mathbf{u})$ é a transformada de Fourier de $F(hkl)^2$ pode facilmente ser calculada dos dados de difração.

APÊNDICE B - SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR

(Drenth, 1994)

Como vimos no Apêndice A, é necessário o conhecimento completo dos feixes de raios X difratados por um cristal para se conhecer a distribuição de cargas elétricas da molécula que forma o cristal, ou seja, necessitamos conhecer a intensidade e a fase da radiação difratada. Como a única informação que pode ser medida é a intensidade da radiação, torna-se necessário obter-se maneiras de conhecer a fase da radiação, ou como se diz: resolver o "problema da fase".

Partindo da observação de que moléculas com seqüências primárias homólogas possuem enovelamentos similares, o conhecimento destas moléculas estruturalmente conhecidas, permite simular um modelo inicial do cristal a ser resolvido, e deste modelo obter as informações necessárias sobre a fase da radiação difratada pelo cristal real. Este método de resolução do problema da fase é o chamado Método da Substituição Molecular, e o crescente número de novas estruturas resolvidas, tem tornado este método extremamente poderoso.

O primeiro passo a ser resolvido deve ser a colocação do modelo na mesma posição que a molécula real ocupa na sua rede cristalina. Este procedimento implica em movimentos de rotação e translação do modelo, cujas coordenadas espaciais de seus átomos referem-se ao seu posicionamento no próprio cristal. Este procedimento deve ser realizado utilizando como "guia" a única informação conhecida: a intensidade da radiação difratada.



A FUNÇÃO ROTAÇÃO

O que se deve fazer para obter as relações angulares que rotacionam uma molécula, incorretamente posicionada na unidade assimétrica de um cristal, para que sua real orientação seja obtida dos dados de raios X?

Se um cristal possui um sistema de eixos ortogonais **a**, **b** e **c**, cada átomo de uma molécula pertencente a este cristal tem sua posição determinada por um conjunto de coordenadas fracionárias **x**, **y** e **z**. Pode-se então calcular os fatores de estrutura $F(\mathbf{S})$ deste cristal utilizando a equação (A.9), e a função de Patterson $P(\mathbf{u})$ utilizando a equação (A.18).

Ao se aplicar uma rotação à molécula, de tal modo que

$$(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})_r = [\mathbf{C}].(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})$$

onde $(\mathbf{x}, \mathbf{y}, \mathbf{z})_r$ são as novas coordenadas rotacionadas pela matriz de rotação **C**.

A função de Patterson de um cristal, como um mapa vetorial das distâncias interatômicas deste cristal, rotacionará da mesma forma, ou seja, aplicando-se a rotação **C** à função de Patterson $P(\mathbf{u})$ obtém-se a função de Patterson rotacionada $P_r(\mathbf{u})$.

Definindo uma função de *overlap* R , para ângulos α , β e γ relacionados à matriz de rotação **C** teremos:

$$R(\alpha, \beta, \gamma) = \int_{\mathbf{u}} P(\mathbf{u}) \times P_r(\mathbf{u})$$

terá seu valor maximizado quando houver uma correta superposição da molécula original e da molécula rotacionada.



A maximização da função $R(\alpha, \beta, \gamma)$ computada utilizando $P(\mathbf{u})$ calculado dos dados de raios X , e $P_r(\mathbf{u})$ calculado do modelo rotacionado, fornece a rotação necessária para orientar nosso modelo corretamente na unidade assimétrica do cristal.

A FUNÇÃO TRANSLAÇÃO

A melhor maneira de encontrar a translação necessária ao correto posicionamento do modelo dentro da unidade assimétrica é através do método da tentativa e erro. O modelo é transladado dentro da unidade assimétrica, os fatores de estrutura são calculados para esta nova posição (F_{calc}) e comparados com os fatores de estrutura observados (F_{obs}). A qualidade da translação é monitorada através do cálculo de fatores de controle. Os fatores usualmente utilizados são: o fator R (R_{factor}) e o coeficiente de correlação CC .

O fator R é dado pela expressão

$$R = \frac{\sum_{hkl} \|F_{obs} - kF_{calc}\|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \quad (B.1)$$

onde k é um fator de escala e o coeficiente de correlação CC é calculado por

$$CC = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2}) \times (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})}{\left[\sum_{hkl} (|F_{obs}|^2 - \overline{|F_{obs}|^2})^2 \sum_{hkl} (|F_{calc}|^2 - \overline{|F_{calc}|^2})^2 \right]^{1/2}} \quad (B.2)$$

Para concordâncias perfeitas, encontra-se valores de 0% para R_{factor} e 100% para CC. Valores de R_{factor} inferiores a ~40% e de CC superiores a ~50% indicam que a substituição molecular encontrou um modelo passível de refinamento.

De posse das rotações e translações necessárias para posicionarmos o modelo corretamente na cela unitária, estas transformações são aplicadas e os fatores de estrutura $F(hkl)$ são calculados. As fases obtidas para cada reflexão são assumidas como as fases correspondentes aos fatores de estrutura observados, e esta informação será utilizada como ponto de partida de um processo de refinamento, para obtenção da estrutura da molécula difratada.



APÊNDICE C – REFINAMENTO

(Drenth, 1994 e Brünger, 1992)

Refinamento é o processo de encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e a sua estrutura real.

Esta concordância deve refletir numa igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

As técnicas de refinamento em cristalografia de difração de raios X estão baseadas no princípio dos mínimos quadrados² que assume uma distribuição gaussiana para F_{obs} , e que implica na minimização da função

$$S_1 = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)|)^2 \quad (\text{C.1})$$

onde $w(hkl)$ é o peso dado para uma dada observação. O mínimo de S_1 é encontrado variando-se as coordenadas que determinam $|F_{\text{calc}}(hkl)|$, ou seja, impondo que a diferencial de $|F_{\text{calc}}(hkl)|$ com relação às coordenadas, seja nula.

O acompanhamento da qualidade deste processo se faz através do cálculo do fator R (equação B.2) durante o processo. Como R pode ser minimizado artificialmente e levando em consideração a redundância dos dados de raios X (Brünger, 1992), uma pequena porcentagem das reflexões (em geral entre 5 e 10%) são excluídos do refinamento e utilizados como um conjunto de teste no cálculo de um novo fator R chamado R_{free} , que será isento

² Com exceção dos recentes programas REFMAC (Murshodov *et al.* 1997) e CNS (Brünger *et al.* 1998) que utilizam refinamento *Maximum Likelihood* que obtém a distribuição dos valores de F_{obs} analisando o conjunto de dados obtidos. Se a distribuição for gaussiana, *Maximum Likelihood* e mínimos quadrados apresentam o mesmo resultado.

de minimização artificial. Desta forma haverão 2 parâmetros de controle, que são:

$$R = \frac{\sum_{(100-T)\%hkl} \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum_{(100-T)\%hkl} |F_{obs}|} \quad (C.2)$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{T\%hkl} \|F_{obs} - k|F_{calc}|\|}{\sum_{T\%hkl} |F_{obs}|} \quad (C.3)$$

onde T% é a porcentagem de reflexões escolhidas para formar o conjunto de teste.

Partindo de um modelo com R_{factor} por volta de 50%, um bom refinamento abaixa este valor para 20% ou menos, com R_{free} até 10% acima de R_{factor} .

A minimização que consiste da modificação das coordenadas posicionais x, y e z e dos fatores de temperatura B de cada átomo da molécula a ser refinada é um trabalho que apresenta uma grande quantidade de parâmetros a serem ajustados. Tomando como exemplo uma molécula de hemoglobina que, possuindo aproximadamente 4500 átomos (excetuando-se os hidrogênios que por possuírem somente um elétron, usualmente são desconsiderados nos processos de refinamento) exige o refinamento de 18.000 variáveis (x,y,z,B). Para isso, se tem como informação, aproximadamente 54.000 reflexões medidas. Três para um é uma relação parâmetros/variáveis muito pobre para solucionar este problema. Um bom procedimento de

refinamento necessita em média de um número de parâmetros conhecidos 10 vezes superior ao número de variáveis a serem refinadas (Giacovazzo *et al.* 1992). Se o número de reflexões independentes (parâmetros), que depende da resolução, não for suficientemente maior que o número de coordenadas a serem calculadas (variáveis), a relação parâmetros/variáveis pode ser melhorada através de informações estereoquímicas (distâncias, ângulos e outros parâmetros geométricos entre os átomos nos resíduos de aminoácidos e nas cadeias polipeptídicas dos aminoácidos). Simetrias não cristalográficas também podem ser utilizadas. Estas informações podem ser aproveitadas de duas maneiras diferentes: por procedimentos chamados de *Constraint* e *Restraint*.

Se estas informações fixam ligações e ângulos, e permitem que partes da molécula sejam consideradas como corpos rígidos, o número de variáveis é então reduzido, melhorando a relação parâmetros/variáveis pelo processo chamado *Constraint*.

Por outro lado, se as informações estereoquímicas são utilizadas permitindo variações de parâmetros em torno de valores padrão, o número de observações aumenta, melhorando assim a relação parâmetros/variáveis pelo processo chamado *Restraint*.

Tradicionalmente um processo completo de refinamento é executado por partes, como descrito a seguir:



REFINAMENTO DE CORPO RÍGIDO

É um refinamento do tipo *Constraint*, onde partes da estrutura ou ela toda, são refinados como parâmetros individuais. Este procedimento é realizado como passo inicial do refinamento, após a substituição molecular, possibilitando um melhor posicionamento da molécula na unidade assimétrica.

REFINAMENTO POSICIONAL

É um refinamento do tipo *Restraint*. A função a ser minimizada consiste do termo cristalográfico S somado a vários outros termos estereoquímicos, dentre os quais estão:

$$S_1 = \sum_{hkl} w(hkl) (|F_{obs}(hkl)| - |F_{calc}(hkl)|)^2 \quad (\text{minimização clássica})$$

$$S_2 = \sum_j w_j (d_{j(ideal)} - d_{j(calc)})^2 \quad (\text{minimização das distâncias atômicas})$$

$$S_3 = \sum_k \sum_i w_m (\vec{m}_k \vec{r}_{i,k} - d_k)^2 \quad (\text{minimização dos desvios planares})$$

$$S_4 = \sum_l w_l (V_{l(ideal)} - V_{l(calc)})^2 \quad (\text{minimização dos volumes chirais})$$

$$S_5 = \sum_n w_n (d_{n(ideal)} - d_{n(calc)})^4 \quad (\text{minim. dos contatos de van der Waals})$$

$$S_6 = \sum_t w_t (X_{t(ideal)} - X_{t(calc)})^2 \quad (\text{minimização dos ângulos de torção})$$

$$S_6 = \sum_k w_k (\vec{r}_k - \vec{r}_o)^2 \quad (\text{minimização dos desvios do modelo})$$

$$S_7 = \sum_i w_p (\varphi_{i(obs)} - \varphi_{i(calc)})^2 \quad (\text{minimização dos desvios na fase})$$

Alternativamente, alguns programas de refinamento minimizam uma somatória composta pelo termo de raios X S_1 e termos de energia potencial

relacionados aos parâmetros restringidos. No programa X-PLOR ao termo de raios X podem ser adicionados, dentre outros, os termos de energia $w_{\text{bond}}E_{\text{bond}}$, $w_{\text{angl}}E_{\text{angl}}$, $w_{\text{dihe}}E_{\text{dihe}}$, $w_{\text{impr}}E_{\text{impr}}$, $w_{\text{vdw}}E_{\text{vdw}}$, $w_{\text{elec}}E_{\text{elec}}$, $w_{\text{pvdw}}E_{\text{pvdw}}$, $w_{\text{pele}}E_{\text{pele}}$, onde w são os pesos de cada energia e os índices correspondem a:

bond: energia das ligações covalentes;

angl: energia dos ângulos de ligação;

dihe: energia dos ângulos de torção;

impr: energia dos ângulos de torção usados para imposição de planalidade e chiralidade;

vdw: energia de van der Waals intramolecular, calculada pelo potencial de Lennard-Jones;

elec: energia de repulsão ou atração eletrostática intramolecular.

pvdw: energia de van der Waals para interações oriundas de simetrias cristalográficas e não cristalográficas.

pele: energia eletrostática para interações oriundas de simetrias cristalográficas e não cristalográficas.

REFINAMENTO POR DINÂMICA MOLECULAR OU *SIMULATED ANNEALING*

Refinamentos utilizando mínimos quadrados oferecem bons resultados quando as posições atômicas do modelo inicial não diferem em muito da posição real dos átomos, ou seja, apresentam bons resultados quando o raio de convergência é pequeno. Quando é necessário um raio de convergência maior, geralmente o processo de minimização fica preso em mínimos locais, não conseguindo atingir o mínimo absoluto ou mínimo real. O método do



Simulated Annealing, aplicado à cristalografia, introduzido por Brünger *et al.* (1990) e implementado nos programas X-PLOR e CNS, simula a dinâmica molecular de um sistema, “levando-o” até altas temperaturas e “esfriando” o sistema gradualmente até a temperatura ambiente (*slow cooling*). Os termos minimizados são os mesmos do refinamento posicional. A dinâmica molecular inicia-se atribuindo aos átomos velocidades derivadas da distribuição de Maxwell para a atual temperatura. Na situação inicial, o sistema possui uma dada energia potencial E_{pot} , e em cada átomo i na posição r_i age uma força derivada da energia potencial igual a $-\partial E_{pot}/\partial r_i$, e pela mecânica de Newton tem-se

$$-\frac{\partial E_{pot}}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} = m_i \dot{a}_i$$

Esta aceleração a_i é aplicada a cada átomo por um tempo Δt da ordem de femto-segundo (10^{-15} s), e com a movimentação dos átomos, uma nova estrutura é conseguida e o processo é repetido na ordem de 10^3 a 10^4 vezes. A idéia principal do método de *Simulated Annealing* é que “aquecendo-se” a molécula, os átomos adquirirão altas velocidades e energias cinéticas suficientes para vencerem as barreiras de potencial e quando a temperatura chegar à temperatura ambiente, a estrutura tenha alcançado o seu mínimo energético. A grande vantagem deste método é o alto raio de convergência, chegando a vários ângstrons.

APÊNDICE D - TÉCNICAS FUNCIONAIS

REFINAMENTO DO FATOR B

Devido à dependência do fator de estrutura $F(hkl)$ com o movimento térmico, o fator térmico B pode ser refinado. Este refinamento pode ser realizado conjuntamente ao refinamento posicional, ou isoladamente. O fator térmico B pode ser refinado como um fator único para todos os átomos simplesmente considerando, no cálculo de F_{calc} , a dependência com o fator B dada pela equação (A.3).



APÊNDICE D - MEDIDAS FUNCIONAIS

CURVAS DE OXIGENAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO BOHR

As curvas de oxigenação foram obtidas pelo método tonométrico-espectrofotométrico (Riggs *et al.*, 1956). O grau de saturação da hemoglobina com o oxigênio é calculado para cada valor de pO₂, a partir das leituras de absorbância da oxi e desoxihemoglobina, nos seguintes comprimentos de onda: 576nm e 700nm (variação máxima espectral e linha de base, respectivamente). Estes comprimentos de onda contêm a variação espectral do grupo heme.

Na passagem da forma desoxi para a forma oxihemoglobina, pela adição titulada de oxigênio à amostra, a hemoglobina descreve uma curva sigmoideal. Com 50% de saturação, consegue-se o valor de P₅₀, ou seja, a pressão parcial de oxigênio necessária para saturar 50% do hemes.

Medindo os valores de P₅₀ em diferentes pHs, é possível graficar logP₅₀ x pH (figura 3.11). A declividade deste gráfico fornece o número diferencial de prótons entre as estruturas desoxi e oxi da hemoglobina, ou seja, o número de prótons liberados com a oxigenação, segundo a equação de conectividade de Wyman (Wyman, 1964):

$$-4 \left. \frac{\partial \log P_{50}}{\partial pH} \right|_{a_i} = (n_H^{oxi} - n_H^{desoxi}) = \Delta n_H \quad (D.1)$$

APÊNDICE E-TABELA COM AS ESTRUTURAS DE HB RESOLVIDAS E DEPOSITADAS NO PDB ATÉ FEV/00.

PDB code	Source	Description	*	a (Å)	b (Å)	c (Å)	α (deg)	β (deg)	γ (deg)	SPACE GROUP	Res. (Å)	R factor	date
1HBH	Antartic Fish	Deoxy	N	62.65	96.30	62.650	90.00	90.00	90.00	P 21	2.2		22.02.95
1PBX	Antartic fish	Corbomonoxo	N	91.38	88.54	55.34	90.00	97.16	90.00	C 2	2.5	0.178	04.11.91
1ASH	Ascaris suum	Domain One	E	63.46	63.46	69.92	90.00	90.00	120.00	P 31 2 1	2.15	0.179	06.01.95
1A4F	Bar-headed goose	Oxy	N	81.59	81.59	107.28	90.00	90.00	90.00	P 42 21 2	2.0	0.198	22.01.98
1C40	Bar-headed goose	Aquamet	N	81.50	81.50	107.20	90.00	90.00	90.00	P 42 21 2	2.30	0.197	03.08.99
1HDA	Bovine	Deoxy	N	63.82	95.51	105.32	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.2		06.05.93
1HBR	Chicken	Complexed with protoporphirin Ix Containing Fe	N	53.96	80.51	82.11	90.00	104.50	90.00	P 1 21 1	2.30	0.222	06.12.98
1ECA	Chironomous T. Thummi	Erythrocrutorin, Aquo Met	N	54.30	54.30	35.60	90.00	90.00	120.00	P 32	1.4		07.03.79
1ECD	Chironomous T. Thummi	Erythrocrutorin, Deoxy	N	54.30	54.30	35.60	90.00	90.00	120.00	P 32	1.4		07.03.79
1ECN	Chironomous T. Thummi	Erythrocrutorin, Cyano Met	N	54.30	54.30	35.60	90.00	90.00	120.00	P 32	1.4		07.03.79
1ECO	Chironomous T. Thummi	Erythrocrutorin, Carbonmonoxy	N	54.30	54.30	35.60	90.00	90.00	120.00	P 32	1.4		07.03.79
1EBT	Clam	Hemoglobin I	N	50.67	38.76	42.53	90.00	106.93	90.00	P 1 21 1	1.90	0.018	04.11.98
1FLP	Clam	Hemoglobin I (Monomeric) (Ferric)	N	37.97	38.39	42.65	90.00	97.40	90.00	P 21	1.5	0.170	16.05.94
1MOH	Clam	Ferric Monomeric Hemoglobin I (Hb I) (Sulfide Adduct)	N	50.55	38.79	42.51	90.00	106.93	90.00	P 1 21 1	1.9		27.02.96
3HBI	Clam, Ark	Mutation Of Residue Phe 97 To Leu Disrupts The Central Allosteric Pathway	E	93.25	43.98	83.50	90.00	122.03	90.00	C 1 2 1	1.5	0.186	13.03.97

3SDH	Clam, Ark	Hemoglobin I (Homodimer) carbonmonoxy	N	93.25	43.98	83.50	90.00	122.03	90.00	C 2	1.4	0.159	23.06.93
4HBI	Clam, Ark	Dimeric Hemoglobin, Mutant T72i, Deoxy Form	E	91.76	44.32	143.79	90.00	90.00	90.00	C 2 2 2 1	1.6	0.192	24.06.98
4SDH	Clam, Ark	Hemoglobin I (Homodimer) deoxy	N	91.88	44.37	143.83	90.00	90.00	90.00	C 2 2 2 1	1.6	0.158	23.06.93
5HBI	Clam, Ark	Dimeric Hemoglobin, Mutant T72i, Co-Liganded Form	E	93.27	43.75	83.35	90.00	121.93	90.00	C 1 2 1	1.6	0.194	24.06.98
6HBI	Clam, Ark	Dimeric Hemoglobin, Mutant T72v, Deoxy Form	E	91.90	44.41	144.10	90.00	90.00	90.00	C 2 2 2 1	1.8	0.188	25.06.98
7HBI	Clam, Ark	Mutant T72v, Co-Liganded Form	E	93.34	43.84	83.48	90.00	121.96	90.00	C 1 2 1	1.6	0.194	25.06.98
1HBI	Clam, Blood	Homodimer oxy	N	93.20	44.00	83.50	90.00	122.00	90.00	C 2	1.7	0.157	22.06.94
1SCT	Clam, Blood	Carbomonoxy	N	101.44	93.79	127.08	90.00	90.00	90.00	P 2 1 2 1 2 1	2.0		12..05.95
2HBI	Clam, Blood	Mutation Of Residue Phe 97 Leu Disrupts The Central Allosteric Pathway	E	91.99	44.27	143.83	90.00	90.00	90.00	C 2 2 2 1	1.7	0.183	13.03.97
1GLI	Escherichia coli	Deoxyhemoglobin T38w (Alpha Chains), VIg (Alpha And Beta Chains)	E	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 1 2 1 1	2.5		22.-2.96
1IBE	Horse	Deoxy-Haemoglobin Trapped In The High-Affinity ® State	N	108.18	63.18	54.58	90.00	111.10	90.00	C 1 2 1	1.8	0.1786	25.09.96
2DHB	Horse	Deoxy	N	76.96	81.70	92.63	90.00	90.00	90.00	C 2 2 2 1	2.8		01.11.73
2MHB	Horse	Aquo Met	N	108.24	63.13	54.54	90.00	110.85	90.00	C 2	2.0		14.02.77
0DCH	Human	Cobalt, Deoxy	N	63.20	83.10	53.80	90.00	99.10	90.00	P 2 1	2.5		
0HBT	Human	(T State) In 20 Per Cent Polyethylene Glycol (Peg)	N	96.66	97.88	65.40	90.00	90.00	90.00	P 2 1 2 1 2	2.1		27.03.86
1A00	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Tyr) Mutant	EM	84.10	112.00	63.80	90.00	90.00	90.00	P 2 1 2 1 2 1	2.0	0.169	08.12.97
1A01	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Ala) Mutant	EM	63.40	83.60	53.80	90.00	99.30	90.00	P 1 2 1 1	1.8	0.169	08.12.97
1A0U	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met) Mutant	EM	97.20	99.30	65.90	90.00	90.00	90.00	P 2 1 2 1 2	2.14	0.172	08.12.97

1A0V	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Tyr) Mutant	EM	97.20	99.40	66.10	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.2	0.166	08.12.97
1A0W	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Ala) Mutant	EM	96.80	99.20	66.20	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.0	0.175	08.12.97
1A0X	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Gly) Mutant	EM	96.40	99.30	66.30	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.0	0.191	08.12.97
1A0Y	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met, Trp Beta37 Glu) Mutant	EM	96.70	99.10	66.30	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.0	0.181	08.12.97
1A0Z	Human	Deoxyhemoglobin A (Val Beta1 Met) Mutant	EM	83.90	112.00	63.70	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.0	0.167	08.12.97
1A3N	Human	Deoxy	N	62.65	82.43	53.53	90.00	99.61	90.00	P 1 21 1	1.8	0.17076	22.01.98
1A3O	Human	Artificial Mutant (Alpha Y42h) Of Deoxy Hemoglobin	EM	62.44	81.16	53.32	90.00	99.65	90.00	P 1 21 1	1.8	0.17994	22.01.98
1A9W	Human	Human Embryonic Gower II Carbonmonoxy Hemoglobin	E	62.80	62.80	320.90	90.00	90.00	90.00	P 43 21 2	2.9	0.185	11.04.98
1ABY	Human	Cyanomet Rhb1.1 (Recombinant Hemoglobin)	E	102.54	115.17	56.70	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.6	0.175	29.01.97
1AJ9	Human	R-State Human Carbonmonoxy hemoglobin Alpha-A53s	NM	54.10	54.10	195.10	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.2	0.155	16.05.97
1AXF	Human	Deshis Deoxyhemoglobin A (His 146 Beta Removed)	EM	97.10	99.10	66.00	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.170	15.10.97
1B86	Human	2,3-Diphosphoglycerate complex	N	96.30	98.08	65.76	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.50	0.169	08.02.99
1BAB	Human	Thionville α Chain Mutant With Val 1 Rep.by Glu and An Met Bound To The Amino Terminus	NM	63.20	83.60	53.80	90.00	90.00	90.00	P 21	1.5	0.157	06.05.92
1BBB	Human	Hemoglobin A (R2 State, Carbonmonoxy)	N	97.50	101.50	61.10	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	1.7	0.184	29.04.92
1BIJ	Human	Lys B82/D82 crosslinked hemoglobin	N	65.30	96.00	101.50	90.00	101.50	90.00	P 1 21 1	2.30	0.190	18.06.98
1BUW	Human	S-Nitroso-Nitrosyl HbA.	N	97.10	101.20	61.10	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	1.9	0.184	06.07.98
1BZ1	Human	(Alpha + Met) Mutant (Chain A, C, Additional Nh2-Terminal Met)	EM	63.30	83.60	53.80	90.00	99.40	90.00	P 1 21 1	1.59	0.170	05.11.98
1BZ0	Human	Hemoglobin A (Human, Deoxy, High Salt)	N	63.30	83.60	53.80	90.00	99.40	90.00	P 1 21 1	1.50	0.167	05.11.98

1BZZ	Human	(Val Alpha Met) Mutant	EM	63.30	83.60	53.80	90.00	99.40	90.00	P 1 21 1	1.59	0.163	04.11.98
1CBL	Human	Deoxy-Beta=4= Hemoglobin ("R-Like" Quaternary Structure)	N	63.00	81.80	54.40	90.00	89.7	90.00	P 21	1.9	0.190	18.02.93
1CBM	Human	Carbonmonoxy-Beta=4= Hemoglobin ("R-Like" Quaternary Structure)	N	63.30	82.40	53.70	90.00	90.10	90.00	P 21	1.8	0.177	18.02.93
1CLS	Human	Cross-Linked Human Hemoglobin Deoxy	N	62.80	82.47	144.60	90.00	99.24	90.00	P 1 21 1	1.9	0.168	29.08.95
1CMY	Human	Ypsilanti (Carbon Monoxy Form)	N	93.10	93.10	144.60	90.00	90.00	120.00	P 32 2 1	3.0	0.269	18.09.92
1COH	Human	Alpha-Ferrous-Carbonmonoxy, Beta-Cobaltous-Deoxy Hemoglobin (T State)	N	63.09	83.06	53.67	90.00	99.63	90.00	P 21	2.9		13.01.89
1DSH	Human	Hemoglobin A (Deoxy) Mutant With Arg A 141 And Arg C 141 Deleted	EM	96.90	98.80	65.90	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.179	23.01.95
1DXT	Human	Hemoglobin (Deoxy) Mutant With Additional Met At The N-Terminus Of The Beta Chains	EM	63.20	83.60	53.80	90.00	99.30	90.00	P 21	1.8	0.160	06.05.92
1DXU	Human	Hemoglobin (Deoxy) Mutant With Val 1 Replac. By Met In The Beta Chains (Beta V1m)	EM	63.20	83.60	53.80	90.00	99.30	90.00	P 21	1.8	0.160	06.05.92
1DXV	Human	Hemoglobin (Deoxy) Mutant With Val 1 Replaced By Ala In The Beta Chains (Beta V1a)	EM	63.20	83.60	53.80	90.00	99.30	90.00	P 21	1.8	0.156	06.05.92
1FDH	Human	Deoxy, Human Fetal F=II=	N	62.80	95.10	102.10	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.5		18.08.76
1GBU	Human	Deoxy (Beta-(C93a,C112g))	E	63.02	82.94	53.83	90.00	99.16	90.00	P 21	1.8	0.167	04.01.96
1GBV	Human	Alpha-Oxy, Beta-(C112g)Deoxy) T-State	E	63.18	83.56	53.73	90.00	99.60	90.00	P 1 21 1	2.0	0.184	20.12.95
1HAB	Human	Crosslinked Haemoglobin A, Carbonmonoxy Form	N	86.84	87.11	97.63	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.3	0.191	13.03.96
1HAC	Human	Cross-Linked Hemoglobin A, Carbonmonoxy Form	N	86.84	87.11	97.63	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.6	0.154	13.03.96
1HBA	Human	Rothschild (Deoxy)		97.00	99.30	66.00	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.176	07.01.92
1HBB	Human	Hemoglobin A (Deoxy, Low Salt, 100mm Cl)	N	97.00	99.30	66.00	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	1.9	0.185	07.01.92
1HBS	Human	Hemoglobin S (Deoxy)	N	63.33	185.66	52.97	90.00	92.69	90.00	P 21	3.0		02.06.82

1HCO	Human	Carbomonoxy	N	53.70	53.70	193.00	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.7		07.08.79
1HDB	Human	(Deoxy) Beta-V67t	E	63.54	83.19	54.02	90.00	99.15	90.00	P 21	2.2	0.149	14.04.95
1HGA	Human	Tstate deoxy	N	95.78	97.78	65.49	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.20	31.10.91
1HGB	Human	T state aquomet	N	95.78	97.78	65.49	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.21	31.10.91
1HGC	Human	T state α -oxy	N	95.78	97.78	65.49	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	2.1	0.20	31.10.91
1HHO	Human	A oxy	N	53.70	53.70	193.80	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.1	0.223	10.06.83
1NIH	Human	Alpha-Nickelous, Beta-Ferrous Carbonmonoxy Hemoglobin (T-State)	N	63.18	82.26	55.06	90.00	98.42	90.00	P 21	2.6	0.214	14.03.90
1QI8	Human	Chain A, B, C, D.	E	63.36	94.32	54.00	90.00	99.43	90.00	P 1 21 1	1.80	0.169	07.06.99
1QSH	Human	Chain A, B, C, D,	E	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 21	1.70	0.175	11.06.99
1QSI	Human	Chain A, B, C, D.	E	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 21	1.70	0.186	22.06.99
1RVW	Human	R State Human Hemoglobin [Alpha V96w], Carbonmonoxy	E	54.282	54.282	194.122	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.5	0.167	20.03.97
1SDK	Human	Cross-Linked, Carbonmonoxy Hemoglobin A	N	104.43	72.16	88.03	90.00	108.25	90.00	C 1 2 1	1.8	0.139	26.02.96
1SDL	Human	Cross-Linked, Carbonmonoxy Hemoglobin A	N	104.43	72.16	88.03	90.00	108.25	90.00	C 1 2 1	1.8	0.150	26.02.96
1THB	Human	T state partially oxy	N	95.80	97.80	65.50	90.00	90.00	90.00	P 21 21 2	1.5		23.01.90
1VWT	Human	T State [Alpha V96w], Alpha Aquomet, Beta Deoxy	E	63.271	83.416	53.799	90.00	99.54	90.00	P 1 21 1	1.9	0.169	20.03.97
2HBC	Human	Hemoglobin A (Ethyl Isocyanide, Ph 6.7)	N	54.05	54.05	193.80	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.1	0.177	31.08.94
2HBD	Human	Hemoglobin A (Methyl Isocyanide, Ph 6.7)	N	54.05	54.05	193.80	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.2	0.176	31.08.94
2HBE	Human	Hemoglobin A (N-Butyl Isocyanide, Ph 6.7)	N	54.05	54.05	193.80	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.0	0.184	31.08.94

2HBF	Human	Hemoglobin A (N-Propyl Isocyanide, Ph 6.7)	N	54.05	54.05	193.80	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.2	0.179	31.08.94
2HBS	Human	Deoxyhemoglobin S (Chain B, D, F, H, E6v Variant)	NM	63.344	185.681	52.933	90.00	92.74	90.00	P 1 21 1	2.05	0.165	06.05.97
2HCO	Human	Carbonmonoxy	N	53.70	53.70	193.00	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.7		07.08.79
2HHB	Human	Deoxy	N	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 21	1.74	0.16	07.03.84
2HHD	Human	Hemoglobin A	N	62.45	82.13	53.76	90.00	98.87	90.00	P 21	2.2	0.137	29.07.94
2HHE	Human	Deoxy. with Val B1 repl. by Met, His B2 del., Val D1 repl. by Met, and His D2 del.	EM	62.71	82.38	53.58	90.00	99.21	90.00	P 21	2.2	0.175	29.07.94
3HHB	Human	Deoxy	N	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 21	1.74		07.03.84
4HHB	Human	Deoxy	N	63.15	83.59	53.80	90.00	99.34	90.00	P 21	1.74	0.135	07.03.84
6HBW	Human	Deoxy-Human Hemoglobin Beta6 Glu->Trp	E	62.95	81.28	111.35	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.00	0.198	10.09.98
1TIN	Icefish	Hem Group complexed with carbon monoxide	N	91.17	88.06	55.25	90.00	97.65	90.00	C 1 2 1	2.20	0.192	05.03.99
1ITH	Innkepeer worm	Cyanomet	N	104.80	54.90	110.60	90.00	90.00	90.00	C 2 2 21	2.5	0.147	03.12.91
1HBG	Marine Bloodworm	Carbonmonoxy	N	42.75	83.15	38.66	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	1.5		11.02.91
2HBG	Marine Bloodworm	Deoxy	N	42.75	83.15	38.66	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	1.5		11.02.91
0HBG	Marine booldworm		N	61.40	32.80	41.00	90.00	109.16	90.00	P 21	2.5		
1QPW	Pig	Chain A, B, C, D.	N	68.10	72.27	114.85	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	1.80	0.211	30.05.99
2PGH	Pig	Aquomet	N	69.60	72.80	115.80	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.8	0.154	16.09.74
1HLB	Sea cucumber		N	45.74	45.23	40.92	90.00	104.40	90.00	P 21	2.5	0.15	22.03.94
1HLM	Sea cucumber	Cyano-met	N	77.00	77.00	61.50	90.00	90.00	90.00	P 41 21 2	2.9	0.19	26.08.94

2LHB	Sea Lamprey	Hemoglobin V (Cyano, Met)	N	44.57	96.62	31.34	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.0		16.08.85
3LHB	Sea Lamprey	Chain A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L.	N	59.63	215.16	75.39	90.00	95.80	90.00	P 1 21 1	2.70	0.195	12.01.99
1SPG	Spot (teleost fish)	R-State, Carbonmonoxy Bound Root Effect	N	89.60	75.60	69.70	90.00	141.09 0	90.00	C 1 2 1	1.95	0.191	05.02.96
1CG5	Stingray, Red	Deoxy	N	77.76	77.76	99.32	90.00	90.00	120.00	P 31 1 2	1.60	0.191	26.03.99
1CG8	Stingray, Red	CO	N	57.66	100.07	107.61	90.00	90.00	90.00	C 2 2 21	1.90	0.197	26.03.99
1OUT	Trout	Deoxy, Chain A, Del(D32,K33)	E	63.28	63.28	312.74	90.00	90.00	120.00	P 65 2 2	2.3	0.162	21.06.96
1OUU	Trout	Carbonmonoxy, Chain A, C, Del(D32,K33)	E	65.20	79.80	122.90	90.00	90.00	90.00	P 21 21 21	2.5	0.162	21.06.96
1HDS	Virgin. white Tailed Deer	Sickle Cell	N	163.50	70.83	65.95	90.00	94.15	90.00	C 2	1.98		01.10.79
1VHB	Vitreoscilla Stercoraria	Bacterial Dimeric Hemoglobin	E	63.32	41.42	62.94	90.00	106.17	90.00	P 1 21 1	1.83	0.184	19.02.97
2VHB	Vitreoscilla Stercoraria	Azide Adduct Of The Bacterial Hemoglobin	E	62.72	40.19	62.94	90.00	106.55	90.00	P 1 21 1	1.76	0.197	19.02.97
3VHB	Vitreoscilla Stercoraria	Homodimer, Chain A e B	E	61.64	41.73	61.56	90.00	105.71	90.00	P 1 21 1	2.10	0.238	17.-3.99
4VHB	Vitreoscilla Stercoraria	Homodimer, Thiocyanate is liganded to each monomer	E	62.62	40.38	62.78	90.00	105.93	90.00	P 1 21 1	1.80	0.199	11.03.99

* N = natural; M = mutant; E = engineered



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antonini, E., Brunori, M., Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Editora North-Holland Publishing Company, 1971.

Baldwin, J. and Chothia, C., Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, **129**, 175-220, 1979.

Blundell, T.L., Protein crystallograohy. Editora Academic Press. 1976.

Borgstahl, G.E.O., Rogers, P.H., Arnone, A., The 1.8 Å structure of carbonmonoxy- β_4 hemoglobin. *J.Mol.Biol.* **236**, 817-830, 1994.

Brimhall, B., Duerst, M., Jones, R.T., The amino acid sequence of dog (*Canis familiaris*) Hemoglobin. *J.Mol.Biol.* **9**, 231-235, 1977.

Brünger, A.T., X-PLOR Version 3.1 manual. Yale Univ. USA, 1992.

Brünger, A.T. e Krukowski, A., Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulatred annealing. *Acta Crystallographyca A*, **46**, 585-593, 1990.

Brünger, A.T., Adams, P.D. et al., Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographyca D* **54**, 905-921, 1998.



Bunn, H.F., Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science*, **172**, 1049-1051, 1971.

Castro, O.A., A influência do ion cloreto no efeito Bohr da hemoglobina humana A₀. Dissertação de Mestrado – Ibilce – Unesp, 1999.

Chothia, C. and Lesk, A.M., The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal*, **5**, 823-826, 1986.

Drenth, J. Principles of protein X-ray crystallography. Editora Springer-Verlag. 1994.

Giacovazzo, C., Monaco, H.L., Viterbo, D. *et al.*, *lucr texts on crystallography - fundamentals of crystallography*. Oxford Science Publications. 1992.

Imai, K., Allosteric effects in haemoglobin. Editora Cambridge University Press, 1982.

Jancarik, J. and Kim, S. H., Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. App. Cryst.* **24**, 409-411, 1991.

Katz, D.S., White, S.P., Huang, W., Kumar, R. e Christianson, D.W., Structure determination of aquamet porcine hemoglobin at 2.8Å resolution. *J.Mol.Biol.* **244**, 541-553, 1994.



Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Cryst.* **26** 283, 1993.

Lesk, A.M., Protein Architecture – A practical approach. IRL Press. 1991.

McRee, D.E. (1992). A visual protein crystallographic software system for X11/XView. *J. Molecular Graphics*, **10**, 44-46, 1999.

Monod, J., Wyman, J.P., Changeaux, J., On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J.Mol.Biol.*, **12**, 88-118, 1965.

Murray R.K., Granner, D.K., Mayers, P.A., and Rodwell, V.W., Biochemistry. Editora APPLETON & LANGE – USA. 1993.

Murshodov, G., Vagin, A., Dodson, E., Application of maximum-likelihood refinement, in the refinement of protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend, 1996.

Murshodov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica D*, **53**, 240-255, 1997.

Navaza, J., AMoRe: an automated package for molecular replacement *Acta Crystallographica A*, **50**, 157-163, 1994.



Nicholls, A., GRASP: graphical representation and analysis of surface properties.

Editora Columbia University – USA. 1993.

Otwinowski, Z., In *Proceedings of the CCP4 Study Weekend*, editado por L.

Sawyer, N. Isaacs & S. Bailey, pp. 56-62. Warrington: Daresbury Laboratory, 1993.

Perutz, M.F. and Imai, K., Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobin. *J. Mol. Biol.*, **136**, 183-191, 1980.

Perutz, M.F., Fermi, G., Poyart, C., Pagnier, J. e Kister, J., A novel alosteric mechanism in haemoglobin: specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human haemoglobin. *J.Mol.Biol.* **233**, 536-545, 1993.

Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., Dodson, G.G., The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Ann. Rev. Biophys.Biomol.Struct.* **27**, 1-34, 1998.

Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E.E., Garratt, R., Arruda, P., Leite, A., Craievich, A., *Nucl. Instrum. Methods A*, **405**, 159-164, 1998.



Polikarpov, I., Perles, L. A., de Oliveira, R. T., Oliva, G., Castellano, E.E., Garratt, R. & Craievich, A., Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the brazilian national synchrotron laboratory *J. Synchrotron Rad.* **5**, 72-76, 1998.

Read, R.J.: *Acta Cryst. A*, **42**, 140-149, 1986.

Riggs, A., Wolbach, R.A., Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobyn. *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 478-492, 1958.

Runkel, D., Dresler, S.L., Brimhall, B., Jones, R.T., The tryptic of coyote (*Canis latrans*) Hemoglobin. *Biochemical Genetics*, **12**, 467-473, 1974.

Shaanan, B., Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 angstroms resolution. *J.Mol.Biol.* **171**, 31, 1983

Silva M.M., Rogers P.H., Arnone A., A Third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-angstroms resolution. *J.Biol.Chem.* **267**, 17248-17256, 1992.

Smarra, A.L.S., Fadel, V., Dellamano, M., Olivieri, J.R., de Azevedo Jr., W.F. e Bonilla-Rodriguez, G.O., Crystallization, preliminary X-ray diffraction analysis and Patterson search of oxyhaemoglobin I from the wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Acta Crystallographica D*, **55**, 1618-1619, 1999.

Tsuda, K., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Tanabe, Y., Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the d-loop region of mitochondrial dna between dogs and wolves. *Genes. Genet. Syst.* **72**, 229-238, 1997.

Wayne, R.K., Nash, W.G., O'Brien, S.J., Chromosomal evolution of the canidae species with high diploid numbers. *Cytogenet Cell Genet.* **44**(2-3), 123-33, 1987.

Wyman, J., Linkd functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. *Adv. Protein Chem.*, **19**, 223-286, 1964



