

Marcio Francisco Colombo

O Papel da Água na Regulação de
Macromoléculas Biológicas: do Controle
Alostérico à Especificidade no Reconhecimento
Molecular



TESE DE LIVRE DOCÊNCIA

**O PAPEL DA ÁGUA NA REGULAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS
BIOLÓGICAS: DO CONTROLE ALOSTÉRICO À ESPECIFICIDADE NO
RECONHECIMENTO MOLECULAR.**

Professor Doutor Marcio Francisco Colombo



788/98

Departamento de Física

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO MESQUITA FILHO"

Campus de São José do Rio Preto - SP

-1996-

Marcio Colombo



aqui gostaria de registrar meu profundo agradecimento à amiga e orientadora de
tese de doutoramento, Profa. Dra. Rosemary Sanchez do Instituto de Física de São Carlos
USP, com quem iniciei minhas investigações do papel da solvatação em macromoléculas
biológicas e, através de quem vim a conhecer dois grandes colaboradores, os Profs Drs. V.
Adrian Parsegian e Donald C. Rau dos National Institutes of Health, Bethesda, MD. Com o
Don e o Adrian compartilho a repercussão do trabalho realizado em meu estágio de pós
graduação, e registro a amizade, os ensinamentos e a liberdade de trabalho e de
pensamento que estes sempre me proporcionaram. Os amigos do Departamento são capítulo
à parte. Minha concepção de que o caminho que possibilitaria contribuirmos para com o
conhecimento em Biofísica Molecular seria, e é, aquele em que o foco é o problema
biológico e as técnicas são os meios e, não aquele no qual se exalta a técnica em
detrimento do problema, permitiu superar várias adversidades. Esta opinião foi elaborada
e compartilhada durante anos de discussão entre eu e o amigo Prof.Dr. João Ruggiero
Neto. Graças à isso, creio, pude chegar aqui sem o constrangimento de ter que admitir o
"não faço porque não disponho". Num época em que dispúnhamos de quase nada, além
de um sonho e um problema, encontrei no João um incentivador e colaborador na busca de
condições de trabalho. E como esta busca foi um processo demorado só a fé no problema
não teria nos tirado do lugar. Entretanto, estavam lá, também, o (Prof.Dr.) José
(Ruggiero Neto), o (Prof.Dr.) Marcelo (Andrés Fussey), o (Prof.Dr.) Johnny (Olivieri
Rizzieri), o (Prof.Dr. Jorge) Chahune, e tantos outros que vieram depois me incentivando e
apoiando moral e concretamente para que eu pudesse desenvolver o trabalho até este
ponto. A todos os colegas do Departamento, indistintamente, meu muito obrigado. Como
Ciência, entretanto, não se faz de improvisos agradeço à FAPESP, ao CNPq e à APES pelo
apoio financeiro, à Jiva me, graças à Santa Catarina, ao Barbosa e Paulinha nossos técnicos.
Em especial agradeço ao (Prof.Dr.) Nilton Rodrigues, cujo trabalho para
tornar rotineiras técnicas bioquímicas em nosso laboratório e cujo auxílio na orientação de
vários de nossos alunos de IC e pós graduação é impagável. Aos meus orientandos devo
agradecer pela paciência, confiança e ensinamentos. Para agradecer à Bernadete, minha
querida esposa, não tenho palavras...

dedico este trabalho à nossas filhas
Maíra, Mariana e Natália



aqui gostaria de registrar meu profundo agradecimento à amiga e orientadora de tese de doutoramento, Profa. Dra. Rosemary Sanches do Instituto de Física de São Carlos - USP, com quem iniciei minhas investigações do papel da solvatação em macromoléculas biológicas e, através de quem vim a conhecer dois grandes colaboradores, os Profs.Drs. V. Adrian Parsegian e Donald C. Rau dos National Institutes of Health, Bethesda, MD. Com o Don e o Adrian compartilho a repercussão do trabalho realizado em meu estágio de pós doutoramento, e registro a amizade, os ensinamentos e a liberdade de trabalho e de pensamento que estes sempre me propiciaram. Os amigos do Departamento são capítulo aparte. Minha concepção de que o caminho que possibilitaria contribuirmos para com o conhecimento em Biofísica Molecular seria, e é, aquele em que o foco é o problema biológico e as técnicas são os meios e, não aquele no qual se exalta a técnica em detrimento do problema, permitiu superar várias adversidades. Esta opinião foi elaborada e compartilhada durante anos de discussão entre eu e o amigo Prof.Dr. João Ruggiero Neto. Graças à isto, creio, pude chegar aqui sem o constrangimento de ter que admitir o "não faço porque não disponho". Numa época em que dispunhamos de quase nada, além de um sonho e um problema, encontrei no João um incentivador e colaborador na busca de condições de trabalho. E como esta busca foi um processo demorado só a fé no problema não teria nos tirado do lugar. Entretanto, estavam lá, também, o (Prof.Dr.) José (Ruggiero Neto), o (Prof.Dr.) Marcelo (Andrés Fossey), o (Prof.Dr.) Johnny (Olivieri Rizzieri), o (Prof.Dr. Jorge) Chahine, e tantos outros que vieram depois me incentivando e apoiando moral e concretamente para que eu pudesse desenvolver o trabalho até este ponto. A todos os colegas do Departamento, indistintamente, meu muito obrigado. Como Ciência, entretanto, não se faz de improvisos agradeço à FAPESP, ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, à Ilva nossa querida secretária, ao Barbosa e Paulinho nossos técnicos. Em especial agradeço ao (Dr.) Gustavo (Orlando Bonilla Rodrigues), cujo trabalho para tornar rotineiras técnicas bioquímicas em nosso laboratório e cujo auxílio na orientação de vários de nossos alunos de IC e pós graduação é impagável. Aos meu orientandos devo agradecer pela paciência, confiança e ensinamentos. Para agradecer à Bernadete, minha querida esposa, não tenho palavras...



INDÍCE

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	5
CAPÍTULO II	11
Marcio Francisco Colombo e Rosemary Sanches	
“Hydration-dependent conformational states of hemoglobin Equilibrium and kinetic behavior”	
<i>Biophysical Journal</i> 36 , 33-39 (1990)	11 (i - vii)
CAPÍTULO III - Parte A	12
Marcio Francisco Colombo, Donald C. Rau e V. Adrian Parsegian	
“Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin”	
<i>Science</i> 256 , pp. 655-659 (1992)	12(i - v)
CAPÍTULO III - Parte B	13
Marcio Francisco Colombo, Donald C. Rau e V. Adrian Parsegian	
“Reevaluation of chloride’s regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostherism”	
<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 91 , pp. 10517-10520 (1994)	13 (i -iv)
CAPÍTULO III - Parte C	14
Marcio Francisco Colombo, Gustavo O. Bonilla-Rodrigues	
“The water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water Glycine Solutions”	
<i>The Journal of Biological Chemistry</i> 271 , pp. 4895-4899 (1996)	14 (i-v)
CAPÍTULO IV - Água como Ligante:	
Descrição termodinâmica da hidratação macromolecular em solução e de sua contribuição para o equilíbrio de reações bioquímicas	15
Teoria de ligação de multiplos ligantes à uma macromolécula.	15
Interação de um ligante X à n_X sítios de uma macromolécula M.	17
Interação de ligantes X e Y à n_X e n_Y sítios de uma macromolécula M.	21
A contribuição da hidratação ao potencial químico de uma macromolécula	



em solução via o polinômio de ligação de moléculas de água.	25
Modelo para a hidratação energeticamente relevante ao potencial químico de uma macromolécula em solução.	28
Sobre o efeito da atividade de água sobre alguns equilíbrios simples	31
Sobre a linearidade observada entre o logaritmo da constante de equilíbrio e o logaritmo da atividade da água.	34
Sobre o efeito da adição de solutos neutros à solução e seu papel na medida do efeito de água sobre o equilíbrio químico de reações.	36
Sobre o controle experimental da atividade de água via utilização de osmólitos.	39
Análise do efeito de ligação de água e ligantes sobre o potencial químico de uma macromolécula via equilíbrio de fases: a fase macromolecular e a do volume da solução.	40
CAPÍTULO V - Discussão	43
Análise do papel da hidratação no equilíbrio conformacional Hb em filmes: o papel da ligação de água à sítio específico e a contribuição da água de hidratação para a energia livre conformacional.	43
Análise do papel da hidratação em alosterismo: o efeito da atividade de água sobre as características energética da oxigenação da Hemoglobina em solução.	45
Análise do papel da hidratação em reações bioquímicas diversas.	47
CAPÍTULO VI - Conclusões e Perspectivas	52
REFERÊNCIAS	54



RESUMO.

A água é um elemento indissociável da estrutura de macromoléculas biológicas e desempenha papel fundamental tanto nos mecanismos de funcionamento quanto na organização supramolecular destas macromoléculas. Esta indissociabilidade é tão marcante que acredita-se ser a água o elemento responsável pela vida biológica como a conhecemos. Nesta característica reside, entretanto, a dificuldade experimental encontrada para dissecar quantitativamente sua contribuição termodinâmica para o estabelecimento de propriedades que são únicas à polímeros biológicos, como: especificidade estrutural, especificidade reativa, autoregulação e reversibilidade, entre outras. Em decorrência disso, questões como com que parcela energética a água contribui para o equilíbrio de distribuição entre diferentes estados conformacionais de um biopolímero, ou, o quanto mudanças de hidratação associadas à reações bioquímicas contribui para a energia livre destas reações, não têm resposta ou são alvo fácil de especulação. Portanto, a busca de metodologias termodinâmicas quantitativas, que permitam investigar o papel da água em diferentes aspectos envolvendo macromoléculas biológicas é um problema intrinsecamente relevante.

Neste trabalho, sistematizamos parte dos estudos por nós realizados nos últimos anos sobre a contribuição hidratação protéica para as características do equilíbrio conformacional de Hemoglobinas, e, suas consequências sobre a função e regulação desta proteína [1-6]. Nestes estudos, consideramos explicitamente as diferenças de hidratação entre os diferentes conformeros e/ou complexos macromoleculares envolvidos na reação. Através de medidas do efeito da variação da atividade de água, promovida pela adição de solutos neutros à solução, sobre o equilíbrio destas reações e, de sua análise com o uso da teoria de ligação de ligante à macromoléculas e de um formalismo derivado da equação de Gibbs-Duhén, determinamos o número aparente de moléculas de água envolvidas nestas reações. Como esta análise termodinâmica não se restringe ao estudo do papel da água no controle da oxigenação de Hbs., mas, permite, em princípio, determinar a contribuição da hidratação nas mais diversas reações bioquímicas, destinamos um capítulo para descrever sua formalização.

Apesar de a metodologia aqui descrita para a análise quantitativa da contribuição da água em reações biológicas ter sido proposta recentemente [2,7], vários



outros autores tem dela se utilizado para a análise da contribuição da hidratação em diferentes sistemas [8-18]. No capítulo V estes resultados são avaliados com o objetivo de reconhecer as possíveis limitações e perspectivas inerentes ao método.



CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

A capacidade de autoregulação funcional desenvolvida por moléculas biológicas ao longo da evolução é característica que não é compartilhada por nenhuma outra molécula reagente, orgânica ou inorgânica, que se conheça. Esta habilidade desenvolveu-se graças à seleção de sequências de polipeptídeos que, ao se estruturarem em arranjos tridimensionais específicos, criaram centros reativos e de controle extremamente seletivos quanto ao tipo e/ou à estrutura de ligante com os quais estas macromoléculas viriam a interagir. Não pairam dúvidas, além do mais, que na busca e no exercício desta especificidade a água tem um papel primordial: ora modulando interações do esqueleto peptídico e entre os seus grupos laterais que impõem o enovelamento protéico funcionalmente correto, ora mediando interações entre proteínas e sequências específicas de bases de ácidos nucleicos e ribonucleicos, ou, entre grupos no sítio ativo com o substrato, ou, ora criando ambiente hidrofóbico para a manutenção funcional de um dado centro reativo. A despeito desta importância, muito pouco ainda é conhecido sobre a energética da interação de água com macromoléculas em solução, principalmente no que diz respeito à sua contribuição quanto à extensão de reações bioquímicas que, definitivamente ocorrem acompanhadas por mudanças de hidratação da macromolécula e dos ligantes da reação. Eventualmente, alguns autores tentaram abordar este problema propondo considerar a água como um ligante comum e, investigar a dependência do equilíbrio ou da velocidade de reações biológicas com a atividade da água. Dado que a água é o solvente natural de macromoléculas biológicas, a única maneira prática para alterar sua atividade seria através da adição de solutos à solução. Entretanto, este método de stress osmótico, permaneceu muito tempo sob suspeita e não ganhou popularidade. Em primeiro lugar, dado a necessidade de adicionar-se solutos à solução com a macromolécula, pairava a dúvida sobre a possível interação direta do soluto com os componentes da reação. Ademais, até recentemente não se utilizava uma descrição termodinâmica rigorosa do efeito da atividade de água sobre o equilíbrio de reações com macromoléculas em solução. Com esta falta, a análise dos efeitos atribuídos à mudança na atividade de água eram considerados especulativos pois, nem era possível descartar criteriosamente a participação direta do soluto, nem determinar quantitativamente as variações de hidratação associadas à reação.



Segundo, se não era possível determinar variações de hidratação associadas à mudanças conformacionais e/ou de reação não havia como fazer a correlação entre estrutura / função e hidratação.

Os trabalhos compilados nesta tese, representam nosso esforço no sentido de desenvolver uma metodologia quantitativa de análise do efeito da atividade da água sobre transformações bioquímicas, estudadas com o método de equilíbrio com uma atmosfera controlada de vapor de água e com o método de stress osmótico, com o objetivo ulterior de poder compreender a correlação acima mencionada, ou seja, a correlação entre a estrutura e a função de macromoléculas biológicas mediada por mudanças de hidratação.

A proteína eleita para estes estudos foi a Hemoglobina, uma proteína tetramérica, cuja função é transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos e dióxido de carbono na direção inversa. O mecanismo de controle da afinidade da proteína por O_2 faz uso de pelo menos duas conformações do tetramero: a conformação T (tensa) e R (relaxada), correspondentes à proteína totalmente desoxigenada e totalmente oxigenada, respectivamente. O equilíbrio entre estas conformações em solução determinam a afinidade global da Hb por O_2 em virtude de a afinidade da forma T por O_2 ser significativamente menor que a da forma R. Ademais, este equilíbrio depende tanto do grau de saturação dos sítio de ligação de O_2 , um efeito alostérico homotrópico, quanto da ocupação diferencial de sítios para prótons, CO_2 , fosfatos orgânicos e ânions, encontrados nas formas R e T da proteína. Este último efeito, o efeito alostérico heterotrópico, tem sua origem no fato de que o número de sítios de ligação destes efetores alostéricos e, a afinidade destes efetores por seus sítios de ligação específicos, se modificam com a mudança estrutural da proteína. Consequentemente, o equilíbrio conformacional entre as conformações alostéricas da Hb depende da atividade destes ligantes heterotrópicos e da atividade de O_2 em solução e esta acoplado à afinidade da Hb por O_2 . Em princípio, qualquer outro ligante, cuja estequiometria e afinidade de ligação são modificadas pela mudança conformacional de uma proteína alostérica, como a Hb, são capazes de desempenhar papel regulador de sua função. Este é o caso da água. Na transição do estado T para o estado R, a área da superfície de contato entre os dímeros que formam o tetramero da Hb varia e, grupos carregados com baixa exposição ao solvente no estado T são completamente expostos ao solvente no estado R. Portanto, o equilíbrio conformacional e a afinidade da Hb por oxigênio pode,



potencialmente, ser regulada pela energética de solvatação daqueles sítios presentes em uma conformação e ausentes em outra conformação da proteína.

Definida a proteína que servirá de modelo aos nossos estudos resta definir a estratégia para o controle da atividade de água. A estratégia mais simples é promover o equilíbrio entre a Hb e a sua água de hidratação sob uma atmosfera com pressão de vapor controlada¹. O primeiro trabalho incluído nesta compilação, Capítulo II, apresenta estudos da dependência conformacional de Hemoglobina oxidada com o conteúdo de água absorvida. Este trabalho, originário da tese de doutorado do autor, exemplifica bem a importância da água para a estabilidade conformacional de proteínas. Em síntese, mostramos que a metaHb sofre uma mudança conformacional reversível para uma conformação de hemicromo e, dependente da atividade de água. Resultados similares foram obtidos com a desoxiHb, uma forma funcional da proteína, que conquanto apresente um equilíbrio conformacional reversível com o estado hemocromo na ausência de O₂, na presença deste ligante é reduzida irreversivelmente. Obviamente, esta propriedade do hemocromo impossibilitou estudar o papel da água sobre as características de oxigenação com esta técnica de controle da atividade de água. Entretanto, os resultados apresentados no Capítulo II com esta técnica permite a obtenção de uma outra informação não explorada naquele artigo: pode-se, a partir das medidas apresentadas do equilíbrio conformacional entre metaHb e hemicromo em função da atividade da água, quantificar o número de moléculas de água responsáveis por esta transição conformacional e, usar estes dados para avaliar a diferença de energia entre a água ligada ao sítio e a água livre. Esta reconsideração será exposta na discussão com o objetivo de reconhecer o importante acoplamento entre

¹O uso deste método está, entretanto, sujeito à algumas limitações impostas pelo fato de que, nestas condições, o sistema sob investigação encontra-se na forma de filmes sólidos ou de pó. A primeira esta relacionada às técnicas utilizadas para acompanhar o progresso da reação, haja visto que muitas delas, como as espectroscópicas, requerem na maioria das vezes amostras transparentes. Por outro lado, se desejasse estudar a reação de uma macromolécula com um ligante não volátil, provavelmente este sistema não encontraria sua posição de equilíbrio, dado a dificuldade de difusão dos componentes da reação em um meio sólido. Uma outra limitação importante é a dificuldade experimental que representa controlar a quantidade de água absorvida por um substrato em atmosferas com atividade de água de aproximadamente 0,98. Nestas atmosferas pequenos gradientes de temperatura podem drenar vapor de água de um ponto a outro, o que torna o controle das condições experimentais muitíssimo exigentes para o estabelecimento do equilíbrio de absorção de água pela proteína. Apesar disto, este método oferece inúmeras possibilidades para o estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de biopolímeros [32].



mudanças conformacionais e a energia cooperativa oriunda da re-estruturação da primeira camada de água de hidratação de proteínas.

A segunda estratégia experimental utilizada para estudar e quantificar o papel da hidratação sobre as características funcionais da Hb foi adicionar solutos neutros à solução na qual as isotermas de ligação de oxigênio a Hb são determinadas. Este método, tem sido cada vez mais reconhecido na literatura pela designação de método de stress osmótico [2,16]. Estas investigações possibilitaram a publicação de três artigos, reproduzidos no Capítulo III.

No primeiro artigo, Capítulo III - parte A, estuda-se o efeito de diferentes solutos sobre a afinidade da Hb por oxigênio. Mostrou-se que a adição destes solutos à solução de Hb induz a diminuição da afinidade da Hb por O_2 proporcional à concentração de partículas dissolvidas e, independente da natureza dos solutos adicionados [2]. Utilizando relações de linkage de Wyman [20,21] foi possível encontrar evidências indicando que o efeito observado se deve à mudanças de hidratação da proteína que são sensíveis à mudança na atividade de água impostas pela adição de solutos, e, não a um efeito direto de ligação daqueles solutos à Hb. Ademais, foi possível determinar o número de moléculas de água associadas à oxigenação da Hb a partir: a) da análise da dependência da afinidade global da Hb por O_2 com a atividade de água, e independentemente; b) da variação do grau de saturação da Hb por O_2 , à atividade de O_2 constante, devido à variação da atividade da água, através de uma análise derivada a partir da equação de Gibbs-Duhem. Destaque-se, que com este trabalho foi possível demonstrar que a variação de hidratação associada à oxigenação da Hb, medida por stress osmótico e calculada com os modelos acima mencionados, concorda bem com os a diferença entre a superfície acessível ao solvente da oxi-Hb em relação à desoxi-Hb, calculadas a partir das estruturas cristalográficas destas formas da Hb. A descoberta desta correlação direta, entre os nossos resultados funcionais com a Hb e os dados estruturais de cristalografia de difração de Raios-X para as duas formas desta proteína, tem contribuído muito para quebrar o ceticismo anteriormente existente quanto à utilidade do método de stress osmótico para o estudo do papel da hidratação em macromoléculas biológicas.

O segundo artigo que compõe o Capítulo III, parte B, explora a descoberta de que a água é um efector da oxigenação da Hb, e, portanto sensível à variações na sua



atividade. Neste artigo descreve-se o re-estudo do efeito alostérico de Cl^- sobre a afinidade da Hb. É bem conhecido na literatura que o íon cloreto liga-se preferencialmente ao estado desoxigenado da Hb, o que desloca o equilíbrio conformacional da proteína em direção à conformação protéica com menor afinidade por oxigênio. Entretanto, a afinidade deste íon pelos sítios alostéricos da proteína é bastante baixa. Consequentemente, a medida do efeito deste íon sobre a afinidade da Hb por O_2 exige que a concentração do sal de cloreto na solução seja significativamente alta. Em experimentos típicos, descritos na literatura, a concentração de Cl^- varia entre 0,1 e 1 molar, o que implica que a concentração de partículas na solução varia duas vezes mais, impondo, portanto, uma grande variação da atividade de água. Partindo deste raciocínio, buscou-se aferir a possibilidade de analisar se o efeito do íon Cloreto sobre a afinidade da Hb por O_2 não teria embutido, também, o efeito da variação da atividade de água. Um experimento muito simples, mas fundamental, foi idealizado: medir o efeito de Cl^- em condições tais que a atividade de água é mantida constante enquanto a atividade do íon varia. Com este experimento mostrou-se que, de fato, o efeito de Cl^- sobre oxigenação da Hb é menor que aquele anteriormente atribuído. Neste trabalho, também, apresentamos pela primeira vez um formalismo que permite quantificar simultaneamente, e com sucesso, a variação do número de íons e de moléculas de água associados à uma transição conformacional, a partir de resultados de equilíbrio medidos com ambas as atividades variáveis.

No terceiro artigo desta série, Capítulo III - parte C, reconsideramos criticamente a hipótese de que o soluto, utilizado para tamponar a atividade da água, pudesse interagir diretamente com a Hb, e, estendemos nossas investigações para avaliar a possível contribuição que as mudanças induzidas na constante dielétrica da solução, pela adição de solutos, pudesse alterar o equilíbrio conformacional da Hb. A priori, estas questões são intrinsecamente relevantes desde que se deseja distinguir claramente se o efeito da adição de soluto à solução de uma proteína é um efeito indireto, através do potencial químico da água, ou se este efeito deriva da ligação direta do ligante ou da modificação das características de solução que podem alterar interações protéicas de origem eletrostática. Ademais, a realização do trabalho descrito neste artigo teve como motivação extra responder à sugestão de Belleli et.al. (*J.Biol.Chem.*, (1993), **268**, 4742-4744) de que o efeito de solutos neutros na Hb seria devido ou à mudança da constante dielétrica do meio ou à ligação



específica do soluto. Para resgatar estas questões do campo especulativo decidimos investigar o efeito do soluto sobre a oxigenação da Hb utilizando solutos como glucose, que diminui, e glicina, que aumenta a constante dielétrica da solução. Quanto à possibilidade de o efeito da adição de solutos ser proveniente da ligação preferencial do soluto à proteína, nós testamos esta hipótese ajustando os dados de oxigenação obtidos com glucose e glicina com a equação que havíamos derivado para descrever o efeito concomitante de ligação de Cl^- e H_2O . Desta maneira, pudemos mostrar criteriosamente que estes solutos não se ligam e que o efeito observado com a Hb não se deve à constante dielétrica da solução.

Os trabalhos acima descritos não esgotam o tema do efeito da água sobre as características de oxigenação da Hb, e, nem está limitado ao efeito de água sobre esta proteína unicamente. No Capítulo V, discutimos brevemente os principais resultados que tem sido compilados em estudos recentes do efeito de água em diversas reações como estabilidade conformacional de proteínas e DNA, interação de drogas e proteínas com DNA e RNA, e atividade enzimática. Ainda neste capítulo são discutidas as perspectivas de avanço na compreensão do papel termodinâmico da água em reações biológicas.

Equilibrium and kinetic behavior

Biophysical Journal 36, 33-39 (1980)



Hydration-dependent conformational states of hemoglobin

Equilibrium and kinetic behavior

Marcio F. Colombo^a and Rosemary Sanches^b^aInstituto de Biofísica, Laboratório de Física, UNESP, R. José do Rio Preto, and ^bInstituto de Física e Química de S. Carlos, USP, S. Carlos, Brazil

Received 10 February 1989

Revised manuscript received 5 July 1989

Accepted 1 November 1989

Hemoglobin; Hydration; Hemochrom; Conformational state

The equilibrium and kinetics of methemoglobin conversion to hemochrom induced by dehydration were investigated by visible absorption spectroscopy. Below about 0.20 g water per g hemoglobin only hemochrom was present in the sample; above this value, an increasing proportion of methemoglobin appeared with the increase in hydration. The transition between the two derivatives showed a first-order-like behavior and was observed to be reversible. The rates obtained for the transition of methemoglobin to hemochrom were 0.03 and 0.47 min^{-1} for hemochrom to methemoglobin 0.03 and 0.47 min^{-1} . We suggest that hemochrom is a conformational state of hemoglobin observed for the transition between the two derivatives.

Marcio Francisco Colombo e Rosemary Sanches

“Hydration-dependent conformational states of hemoglobin

Equilibrium and kinetic behavior”

Biophysical Journal 36, 33-39 (1990)

1. Introduction
The nature of a biological role played by water is unclear; however, it is certainly essential to establish the structural and dynamical aspects of the macromolecules.

The interactions of a protein with water are crucial in stabilizing its native structure, although dehydration does not necessarily imply that unfolding occurs. Based mostly on studies using lysozyme [1-3], it is believed that a dehydrated protein is in a latent functional state, i.e., biological function can be restored if the protein is rehydrated above a certain critical hydration value.

Several types of experimental results have appeared in the literature concerning the dehydra-

tion of proteins. Some data indicate the occurrence of minor conformational changes in the protein (ref. 3 and references therein), while none are observed in ref. 2. These conformational changes, when they occur, are reversible upon rehydration. It is now accepted that the lack of activity of a dried protein sample is correlated (at least in part) with the lack of structural flexibility, which is recovered when the protein is rehydrated above a critical threshold value. Proteins are currently considered as dynamical systems whose structures fluctuate around an average value determined by X-ray diffraction, proceeding through several different conformational states [4,5]. The fluctuations are ‘frozen’ at low temperatures, where it is possible to follow the kinetics of different conformational substates. Structural flexibility is also affected by dehydration, however, very few experiments have been focused on correlating hydration with conformational states. The present work is aimed in this direction.

Correspondence address: M.F. Colombo, Instituto de Biofísica, Laboratório de Física, UNESP, R. José do Rio Preto, Brazil.



BIOCHE 01412

Hydration-dependent conformational states of hemoglobin

Equilibrium and kinetic behavior

Marcio F. Colombo^a and Rosemary Sanches^b

^a Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, S. José do Rio Preto and ^b Instituto de Física e Química de S. Carlos, USP, S. Carlos, Brazil

Received 10 February 1989

Revised manuscript received 5 July 1989

Accepted 1 November 1989

Hemoglobin; Hydration; Hemichrome; Conformational state

The equilibrium and kinetics of methemoglobin conversion to hemichrome induced by dehydration were investigated by visible absorption spectroscopy. Below about 0.20 g water per g hemoglobin only hemichrome was present in the sample; above this value, an increasing proportion of methemoglobin appeared with the increase in hydration. The transition between the two derivatives showed a time-dependent biphasic behavior and was observed to be reversible. The rates obtained for the transition of methemoglobin to hemichrome were 0.31 and 1.93 min⁻¹ and for hemichrome to methemoglobin 0.05 and 0.47 min⁻¹. We suggest that hemichrome is a reversible conformational state of hemoglobin and that the two rates observed for the transition between the two derivatives reflect the α - and β -chains of hemoglobin.

1. Introduction

Water is a key element in biological systems. The nature of the biological role played by water is unclear, however, it is certainly essential to establish the structural and dynamical aspects of the macromolecules.

The interactions of a protein with water are crucial in stabilizing its native structure, although dehydration does not necessarily imply that unfolding occurs. Based mostly on studies using lysozyme [1–3], it is believed that a dehydrated protein is in a latent functional state, i.e., biological function can be restored if the protein is rehydrated above a certain critical hydration value.

Several types of experimental results have appeared in the literature concerning the dehydra-

tion of proteins. Some data indicate the occurrence of minor conformational changes in the protein (ref. 3 and references therein), while none were observed in ref. 2. These conformational changes, when they occur, are reversible upon rehydration. It is now accepted that the lack of activity of a dried protein sample is correlated (at least in part) with the lack of structural flexibility, which is recovered when the protein is rehydrated above a critical threshold value. Proteins are currently considered as dynamical systems whose structures fluctuate around an average value determined by X-ray diffraction, proceeding through several different conformational states [4,5]. The fluctuations are 'frozen' at low temperatures, where it is possible to follow the kinetics of different conformational substates. Structural flexibility is also affected by dehydration, however, very few experiments have been focussed on correlating hydration with conformational states. The present work is aimed in this direction.

Correspondence address: M.F. Colombo, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, S. José do Rio Preto, Brazil.

We have investigated the equilibrium and kinetics of the conformational transitions induced by dehydration of human hemoglobin (Hb) in a film using visible absorption spectroscopy. Previous studies on hemoglobin dehydration have shown that the dried protein forms a derivative that is optically and magnetically distinct from that observed in solution [6,7]. This state is known as hemichrome or hemochrome depending on the heme iron being in the ferric or ferrous state, respectively. It was proposed that in this derivative the iron is coordinated to the proximal and distal histidines [8–10]; thus, the term bis-His has also been used to designate this derivative. The bis-His state has been observed in solution in several investigations [11–17]. However, it is unclear as to whether this conformational state is a stable Hb structure or a step in the process of protein denaturation. In this study, we have determined the critical hydration values for Hb, its conformational states and the dependence of structural flexibility on the degree of hydration.

2. Materials and methods

Hb in the oxy form was prepared from human blood according to a standard procedure [18]. The Met derivative was prepared by addition of potassium ferricyanide to HbO_2 at neutral pH and in very small excess over the heme (10%). The ferrocyanide formed was removed by gel filtration [19].

In order to follow the formation of the film, 15–20 μl of a 5–8 mM MetHb solution was spread on a glass slide and located in a closed sample holder in the presence of a desiccant (P_2O_5 and saturated salt solutions were used [20]). The sample holder was introduced into a Cary 17 spectrophotometer keeping the glass slide in the horizontal position. Several spectra were recorded as a function of time until no further spectral changes were observed. To rehydrate the film, the desiccant was substituted by distilled water.

Measurements were also made on samples equilibrated for 24 h in environments with different relative humidities (R.H.). Hydration and dehydration were also followed at a fixed wavelength.

3. Results

3.1. Sorption and desorption of water in MetHb

Fig. 1 shows the optical absorption spectra of MetHb (pH 6.8) in the range 450–700 nm. The hemoglobin was initially in solution and its dehydration in an environment of 11% R.H. was followed as a function of time. The spectra drawn as continuous lines (fig. 1a–c) show absorption bands at 500 and 630 nm, typical of the MetHb derivative in solution [21]. Analysis of these spectra indicates a decrease in the absolute spectral intensity, while the relative intensities of the bands and the shape of the spectra are invariant; this effect is probably due to the migration of Hb to the border of the film. After this time period, different spectra (drawn as broken lines; fig. 1d–g) were recorded. A decrease in intensity of the bands at 500 and 630 nm and a simultaneous increase at about

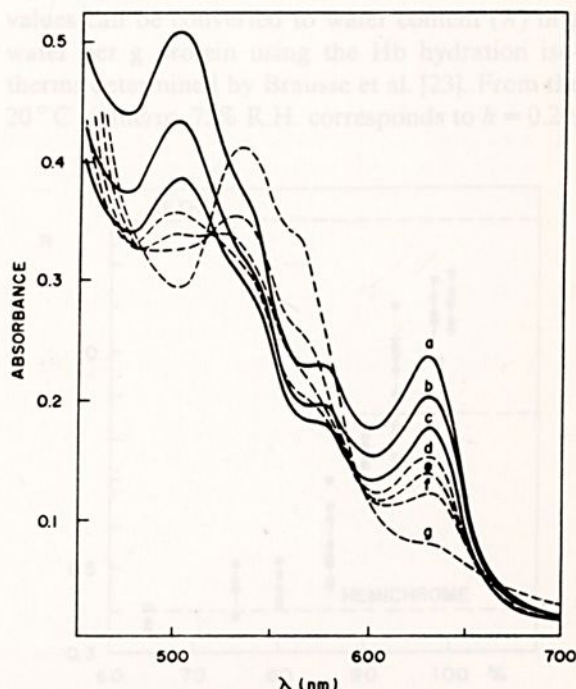


Fig. 1. Dehydration process: absorption spectra obtained during dehydration of a MetHb solution in an 11% R.H. environment. Spectra were taken (a) 14, (b) 30, (c) 39, (d) 45, (e) 48, (f) 51, (g) 60, 83 and 122 min after the beginning of the process. Scan time, 2 min.

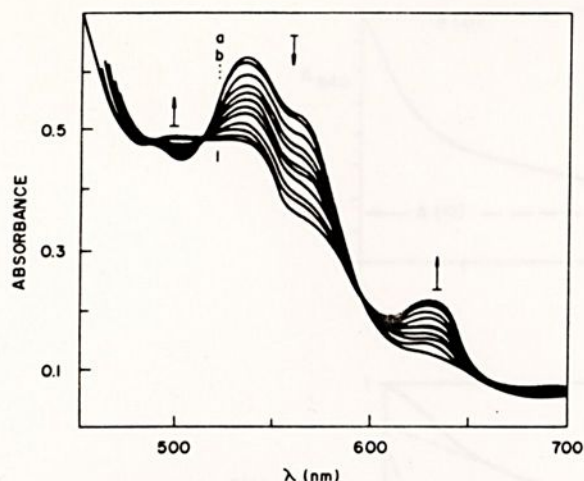


Fig. 2. Rehydration process: absorption spectra obtained during the rehydration of a Hb film initially at 75% R.H. and transferred to a 100% R.H. environment. Spectra were taken (a) 0, (b) 3, (c) 6, (d) 9, (e) 12, (f) 15, (g) 18, (h) 23, (i) 31, (j) 39, (k) 53, (l) 72 and 115 min after the beginning of the process. Arrows indicate directions of the changes with time. Scan time, 2 min.

535 nm were observed. After about 1 h this spectral transition was completed and no further changes were observed. On protein dehydration reaching completion, the spectrum shows an absorption band at 536 nm and a shoulder near 565 nm, characteristic of the hemichrome observed in hemoproteins [6].

The reversibility of the MetHb to hemichrome transition was verified by rehydration of a film equilibrated at 75% R.H. The film was transferred to a 100% R.H. environment and the spectra recorded as a function of time, as shown in fig. 2. The characteristic hemichrome bands decrease in intensity as a function of time, while the bands at 500 and 630 nm increase in intensity, indicating the tendency of the hemichrome to undergo reconversion to MetHb. Even after reaching equilibrium at 100% R.H., a mixture of hemichrome and MetHb is observed; complete conversion was achieved only when water was dropped onto the film.

Another characteristic of the spectra shown in fig. 2 is the presence of four isosbestic points at 485, 519, 595 and 660 nm, suggesting that only the two derivatives, hemichrome and MetHb, are pre-

sent in the film. Isosbestic points very close to these were also observed in the MetHb to hemichrome transition induced by sodium salicylate in solution [22].

Measurements were also made for samples equilibrated in environments of differing relative humidity at room temperature. For these spectra, the ratio R of the absorbance at 630 nm to that at 595 nm (one of the isosbestic points) was calculated, giving the MetHb fraction in the film. In the absence of MetHb $R = 0.4$, as obtained for a film equilibrated in P_2O_5 , while $R = 1.3$ corresponds to 100% MetHb in the film, as determined for the spectrum of MetHb in solution. A plot of R as a function of relative humidity is presented in fig. 3. Below about 75% R.H. the protein is totally in the hemichrome form and, as the R.H. increases the fraction of MetHb increases; however, at 100% R.H., the protein does not revert completely to the MetHb form. The midpoint of the transition (corresponding to a 50:50% mixture of the two derivatives) is observed at about 93% R.H. The R.H. values can be converted to water content (h) in g water per g protein using the Hb hydration isotherms determined by Brausse et al. [23]. From the 20°C isotherm, 75% R.H. corresponds to $h = 0.20$,

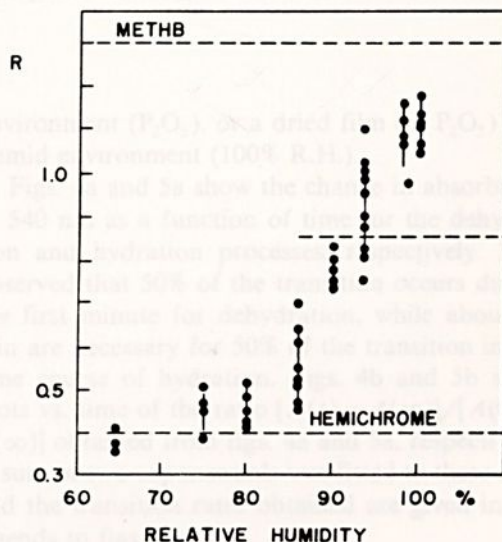


Fig. 3. Hemichrome-MetHb transition: ratio R of the absorbance at 630 nm to that at 595 nm as a function of hydration (R.H.). Results from several experiments are plotted and the bars denote the errors in the mean values.

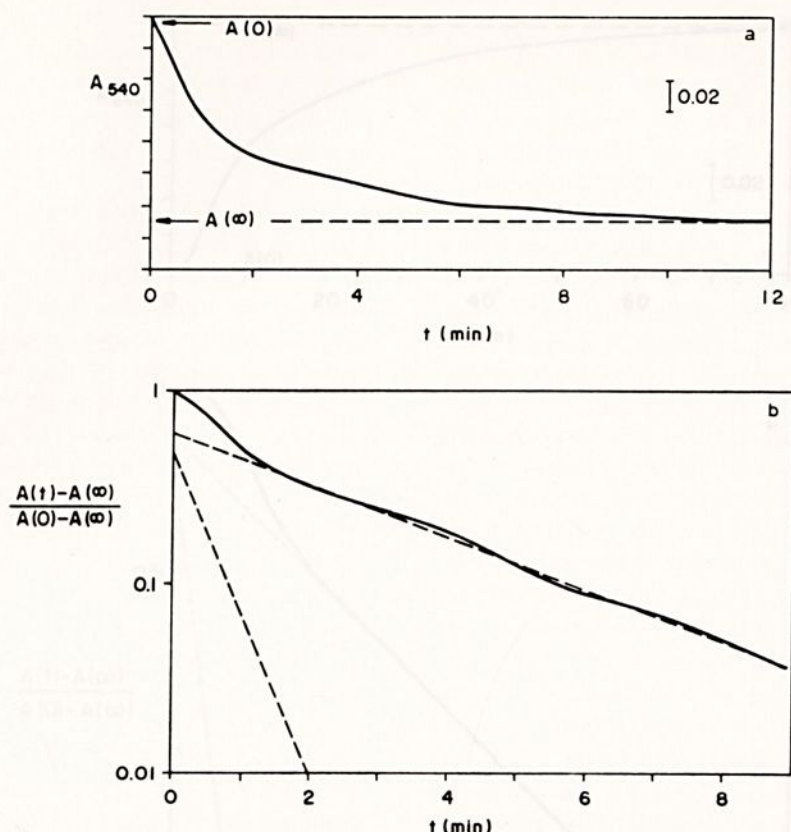


Fig. 4. Dehydration process: change in absorbance at 540 nm for a MetHb film as a function of dehydration time on (a) linear and (b) logarithmic scales. The lines in panel b were fitted to the experimental points and correspond to rates of 0.31 and 1.93 min⁻¹.

93% R.H. to $h \approx 0.35$ and 100% R.H. to $h > 0.50$. Our results indicate, therefore, that below about 0.20 g water per g protein, only hemichrome is present in the film and above this value hemichrome can be converted to MetHb. Equal proportions of the two derivatives are observed for a degree of hydration of about 0.35 g water per g protein and hemichrome is present even at values above about 0.50 g water per g protein.

3.2. Kinetics of the MetHb-hemichrome transition

The transition from one derivative to the other was investigated following the changes in absorbance at a chosen wavelength. The hydration and dehydration processes were initiated by transferring the humid film (100% R.H.) to a dry

environment (P₂O₅), or a dried film (in P₂O₅) to a humid environment (100% R.H.).

Figs. 4a and 5a show the change in absorbance at 540 nm as a function of time for the dehydration and hydration processes, respectively. It is observed that 50% of the transition occurs during the first minute for dehydration, while about 10 min are necessary for 50% of the transition in the time course of hydration. Figs. 4b and 5b show plots vs. time of the ratio $[A(t) - A(\infty)]/[A(0) - A(\infty)]$ obtained from figs. 4a and 5a, respectively. A sum of two exponentials was fitted to these data and the transition rates obtained are given in the legends to figs. 4 and 5.

These results are typical of two independent conversion processes, reflecting the existence of either two distinct Hb populations or an inter-

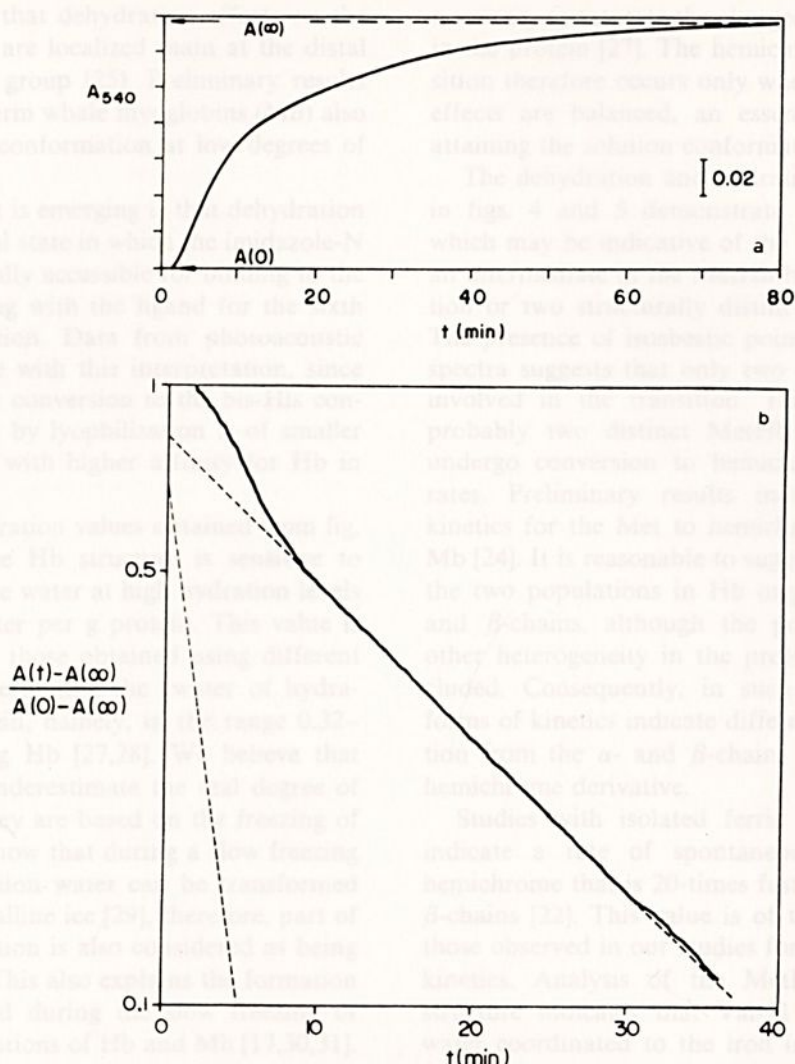


Fig. 5. Rehydration process: change in absorbance at 540 nm for a Hb film as a function of rehydration time on (a) linear and (b) logarithmic scales. The lines in panel b were fitted to the experimental points and correspond to rates of 0.05 and 0.47 min^{-1} .

mediate state in the MetHb-hemichrome transition. The latter possibility, however, is inconsistent with the sorption/desorption experiments that indicate only two states and no intermediate.

4. Discussion

Our results on sorption/desorption are indicative of a reversible MetHb-hemichrome transition. A reversible process was also observed for the

deoxyHb-hemichrome transition, deoxyHb retaining its oxygen-binding ability after rehydration [24]. Thus, the dehydration-induced conformational state cannot be considered as a denatured derivative of Hb, but, rather, represents a thermodynamically accessible conformation of Hb. Our results suggest, therefore, that Hb dehydration induces a reversible conformational change at the distal side of the heme group that facilitates binding of the distal His to the heme iron. This view is in accordance with Raman scattering stud-

HbCO indicating that dehydration effects on the Hb conformation are localized mainly at the distal side of the heme group [25]. Preliminary results with horse and sperm whale myoglobins (Mb) also suggest a bis-His conformation at low degrees of hydration [24].

The picture that is emerging is that dehydration induces a structural state in which the imidazole-N of His E7 is sterically accessible for binding to the iron ion, competing with the ligand for the sixth coordination position. Data from photoacoustic spectroscopy agree with this interpretation, since they show that the conversion to the bis-His conformation induced by lyophilization is of smaller extent for ligands with higher affinity for Hb in solution [26].

The critical hydration values obtained from fig. 3 indicate that the Hb structure is sensitive to perturbations in the water at high hydration levels such as 0.50 g water per g protein. This value is much greater than those obtained using different techniques for determining the 'water of hydration' for this protein, namely, in the range 0.32–0.42 g water per g Hb [27,28]. We believe that such procedures underestimate the real degree of hydration, since they are based on the freezing of water. DSC data show that during a slow freezing process, the hydration water can be transformed partially into crystalline ice [29], therefore, part of the water of hydration is also considered as being in the 'free' state. This also explains the formation of bis-His observed during the slow freezing of Met and deoxy solutions of Hb and Mb [17,30,31].

Several lines of evidence from spectroscopy such as optical absorption [24,32], infrared absorption [33], Raman scattering [25] and EPR [34] suggest that at high hydration levels the hemoproteins exhibit two conformations, one of which is the solution conformer and the other the conformer observed in the dehydrated state. These results, therefore, are in agreement with our observations at high water contents, and corroborate the idea that at these hydration levels the conformational dynamics of the protein begin to occur on a slower scale, allowing the detection of conformers that are not observed in solution.

Concerning the low hydration limit, $h = 0.20$ corresponds approximately to the amount of water

necessary to saturate the charged and polar groups in the protein [27]. The hemichrome-MetHb transition therefore occurs only when the electrostatic effects are balanced, an essential condition for attaining the solution conformation of the protein.

The dehydration and hydration kinetics shown in figs. 4 and 5 demonstrate biphasic behavior which may be indicative of the existence of either an intermediate in the MetHb-hemichrome transition or two structurally distinct Hb populations. The presence of isosbestic points in our previous spectra suggests that only two chromophores are involved in the transition. Therefore, there are probably two distinct MetHb populations that undergo conversion to hemichrome at different rates. Preliminary results indicate monophasic kinetics for the Met to hemichrome transition in Mb [24]. It is reasonable to suggest, therefore, that the two populations in Hb originate from its α - and β -chains, although the possibility of some other heterogeneity in the protein cannot be excluded. Consequently, in such a case, the two forms of kinetics indicate different rates of transition from the α - and β -chains of MetHb to the hemichrome derivative.

Studies with isolated ferric α - and β -chains indicate a rate of spontaneous conversion to hemichrome that is 20-times faster for α - than for β -chains [22]. This value is of the same order as those observed in our studies for the two forms of kinetics. Analysis of the MetHb heme pocket structure indicates that Val-11 is closer to the water coordinated to the iron in the β -chains as compared to the α -chains [35], which may explain the ease with which the β -chains undergo reduction compared to the α -chains. Taking all of the results together, it is highly tempting to relate the two observed populations to the existence of two distinct chains of Hb, although conclusive evidence remains to be obtained.

Acknowledgements

We thank Dr. Wagner Maricondi for providing human blood. This work was supported by FAPESP and CAPES.

References

- 1 P.H. Yang and J.A. Rupley, *Biochemistry* 18 (1979) 2654.
- 2 J.A. Rupley, E. Gratton and G. Careri, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 18.
- 3 J.L. Finney and P.L. Poole, *Comments Mol. Cell. Biophys.* 2 (1984) 129.
- 4 R.H. Austin, K. Beeson, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, I. C. Gunsalus and V.P. Marshall, *Phys. Rev. Lett.* 32 (1974) 403.
- 5 A. Ansari, J. Beredzen, D. Braunstein, B.R. Cowen, H. Frauenfelder, M.K. Hong, I.E.T. Iben, J.B. Johnson, P. Ormos, T.B. Sauke, R. Scholl, A. Schulte, P.J. Steinbach, J. Vittitow and R.D. Young, *Biophys. Chem.* 26 (1987) 337.
- 6 D. Keilin and E.F. Hartree, *Nature* 170 (1952) 161.
- 7 G.C. Papaefthymiou, B.H. Huynh, C.S. Yen, J.L. Groves and C.S. Wu, *J. Chem. Phys.* 62 (1975) 2995.
- 8 S. Maricic, G. Pifat and V. Pravidic, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 68 (1964) 787.
- 9 M.F. Perutz, E.J. Heidner, J.E. Ladner, J.G. Beutler, C. Ho and E.F. Slade, *Biochemistry* 13 (1974) 2187.
- 10 G.B. Ogunmola, A. Zipp, F. Chen and W. Kauzmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (1977) 1.
- 11 W.S. Caughey, W.Y. Fujimoto, A.J. Bearden and T.H. Moss, *Biochemistry* 5 (1966) 1255.
- 12 A. Zipp and W. Kauzmann, *Biochemistry* 12 (1972) 4217.
- 13 D.L. Drabkin and J.H. Austin, *J. Biol. Chem.* 112 (1935) 89.
- 14 E.A. Rachmilewitz, *Sem. Hematol.* 11 (1974) 441.
- 15 D.J. Bucher and W.D. Brown, *Biochemistry* 12 (1971) 4239.
- 16 T. Iuzuka and M. Kotani, *Biochim. Biophys. Acta* 194 (1969) 351.
- 17 H. Eicher, W. Bode and F. Parak, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 1446.
- 18 A. Riggs, *Methods Enzymol.* 76 (1981) 5.
- 19 M.W. Neal and J.R. Florini, *Anal. Biochem.* 55 (1981) 328.
- 20 M.J. Schneider and A.S. Schneider, *J. Membrane Biol.* 9 (1972) 127.
- 21 E. Antonini and M. Brunori, *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands* (North-Holland, Amsterdam, 1971).
- 22 E.A. Rachmilewitz, J. Peisach and W.E. Blumberg, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 3356.
- 23 G. Brausse, A. Mayer, T. Nedetzka, P. Schlecht and H. Vogel, *J. Phys. Chem.* 72 (1968) 3098.
- 24 M.F. Colombo, Ph.D. Thesis, Instituto de Física e Química de S. Carlos, Universidade de S. Paulo, Brazil (1988).
- 25 E.W. Findsen, P. Simons and M.R. Ondrias, *Biochemistry* 25 (1986) 7912.
- 26 G.M. Alter, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14960.
- 27 I.D. Kuntz, Jr and W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.* 28 (1974) 239.
- 28 A.J. Hopfinger, *Intermolecular interactions and biomolecular organizations* (Wiley, New York, 1977).
- 29 W. Doster, A. Bachleitner, R. Dunau, M. Hiebl and E. Luscher, *Biophys. J.* 50 (1986) 213.
- 30 K. Gray and E.F. Slade, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49 (1972) 1019.
- 31 A. Levy and J.M. Rifkind, *Biochemistry* 24 (1985) 6050.
- 32 S. Bohm and L.V. Abaturon, *FEBS Lett.* 77 (1977) 21.
- 33 W.E. Brown III, J.W. Sutcliffe and P.D. Pulsinelli, *Biochemistry* 22 (1983) 2914.
- 34 R. Sanches, *Biochim. Biophys. Acta* 955 (1988) 310.
- 35 J.T. Edsall and H.A. McKenzie, *Adv. Biophys.* 16 (1983) 53.

CAPÍTULO III

Parte A

Marcio Francisco Colombo, Donald C. Rau e V. Adrian Parsegian

“Protein Solvation in Allosteric Regulation:

A Water Effect on Hemoglobin”

Science **256**, pp. 655-659 (1992)



Protein Solvation in Allosteric Regulation:
A Water Effect on Hemoglobin

Marcio F. Colombo,* Donald C. Rau, V. Adrian Parsegian

Protein Solvation in Allosteric Regulation:
A Water Effect on Hemoglobin

Marcio F. Colombo,* Donald C. Rau, and V. Adrian Parsegian

The regulation of protein or enzymatic activity is often accomplished through the control of equilibria among allosteric conformations. Differences in binding affinities of small effector molecules to specific regulatory sites among these conformations modulate this equilibrium. For hemoglobin (Hb), the prototypic allosteric protein, equilibria between R and T conformations, and consequently its oxygen (O_2) affinity, is modulated by the binding of several small molecules and ions, such as H^+ , CO_2 , phosphate, and Cl^- . The struc-

tures of the two limiting conformations show that several direct contacts between subunits are broken and exposed to solvent during the transition from deoxy T state to the fully oxygenated R state (1). This change in structure implies a difference in hydration or water binding between the two conformations. However, the energetic consequences of solvation regulating protein activity are usually neglected.

Such water sensitivity can, in fact, be probed through the dependence of O_2 affinity on water activity or, equivalently, osmotic pressure. This "osmotic stress" method (2) has been used to measure intermolecular forces (3), to map the thermodynamics of Hb S assembly (4), to measure the change in aqueous volume of a large, voltage-gated ionic channel (5), and to modify the electron transfer reaction in cytochrome C oxidase (6).

M. F. Colombo and D. C. Rau, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

V. A. Parsegian, Biophysics Research Laboratory, Division of Computer Research and Technology and Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

Copyright © 1992 by the American Association for the Advancement of Science



Protein Solvation in Allosteric Regulation: A Water Effect on Hemoglobin

Marcio F. Colombo,* Donald C. Rau, V. Adrian Parsegian

The oxygen affinity of hemoglobin varies linearly with the chemical potential of water in the bathing medium, as seen from the osmotic effect of several neutral solutes, namely sucrose, stachyose, and two polyethyleneglycols (molecular weights of 150 and 400). The data, analyzed either by Wyman linkage equations or by Gibbs-Duhem relations, show that ~60 extra water molecules bind to hemoglobin during the transition from the fully deoxygenated tense (T) state to the fully oxygenated relaxed (R) state. This number, independent of the nature of the solute, agrees with the difference in water-accessible surface areas previously computed for the two conformations. The work of solvation in allosteric regulation can no longer go unrecognized.

The regulation of protein or enzymatic activity is often accomplished through the control of equilibrium among allosteric conformations. Differences in binding affinities of small effector molecules to specific regulatory sites among these conformations modulate this equilibrium. For hemoglobin (Hb), the prototypic allosteric protein, equilibrium between R and T conformations, and consequently its oxygen (O_2) affinity, is modulated by the binding of several small molecules and ions, such as H^+ , CO_2 , phosphates, and Cl^- . The struc-

tures of the two limiting conformations show that several direct contacts between subunits are broken and exposed to solvent during the transition from deoxy T state to the fully oxygenated R state (1). This change in structure implies a difference in hydration or water binding between the two conformations. However, the energetic consequences of solvation regulating protein activity are usually neglected.

Such water sensitivity can, in fact, be probed through the dependence of O_2 affinity on water activity or, equivalently, osmotic pressure. This "osmotic stress" method (2) has been used to measure intermolecular forces (3), to map the thermodynamics of Hb S assembly (4), to measure the change in aqueous volume of a large, voltage-gated ionic channel (5), and to modify the electron transfer reaction in cytochrome C oxidase (6).

The linkage between O_2 uptake and ligand concentration is most often analyzed by relations developed by Wyman (7). The

M. F. Colombo and D. C. Rau, Laboratory of Biochemistry and Metabolism, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

V. A. Parsegian, Physical Sciences Laboratory, Division of Computer Research and Technology and Laboratory of Biochemistry and Metabolism, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892.

*On leave from Departamento de Física, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.



common usage of these equations, however, implicitly assumes that the activity of one solution component is varied while all others are held constant. It is, of course, not possible to change the concentration of a single solute without also affecting the activity of water. Thus, changes in the affinity of Hb for O₂ with the concentration of small solutes reflect the energetics not only of removing bound solutes from the bulk solution, but also of removing hydration water. An important criterion for discriminating between direct solute binding and osmotic effects is the sensitivity to the chemical nature of the solute. A strictly osmotic effect would not depend on solute identity. A dependence of Hb O₂ affinity on the concentration of several small, neutral solutes has been observed previously (8), but it has not been specifically analyzed for the indirect effect on water activity.

In this report, we explicitly consider the linkage between water activity and O₂ affinity. We infer from the data that ~60 extra water molecules are bound in the deoxy-to-oxy transition. These water molecules act thermodynamically as allosteric ligands and provide an essential energetic contribution to the functional regulation of Hb.

The ligand binding properties of Hb can be well described by the Gibbs-Duhem relation. At constant temperature and hydrostatic pressure, we have for an Hb solution with an average number of O₂ (n_{O_2}), water (n_w), and other solute molecules (n_L) associated per mole of protein:

$$d\mu_{Hb} = -n_{O_2}d\mu_{O_2} - n_w d\mu_w - \sum n_L d\mu_L \quad (1)$$

where μ_{Hb} , μ_{O_2} , μ_w , and μ_L are the chemical potentials of protein, oxygen, water, and other solutes in solution, respectively (9). Equivalently, solution components can be considered as surface-active compounds regulating the free energy of a protein surface (10).

Several Maxwell relations can be written based on Eq. 1, relating changes in $\{n_i\}$ to changes in $\{\mu_i\}$. If there is no change in binding of solute with oxygenation, that is, $(\partial n_i / \partial \mu_{O_2})_{\mu_w} = 0$, then a particular Maxwell relation connecting changes in the number of associated waters n_w and oxygens n_{O_2} with changes in O₂ and water chemical potentials is:

$$(\partial n_w / \partial \mu_{O_2})_{\mu_w, \dots} = (\partial n_{O_2} / \partial \mu_w)_{\mu_{O_2}, \dots} \quad (2)$$

This basic linkage relation allows one to measure changes in water binding, or protein hydration, due to molecular events triggered by changes in O₂ binding. For a simple osmotic stress effect, the chemical identity of the solute is unimportant and only the osmolality matters.

The term $(\partial n_{O_2} / \partial \mu_w)_{\mu_{O_2}}$ is the experimentally measurable change in O₂ binding at constant O₂ activity with a change in

water activity. Integrating this quantity over all O₂ pressures gives the total change of water, $\Delta n_w = (n_w^{oxy} - n_w^{deoxy})$, associated with Hb in the transit from the fully deoxygenated to the fully oxygenated state, that is,

$$\Delta n_w = \int (\partial n_{O_2} / \partial \mu_w)_{\mu_{O_2}} d\mu_{O_2} \quad (3)$$

Several reciprocal differential relations like Eq. 2 can be derived to describe the interplay of O₂ activity and binding with ligand activity and binding. The linkage equations presented by Wyman (7) have in particular been widely applied to Hb oxygenation thermodynamics. A general relation for the coupling of μ_{O_2} and n_{O_2} with the binding of any solution component n_X and its chemical potential, μ_X , is

$$(\partial \mu_{O_2} / \partial \mu_X)_{n_{O_2}, \dots} = (\partial n_X / \partial n_{O_2})_{\mu_X, \dots} \quad (4)$$

Wyman (7) introduced a median ligand activity, p_m , to describe the full transition from deoxy to oxy form. For $\Delta n_{O_2} = 4$, Eq. 4 can then be expressed as

$$d \log(p_m) / d \log(a_X) = -\Delta n_X / 4 \quad (5)$$

To good approximation p_m is p_{50} , the oxygen partial pressure at half saturation of Hb. The slope of $\log(p_{50})$ versus $\log(a_X)$ gives Δn_X , the difference between the number of X associated with oxy and deoxy Hb.

Table 1. Sensitivity of $\log(p_{50}/p_{50}^0)$ on osmotic stress for Hb determined by fitting Eq. 5 to the experimental data.

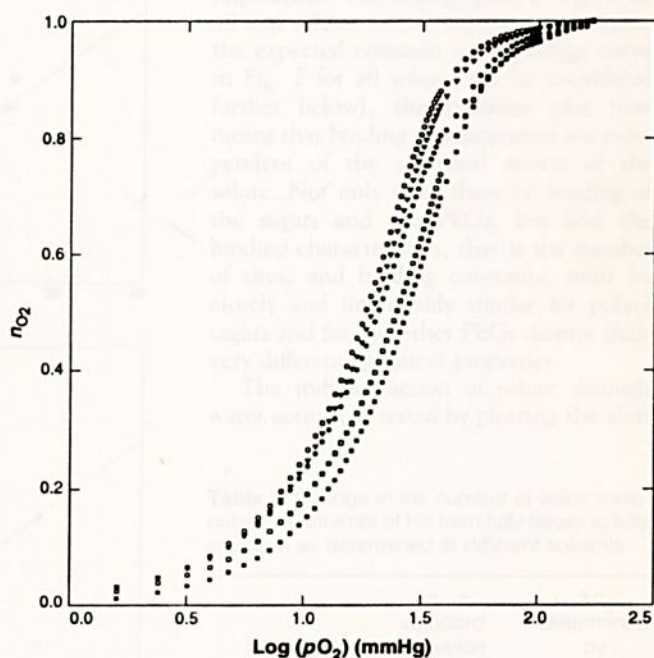
Solute	$d \log(p_{50}/p_{50}^0) / d \Pi \times 10^3$ (atm ⁻¹)	Standard deviation $\times 10^3$ (atm ⁻¹)
Sucrose	4.74	0.25
Stachyose	4.42	0.51
PEG-150	4.91	0.38
PEG-400	4.78	0.54
Mean value	4.71	0.13

When X refers specifically to water, Δn_X is equivalent to the Δn_w of Eq. 3.

The presence of neutral solutes in the Hb solution changes its O₂ affinity. In Fig. 1, the fraction of O₂ saturation of Hb, $\bar{n}_{O_2}$, versus $\log(p_{O_2})$, is shown for different sucrose concentrations. Similar experiments with other solutes, PEG-150, PEG-400, and stachyose, display the same behavior, that is, a decrease in O₂ affinity with the increase of neutral solute concentration. Calculated Hill coefficients are independent of solute concentrations over the ranges measured.

For consideration below, we further plot the data in two different ways. In Fig. 2, the

Fig. 1. Influence of osmotic pressures (Π) from different sucrose concentrations on Hb oxygenation: 1.8 (○), 7.7 (▽), 17.3 (□), 34.4 (◻), and 43 atm (■). Hemoglobin samples (21) were buffered with 0.1 M NaCl/0.05 M Tris, pH 6.93, at 37°C. Sucrose (Ultra pure, BRL), stachyose (Sigma), triethylene glycol (molecular weight 150), and polyethylene glycol (PEG), average molecular weight 400 (both from Fluka Chemika), were used without further purification. Hemoglobin concentration and met-Hb content were measured spectrophotometrically using published extinction coefficients (9). The osmolalities of the various solutions were measured with a Wescor 5100 C Vapor Pressure Osmometer. Hemoglobin O₂ binding curves were measured at 37°C and a protein concentration of about 1 mM tetramer [a concentration high enough to obviate problems of dimerization (13)] using a Hemo-O-Scan Oxygen Dissociation Analyser (SLM-Aminco, Silver Spring, Maryland). The samples were typically deoxygenated by 5.6% of CO₂ in nitrogen and reoxygenated with 25% O₂, 5.6% CO₂ in nitrogen. The same sensitivities of p_{50} to osmotic pressure were obtained using gasses with no CO₂. Concern over any small leaks was allayed by the observation of identical results with the unmodified Hemo-O-Scan and a modification sealing with silicone grease and enclosure in a plastic bag. Manual operation of the gas valves to give a very slow rate of oxygenation showed that the measured curves are equilibrium curves. The original curves were digitized in a Numonics 2200 digitizer (Jandel Scientific) for further analysis. To within the accuracy allowed by the Hemo-O-Scan, the oxygen loading of myoglobin showed no sensitivity to osmotic stress.



log of the ratio of O₂ partial pressures at half saturation with and without added solute, $\log[p_{50}/p_{50}^0]$, is shown versus osmotic pressure Π for the four neutral solutes. In Fig. 3, we plot the same data as $\log[p_{50}/p_{50}^0]$ versus $\log[X]$ where $[X]$ is the molar solute concentration.

These data show that 50 to 70 solute-excluding water molecules become part of the Hb tetramer in its transition from the deoxy to oxy form. We consider several possibilities for the action of the neutral solutes and use linkage relations to convert the osmotic sensitivity of Hb into a measure of protein hydration change.

Within the solute concentration ranges used, no change in the visible spectrum of the protein is observed, indicating that neither direct competition between solute and O₂ nor the formation of hemi- or hemochrome derivatives, which occurs at higher solute concentration (11) and lower water activity (12), can explain the results shown in Fig. 1. Neither can changes in dimer-tetramer equilibrium. At 1 mM tetramer concentration, dimer concentration

is extremely low (13). Even at much lower concentrations, the tetramer-dimer equilibrium appears not to change with added sucrose (14).

The change in O₂ affinity reflects either direct interaction between the neutral solutes and the protein or changes in solution properties. One may think of different amounts of solute bound to each of the two forms of Hb or one may view the action of solute primarily through its effect on water activity and changes in protein hydration for the different conformational states.

To examine the possibility of direct solute interaction with the protein, we plotted, in Fig. 3, $\log[p_{50}/p_{50}^0]$ versus $\log[X]$, where $[X]$ is the molar solute concentration. This procedure is typical for analyzing data assuming only a change in direct solute binding. Unless there is strong cooperativity or very weak solute binding, the dependence of p_{50} on $\log[X]$ should be linear. It is not.

Still, if we force a linear fit to the data and apply the Wyman linkage relation, Eq. 5, then an approximate difference in aver-

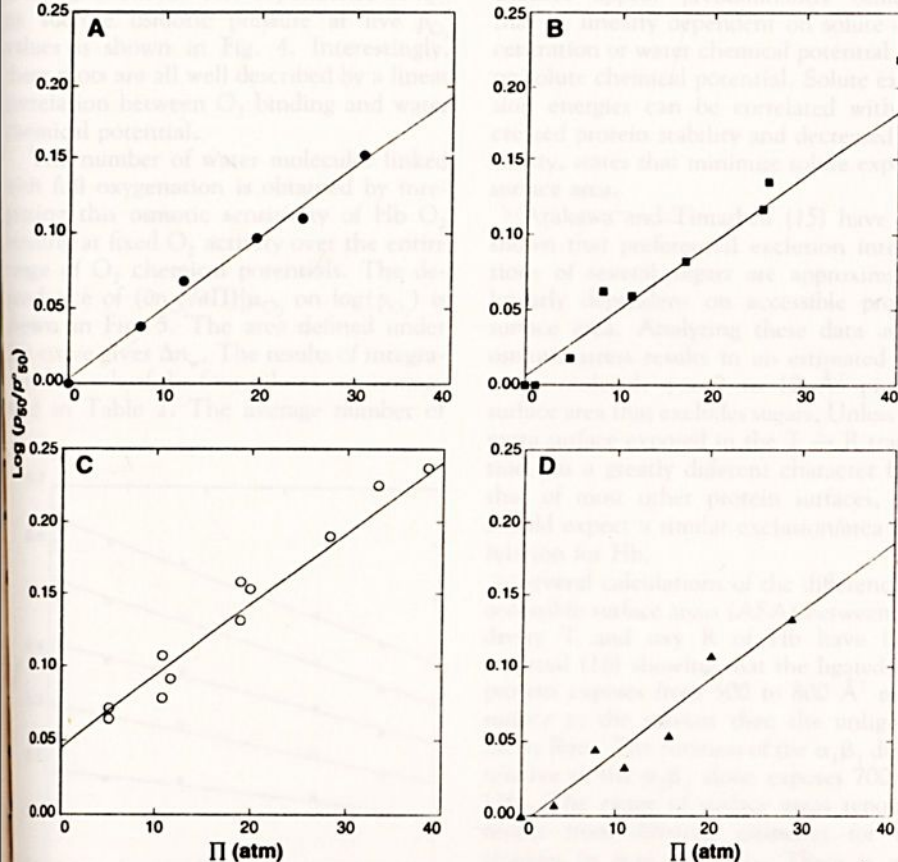


Fig. 2. The relative shift in p_{O_2} at half saturation, $\log(p_{50}/p_{50}^0)$, with increasing solute concentration is shown as dependent on solution osmotic pressure (Π) due to the action of different solutes: (A) sucrose, (B) stachyose, (C) PEG-150, and (D) PEG-400. The solid lines are the best nonlinear fits of the data with parameters shown in Table 1. The PEG-150 data does not extrapolate to p_{50}^0 at $\Pi = 0$. There is a shift in oxygen affinity that occurs at very low PEG-150 concentration. We do not know the origin of this. The slope of this plot, $d\log[p_{50}/p_{50}^0]/d\Pi$, however, is unaffected within the experimental error.

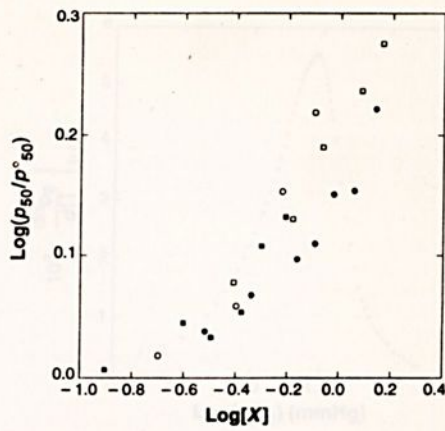


Fig. 3. The relative shift $\log(p_{50}/p_{50}^0)$ with increasing solute concentration is shown as dependent on solute activity, $\log(X)$, for sucrose ($\circ$), stachyose ($\bullet$), PEG-150 ($\square$), and PEG-400 ($\blacksquare$).

age number of bound solutes in the full oxy and full deoxy of $\Delta n_x = -1.0 \pm 0.3$ is found for all four solutes.

Superficially, this last result obtained assuming only solute binding could be considered quite reasonable. However, a closer look at the data and at the measured interaction energies between sugars or PEGs and protein surfaces makes this interpretation improbable. The linkage plots in Fig. 3 for all four solutes closely superimpose. Unlike the expected common water linkage curve in Fig. 2 for all solutes (to be considered further below), the common plot here means that binding characteristics are independent of the chemical nature of the solute. Not only must there be binding of the sugars and the PEGs, but also the binding characteristics, that is the number of sites, and binding constants, must be closely and improbably similar for polyol sugars and for polyether PEGs despite their very different chemical properties.

The indirect action of solute through water activity is tested by plotting the shift

Table 2. Change in the number of water molecules per tetramer of Hb from fully deoxy to fully oxy form as determined in different solvents.

Solute	$\Delta n_w \pm$ standard deviation determined from Eq. 5*	Δn_w determined by integrating Eq. (3)†
Sucrose	60 ± 3.2	76
Stachyose	56 ± 6.4	68
PEG-150	62 ± 4.8	60
PEG-400	60 ± 6.8	57
Mean value $\pm$ standard deviation	60 ± 2	65 ± 4

*Wyman equation. †Integration of Gibbs-Duhem equation.

in $\log(p_{50}/p_{50}^0)$ versus Π for all four solutes (Fig. 2). Here the plots are clearly linear, indicating a linkage to a well-defined and constant difference in number of bound waters. Slopes are the same for all four solutes (Table 1).

Differential hydration of the protein with no direct solute binding is sufficient to describe the suppression of O_2 uptake. The effect of the solute on O_2 affinity is indirect, acting through its effect on water activity.

From Eq. 5, the slope of the common line in Fig. 2 gives the difference in the number of bound water molecules between the R and T conformations, that is, the total number of waters acting as allosteric effectors. Values of $\Delta n_w = n_w^{oxy} - n_w^{deoxy}$ with standard deviations, from the Wyman linkage relation applied to the data for each solute, are summarized in Table 2. Averaging the Δn_w over the different solutes, we find $\Delta n_w = +60 \pm 2$ waters.

One finds essentially the same number of binding water molecules using Eq. 3 derived from the Gibbs-Duhem equation. The numerical evaluation of the partial derivative $(\partial \bar{n}_{O_2} / \partial \mu_w) |_{\mu_{O_2}}$ from the oxygenation data is straightforward. The dependence of $\bar{n}_{O_2}$ on sucrose osmotic pressure at five p_{O_2} values is shown in Fig. 4. Interestingly, these plots are all well described by a linear correlation between O_2 binding and water chemical potential.

The number of water molecules linked with full oxygenation is obtained by integrating this osmotic sensitivity of Hb O_2 binding at fixed O_2 activity over the entire range of O_2 chemical potentials. The dependence of $(\partial n_{O_2} / \partial \Pi) |_{\mu_{O_2}}$ on $\log(p_{O_2})$ is shown in Fig. 5. The area defined under this curve gives Δn_w . The results of integration for each of the four solutes are summarized in Table 2. The average number of

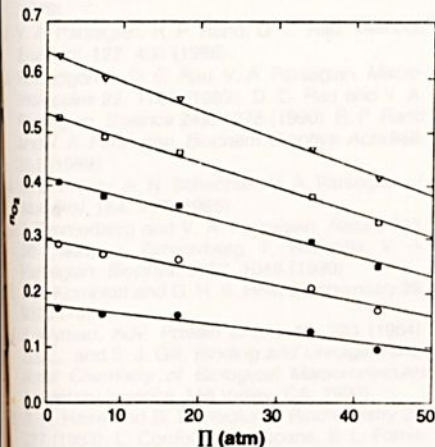


Fig. 4. The fraction of O_2 saturation, n_{O_2} , is shown as dependent on sucrose osmotic pressure shown for five p_{O_2} values: 7.2 (○), 11.2 (●), 15.2 (■), 19.2 (□), and 23.2 mmHg (▽). The slopes of the linear fits give $(dn_{O_2}/d\Pi) |_{\mu_{O_2}}$.

extra water molecules bound in the deoxy to full oxy transition calculated by this method is 65 ± 4 .

This value is somewhat larger ($\sim 10\%$) than that calculated with the Wyman equation from the sensitivity of p_{50} on osmotic pressure. The integration method, however, is more sensitive to small systematic errors in estimating Hb O_2 saturation and O_2 activities than the p_{50} method. The difference is probably not experimentally significant. There is also about the same difference in average Δn_w between the sugars and PEGs; again, the difference is comparatively small. In general, values of Δn_w estimated by the two methods agree quite well. The binding of some 50 to 70 extra water molecules is linked to the transition.

Arakawa and Timasheff (15) have directly measured the thermodynamics of sugar-protein and PEG-protein interactions for several different proteins with results pertinent to our observations. Sugars and PEGs are preferentially excluded from protein surfaces. In the range of sucrose concentrations examined here, the unfavorable interaction energies between sucrose and protein surfaces appear predominantly osmotic, that is, linearly dependent on solute concentration or water chemical potential, not on solute chemical potential. Solute exclusion energies can be correlated with increased protein stability and decreased solubility, states that minimize solute exposed surface area.

Arakawa and Timasheff (15) have also shown that preferential exclusion interactions of several sugars are approximately linearly dependent on accessible protein surface area. Analyzing these data as an osmotic stress results in an estimated one water molecule per 7 to 10 $\text{\AA}^2$ protein surface area that excludes sugars. Unless the extra surface exposed in the $T \rightarrow R$ transition has a greatly different character from that of most other protein surfaces, one should expect a similar exclusion/area correlation for Hb.

Several calculations of the difference in accessible surface areas (ASA) between the deoxy T and oxy R of Hb have been reported (16) showing that the ligated oxy protein exposes from 500 to 800 $\text{\AA}^2$ more surface to the solvent than the unligated deoxy form. The rotation of the $\alpha_1\beta_1$ dimer relative to the $\alpha_2\beta_2$ alone exposes 700 $\text{\AA}^2$ (16). The range of surface areas reported results from different estimates for the changes in $\alpha_1\alpha_2$ contacts. There is also considerable disagreement about the change in ASA along the highly flexible $\beta_1\beta_2$ interface. Considering only the more firmly established changes on $\alpha_1\alpha_2$ and $\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_2$ interfaces, and that one water molecule can cover about 9 to 10 $\text{\AA}^2$ of a surface, one finds that 55 to 90 water

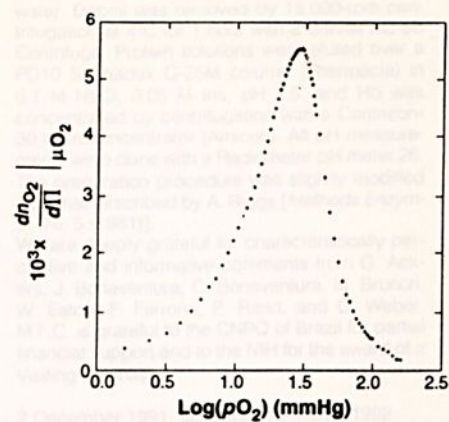


Fig. 5. The dependence of $(dn_{O_2}/d\Pi) |_{\mu_{O_2}}$ on log of partial pressure is shown. The area defined under this curve gives $(1/4) \Delta n_w \bar{v}_w / 2.303 RT$ (R , gas constant; T , temperature). The factor 4 accounts for the 4 oxygen bound per mole of Hb tetramer at full saturation.

molecules are necessary to hydrate the extra surface on oxy-Hb. The 60 water molecules we infer agree well with the estimated accessible surface area change.

There are two basic contributions of these 60 water molecules to the energy difference between T and R states. The energy from transferring these waters from bulk solution to the new protein surface of the R state is the osmotic work we measure. There is also the very large energy associated with the interaction energies of these water molecules with the protein surface. Transfer energies alone can be significant. Compared to pure water, the osmotic work for binding these 60 water molecules to the R state is about 0.2 kcal/mol Hb in a physiological medium (~ 0.28 osmol or some 6 atm). This 0.2 kcal/mol is an increase in allosteric energy of interaction due to the natural osmolyte concentration in the red cell.

Water formally acts as any allosteric ligand, but, unlike any other ligand, water is the only one that is always active. It is doubtful that the R state would even exist without the stabilization promoted by hydration of the extra surface. We are forced to recognize the importance of solvation in protein regulation.

From here we are led to think in several new directions. Recent measurements of forces acting between many biopolymers (3) show the importance of water structuring to macromolecular interactions. Can the enormous energies derived from these measured hydration forces now be connected with the solvation energies of protein surfaces that act in allostery? These hydration energies, perhaps acting to spread solvent-exposed surfaces, can be an excellent candidate for the delocalized energies postulated by Hopfield (17) to explain changes



in O₂ affinity without large changes in structure (18).

It is clear that thermodynamically/energetically significant waters of solvation are not equivalent to the much more tightly bound waters that can be seen by x-ray or neutron diffraction although these "visible" waters can be among those seen thermodynamically.

Intermediate states have been recently postulated for the R-T transition in Hb (19). Can the total 60 water molecules we measure be assigned to specific molecular events and the osmotic stress method able to recognize structural intermediates?

The action of other ligands must be reexamined to recognize their concomitant influence on water activity. Here we have only considered the two extreme cases: that there is only direct solute binding ($\Delta n_w = 0$) or only an indirect effect of solute on water binding ($\Delta n_x = 0$). Considering only water binding gives the best agreement between thermodynamic expectations and the experimental data for these solutes. A more general treatment for solutes that do bind as well as change water properties would include both direct and indirect actions. We will present elsewhere work re-analyzing the effect of Cl⁻ on Hb in terms of both water and ion binding (20).

Solvent influence on regulation of Hb-based artificial blood preparations can differ from that of the highly controlled intracellular milieu of erythrocytes. Water activity must be a consideration in system design.

Finally, one can see a unity between allosteric proteins and the several transport proteins (5, 6) where different functional states have measurably different levels of hydration.

REFERENCES AND NOTES

1. J. Baldwin and C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **129**, 175 (1979).
2. V. A. Parsegian, R. P. Rand, D. C. Rau, *Methods Enzymol.* **127**, 400 (1986).
3. R. Podgornik, D. C. Rau, V. A. Parsegian, *Macromolecules* **22**, 1780 (1989); D. C. Rau and V. A. Parsegian, *Science* **249**, 1278 (1990); R. P. Rand and V. A. Parsegian, *Biochem. Biophys. Acta* **988**, 351 (1989).
4. M. S. Prouty, A. N. Schechter, V. A. Parsegian, *J. Mol. Biol.* **184**, 517 (1985).
5. J. Zimmerberg and V. A. Parsegian, *Nature* **323**, 36 (1986); J. Zimmerberg, F. Bezanilla, V. A. Parsegian, *Biophys. J.* **57**, 1049 (1990).
6. J. A. Kornblatt and G. H. B. Hoa, *Biochemistry* **29**, 9370 (1990).
7. J. Wyman, *Adv. Protein Chem.* **19**, 223 (1964); — and S. J. Gill, *Binding and Linkage, Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science, Mill Valley, CA, 1990).
8. R. N. Haire and B. E. Hedlund, *Biochemistry* **22**, 327 (1983); L. Cordone, A. Cupane, S. L. Fornili, *Biopolymers* **22**, 1677 (1983).
9. E. Di Cera, *Biophys. Chem.* **37**, 147 (1990).
10. M. Blank, *Colloids Surf.* **1**, 139 (1980).
11. A. C. I. Anusiem, J. G. Beeststone, J. B. Kushimo, A. A. Oshodi, *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 138 (1976).
12. M. F. Colombo and R. Sanches, *Biophys. Chem.* **36**, 33 (1990).
13. F. C. Mills, M. L. Johnson, G. K. Ackers, *Biochemistry* **15**, 5350 (1976).
14. A. Brancaccio, A. Bellelli, M. Brunori, personal communication.
15. T. Arakawa and S. N. Timasheff, *Biochemistry* **21**, 6536 (1982).
16. C. Chothia, S. Wodak, J. Janin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 3793 (1976); J. Janin and S. J. Wodak, *Biopolymers* **24**, 509 (1985); A. M. Lesk, J. Janin, S. Wodak, C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **183**, 267 (1985).
17. J. J. Hopfield, *J. Mol. Biol.* **77**, 207 (1973).
18. M. Perutz, *Mechanism of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1990).
19. G. K. Ackers, *Biophys. Chem.* **37**, 371 (1990).
20. M. F. Colombo *et al.*, in preparation.
21. Human red cells were washed three times in isotonic salt solutions and lysed with distilled water. Debris was removed by 15,000-rpm centrifugation at 4°C for 1 hour with a Sorvall RC-5B Centrifuge. Protein solutions were eluted over a PD10 Sephadex G-25M column (Pharmacia) in 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris, pH 7.5, and Hb was concentrated by centrifugation with a Centricon-30 microconcentrator (Amicon). All pH measurements were done with a Radiometer pH meter 26. The preparation procedure was slightly modified from that described by A. Riggs [*Methods Enzymol.* **76**, 5 (1981)].
22. We are deeply grateful for characteristically perceptive and informative comments from G. Ackers, J. Bonaventura, C. Bonaventura, M. Brunori, W. Eaton, F. Ferrone, P. Rand, and G. Weber. M.F.C. is grateful to the CNPQ of Brazil for partial financial support and to the NIH for the award of a Visiting Scientist.

2 December 1991; accepted 10 March 1992



CAPÍTULO III

Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostherism

MARCIO F. COLOMBO^{1,2}, DONALD C. RAU³, AND V. ADRIAN PARSEGIAN^{1,2}

¹Division of Interfacial Research, National Institute of Technology and Chemistry and Kinetics Division, and ²Laboratory of Biophysical Biology, Division of General Research and Technology, National Institute of Health, Bethesda, MD 20892, and ³Department de Física, Instituto de Zoológico, Letras e Artes, Escola Universitária Estadual Paulista João Dornelles Filho, São José do Rio Preto, São Paulo, 13079-900, Brazil

Communicated by Charles Tanford, July 7, 1994

ABSTRACT We have measured hemoglobin oxygen uptake vs. the partial pressure of oxygen, with independently varied activities of chloride and water. This control is effected by combining different concentrations of NaCl and urea in the bathing solution to achieve, (i) water activities are varied and Cl⁻ activity was fixed, (ii) both water and Cl⁻ activities were varied with a traditional NaCl titration, or (iii) Cl⁻ activities were varied and water activity was fixed by using compensating urea. Within this analysis, the Cl⁻-regulated binding of four oxygens can be described by the action $Hb \cdot Cl^- + 4 O_2 + 8 H_2O \rightleftharpoons Hb \cdot 4O_2 \cdot 4H_2O + Cl^-$. The dissociation of a nearly integral chloride, rather than the integral 1.6 chlorides inferred earlier from simple salt ratios, demonstrates the need to recognize the potentially large contribution from changes in water activity when studying weakly binding solutes. The single-chloride result might imply structural considerations of the action of Cl⁻ in hemoglobin regulation.

Parte B

Marcio Francisco Colombo, Donald C. Rau e V. Adrian Parsegian

“Reevaluation of chloride’s regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostherism”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, pp. 10517-10520 (1994)

Using the “allosteric coupling affinity” Cl⁻ has long been a physiological salt. From oxygen binding and Cl⁻ ratios 1.6 chlorides bind to hemoglobin, although this stoichiometry is based on the x-ray structure of the oxygen affinity of the protein in the absence of a change of some 60–80 waters in protein hydration when hemoglobin goes from the deoxy-T state to the fully oxygenated R state. The water activity in physiological salt solutions is comparable to the water activities used both the control solutes that showed the contribution of protein hydration. Therefore, we now have reexamined the regulatory role of chloride, explicitly including changes in protein hydration and the dependence of water activity on added salt. We now find that an alternate description of the data has only single allosteric Cl⁻ ($\Delta n_{Cl^-} = -1.62 \pm 0.02$) directly linked with oxygenation during the deoxy-to-oxy transition, while only 43.3 ± 2.4 additional water molecules bind to the protein.

Most, perhaps all, weakly binding effectors such as chloride necessarily work at high enough concentrations that their presence also significantly changes the activity of water. The regulation of hemoglobin and other allosteric proteins must be reevaluated with regard to the activity of water and molecular hydration, as first anticipated by Tanford (7).

MATERIALS AND METHODS

Freshly drawn human blood was washed three times in isotonic salt solutions and the erythrocytes were then lysed

with distilled water. Debris was removed by centrifugation (Sorvall RC-5B, 27,000 $\times$ g for 1 h at 4°C). The resulting hemoglobin solution supernatants were then eluted over a PD-10 Sephadex G-25M (Pharmacia) column equilibrated with 0.1 M NaCl/0.02 M Tris-HCl, pH 7.2. The protein solution was next passed over an AG-501-X3 deionization column (Bio-Rad). Final hemoglobin solutions were concentrated by centrifugation with a Centricon-30 microconcentrator and buffered to pH 7.0 with 0.05 M NaH₂Po₄ acid.

Hemoglobin oxygen binding curves were measured at 25°C by using a Hem-O-Scan oxygen dissociation analyzer (SLM Aminco, Rochester, NY) as described (8). Hemoglobin samples were deoxygenated with a 5.0% CO₂/95.0% N₂ gas mixture and subsequently oxygenated with a 25% O₂/75.0% CO₂/0.4% N₂ mixture. The oxygen partial pressures at hemoglobin half-saturation (P₅₀ values) were determined from standard Hill plots.

Hemoglobin samples at fixed water activity and various

NaCl concentrations were prepared by adding NaCl to a solution of hemoglobin in a fixed volume of water. The NaCl concentration was varied by adding NaCl to a solution of hemoglobin in a fixed volume of water. The NaCl concentration was varied by adding NaCl to a solution of hemoglobin in a fixed volume of water.

THERMODYNAMIC ANALYSIS

The number of Cl⁻ ions allosterically coupled to hemoglobin oxygenation is typically extracted from the sensitivity of the P₅₀ value to Cl⁻ concentration by applying a standard Wyman linkage relation (7–9),

$$\frac{d(\ln P_{50})}{d(\ln [Cl^-])} = \frac{\Delta n_{Cl^-}}{\Delta n_{O_2}} \quad (1)$$

The slope of $\ln P_{50}$ vs. $\ln [Cl^-]$ gives the change in the number of Cl⁻ ions bound to the hemoglobin tetramer, Δn_{Cl^-} , linked to the binding of four oxygens, Δn_{O_2} , and to the transition from the deoxy-T to the oxy-R state. This straightforward interpretation assumes that the activities of all other “allosteric” solution components are held constant.

Changing the activity of one solution component, however, also changes the activity of water. Previously, we used the coupling of solute and water activities to show that water itself can be considered an allosteric ligand (6). We extracted an apparent change in hemoglobin water binding associated with oxygenation from the sensitivity of P₅₀ to water activity. The Wyman linkage relation coupling oxygen uptake and water activity is homologous to Eq. 1,

$$\frac{d(\ln P_{50})}{d(\ln a_w)} = \frac{\Delta n_w}{\Delta n_{O_2}} \quad (2)$$

Republication ahead of this article were delayed in part by page charge space. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.



Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: The neglected contribution of protein hydration in allostery

MARCIO F. COLOMBO*†, DONALD C. RAU*, AND V. ADRIAN PARSEGAN*‡

*Division of Intramural Research, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, and †Laboratory of Structural Biology, Division of Computer Research and Technology, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; and ‡Departamento de Física, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas—Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, São Jose do Rio Preto, São Paulo, 15.054-000, Brazil

Communicated by Charles Tanford, July 7, 1994

ABSTRACT We have measured hemoglobin oxygen uptake vs. the partial pressure of oxygen, with independently controlled activities of chloride and water. This control is effected by combining different concentrations of NaCl and sucrose in the bathing solution to achieve: (i) water activities were varied and Cl⁻ activity was fixed, (ii) both water and Cl⁻ activities were varied with a traditional NaCl titration, or (iii) Cl⁻ activities were varied and water activity was fixed by adding compensating sucrose. Within this analysis, the Cl⁻-regulated loading of four oxygens can be described by the reaction $\text{Hb-Cl}^- + 4 \text{O}_2 + 65 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Hb-4O}_2 \cdot 65\text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^-$. The dissociation of a neatly integral chloride, rather than the nonintegral 1.6 chlorides inferred earlier from simple salt titration, demonstrates the need to recognize the potentially large contribution from changes in water activity when titrating weakly binding solutes. The single-chloride result might simplify structural considerations of the action of Cl⁻ in hemoglobin regulation.

Among the "allosteric effectors" regulating hemoglobin oxygen affinity, Cl⁻ has long been known to have a significant physiological role. From *in vitro* studies of the relation between O₂ binding and Cl⁻ activity, it has been thought that some 1.6 chlorides bind to stabilize the deoxy or T form (1-4), although this stoichiometry is puzzling when one attempts to locate it on the x-ray structure (4, 5). We recently reported (6) that the oxygen affinity of hemoglobin correlates with water activity in the presence of several neutral solutes. We inferred a change of some 60-65 waters in protein hydration when hemoglobin goes from the deoxy T state to the fully oxygenated R state. The water activity in physiological salt solutions is comparable to the water activities used with the neutral solutes that showed the contribution of protein hydration. Therefore, we now have reexamined the regulatory action of chloride, explicitly including changes in protein hydration and the dependence of water activity on added salt. We now find that an alternate description of the data has only a single allosteric Cl⁻ ($\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1.02 \pm 0.02$) directly linked with oxygenation during the deoxy-to-oxy transition, while some 65.2 ± 2.4 additional water molecules bind to the protein.

Most, perhaps all, weakly binding effectors such as chloride necessarily work at high enough concentrations that their presence also significantly changes the activity of water. Ligand regulation of hemoglobin and other allosteric proteins should be reevaluated with regard to the activity of water and molecular hydration, as first anticipated by Tanford (7).

MATERIALS AND METHODS

Freshly drawn human blood was washed three times in isotonic salt solutions and the erythrocytes were then lysed

with distilled water. Debris was removed by centrifugation (Sorvall RC-5B, $27,000 \times g$ for 1 h at 4°C). The resulting hemoglobin solution supernatants were then eluted over a PD 10 Sephadex G-25M (Pharmacia) column equilibrated with 0.1 M NaCl/0.05 M Tris-HCl, pH 7.5. The protein solution was next passed over an AG-501-X8 deionization column (Bio-Rad). Final hemoglobin solutions were concentrated by centrifugation with a Centricon-30 microconcentrator and buffered to pH 7.0 with 0.05 M Bis-Tris-acetic acid.

Hemoglobin oxygen binding curves were measured at 25°C by using a Hem-O-Scan oxygen dissociation analyzer (SLM Aminco, Rochester, NY) as described (6). Hemoglobin samples were deoxygenated with a 5.6% CO₂/94.4% N₂ gas mixture and subsequently oxygenated with a 25% O₂/5.6% CO₂/69.4% N₂ mixture. The oxygen partial pressures at hemoglobin half-saturation (P₅₀ values) were determined from standard Hill plots.

Hemoglobin samples at fixed water activity and various Cl⁻ activities (a_w -constant) were prepared combining NaCl and an appropriate amount of sucrose (Ultrapure Grade, BRL) at each NaCl concentration. Sample osmolalities were measured with a vapor pressure osmometer (Wescor model 5100C, Logan, UT). When NaCl was titrated and water activity was allowed to vary with salt concentration (a_w -free), no sucrose was added.

THERMODYNAMIC ANALYSIS

The number of Cl⁻ ions allosterically coupled to hemoglobin oxygenation is typically extracted from the sensitivity of the P₅₀ value to Cl⁻ concentration by applying a standard Wyman linkage relation (7-9),

$$\frac{d(\ln P_{50})}{d(\ln [\text{Cl}^-])} = \frac{\Delta n_{\text{Cl}^-}}{\Delta n_{\text{O}_2}} \quad [1]$$

The slope of $\ln P_{50}$ vs. $\ln [\text{Cl}^-]$ gives the change in the number of Cl⁻ ions bound to the hemoglobin tetramer, Δn_{Cl^-} , linked to the binding of four oxygens, Δn_{O_2} , and to the transition from the deoxy-T to the oxy-R state. This straightforward interpretation assumes that the activities of all other "allosteric" solution components are held constant.

Changing the activity of one solution component, however, also changes the activity of water. Previously, we used this coupling of solute and water activities to show that water itself can be considered an allosteric ligand (6). We extracted an apparent change in hemoglobin water binding associated with oxygenation from the sensitivity of P₅₀ to water activity. The Wyman linkage relation coupling oxygen uptake and water activity is homologous to Eq. 1,

$$\frac{d(\ln P_{50})}{d(\ln a_w)} = \frac{\Delta n_w}{\Delta n_{\text{O}_2}} \quad [2]$$

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

In that earlier work, we used four neutral solutes (sucrose, stachyose, triethylene glycol, and 400-Da polyethylene glycol) as osmotic agents. We concluded that their action was better described as a function of the activity of water rather than as a function of direct solute-hemoglobin interaction (though both possibilities were quantitatively evaluated). Since the effect scaled as a function of water activity rather than solute type or concentration, it is also unlikely to be due to solute-specific changes in solution dielectric constant, as suggested by Bellelli *et al.* (10). On the strength of that previous analysis, therefore, we use the convention that there is no allosteric effect from direct binding of these solutes to hemoglobin.

Osmotic stress effects rely on an exclusion of solutes from waters hydrating macromolecules, either due to steric interactions (solutes are simply too large to penetrate water-filled cavities) or to repulsive chemical interactions with exposed surfaces [as reflected in the preferential interaction coefficients introduced by Timasheff (11)]. It is essential in osmotic stress studies to work with solutes not only of different sizes but also of different chemical natures to distinguish solute-independent osmotic effects from solute-specific binding and from solute-dependent exclusion from specific exposed surfaces.

Two methods can be used for now reevaluating the effect of Cl^- on hemoglobin oxygen binding that explicitly consider not only the allosteric action of direct Cl^- binding but also the effect of salt on water activity and the consequent allosteric action of water. In the a_w -constant method, as the Cl^- concentration is changed, sufficient sucrose is added to keep the water activity constant, (equaling that of the highest salt concentration used, 0.8 M NaCl). In this case, Eq. 1 is strictly applicable. Alternatively, in the a_w -free case, salt is added but the water chemical potential is not clamped by compensating sucrose. The data can be analyzed for changes in both Cl^- and water binding, however, by applying Gibbs-Duhem relations.

Changes in the chemical potential of hemoglobin (μ_{Hb}) can be related to changes in O_2 , Cl^- , and water chemical potentials, μ_{O_2} , μ_{Cl^-} , and μ_w , respectively, through the number of each allosteric species, n_{O_2} , n_{Cl^-} , and n_w , associated with the protein

$$-d\mu_{\text{Hb}} = +n_{\text{O}_2}d\mu_{\text{O}_2} + n_{\text{Cl}^-}d\mu_{\text{Cl}^-} + n_w d\mu_w. \quad [3]$$

The chemical potentials of oxygen and Cl^- are given by

$$d\mu_{\text{O}_2} = RT d(\ln \text{Po}_2)$$

$$d\mu_{\text{Cl}^-} = RT d(\ln \gamma[\text{NaCl}]) = RT \left\{ 1 + \frac{d(\ln \gamma)}{d(\ln[\text{NaCl}])} \right\} d(\ln[\text{NaCl}]). \quad [4]$$

We assume that both Na^+ and Cl^- contribute equally to the activity coefficient, γ , of NaCl. Over the range of salt concentrations we examine, $d(\ln \gamma)/d(\ln[\text{NaCl}])$ is almost constant (12), with $\Gamma = \{1 + d(\ln \gamma)/d(\ln[\text{NaCl}])\} = 0.937$ for molar salt concentration units.

Salt and water chemical potentials in the bulk solution are not independent but are coupled by another Gibbs-Duhem relation,

$$d\mu_w = -\left(\frac{x_{\text{NaCl}}}{x_w}\right)d\mu_{\text{NaCl}} = -RT\left(\frac{2\Gamma[\text{NaCl}]}{55.5}\right)d(\ln[\text{NaCl}]), \quad [5]$$

where x_{NaCl} and x_w are the mole fractions of salt and water, respectively. The protein and oxygen contributions to $d\mu_w$ have been omitted since x_{O_2} , $x_{\text{Hb}} \ll x_{\text{NaCl}} \ll x_w$.

Incorporating Eqs. 4 and 5 into Eq. 3, we have

$$-d\mu_{\text{Hb}} = RTn_{\text{O}_2}d(\ln \text{Po}_2)$$

$$+ RT(\Gamma n_{\text{Cl}^-} - \Phi n_w[\text{NaCl}])d(\ln[\text{NaCl}]), \quad [6]$$

where $\Phi = 2\Gamma/55.5 \approx 0.033$.

The change in bound oxygen with salt concentration is described by a Maxwell crossrelation,

$$\left. \frac{\partial n_{\text{O}_2}}{\partial(\ln[\text{NaCl}])} \right|_{\ln \text{Po}_2} = \left. \frac{\partial(\Gamma n_{\text{Cl}^-} - \Phi n_w[\text{NaCl}])}{\partial(\ln \text{Po}_2)} \right|_{\ln[\text{NaCl}]} \quad [7]$$

In practice, then, the observed sensitivity of oxygen binding to the solution NaCl concentration can be converted into the change in both chloride and water binding during oxygenation at constant salt activity. Transforming this equation into a standard linkage relation (8, 9) gives

$$\frac{d(\ln \text{P50})}{d(\ln[\text{NaCl}])} = \Gamma \frac{\Delta n_{\text{Cl}^-}}{\Delta n_{\text{O}_2}} - \Phi \frac{\Delta n_w[\text{NaCl}]}{\Delta n_{\text{O}_2}}, \quad [8]$$

where P50 is taken as the median ligand activity, p_m , defined in refs. 8 and 9. This equation, describing the coupling of both direct solute binding and osmotic effects, is analogous to one derived by Tanford (7) and applied by Haire and Hedlund (13) to the dependence of hemoglobin O_2 affinity on ethylene glycol concentration. Both $\Delta n_{\text{Cl}^-}(n_{\text{Cl}^{\text{oxy}}} - n_{\text{Cl}^{\text{deoxy}}})$ and $\Delta n_w(n_w^{\text{oxy}} - n_w^{\text{deoxy}})$ contribute to the slope $d(\ln \text{P50})/d(\ln[\text{NaCl}])$. By definition, Δn_{Cl^-} and Δn_w are changes in the numbers of bound Cl^- ions and water molecules associated with binding of four oxygens to hemoglobin, stabilizing one or the other form of the protein, and therefore, regulating oxygenation.

RESULTS

The change of $\ln \text{P50}$ with added salt is shown in Fig. 1 for the two cases: with water activity held constant and with water activity allowed to change with salt concentration. With fixed water activity (a_w -constant), the linear dependence of $\ln \text{P50}$ on Cl^- chemical potential implies a constant Δn_{Cl^-} over the salt concentration range examined. The slope, $d(\ln \text{P50})/d(\ln[\text{NaCl}])$, corresponds to the release of 1.06 ± 0.06 chlorides per hemoglobin tetramer in the transition from fully deoxygenated to fully oxygenated states. When the same equation is applied to the data with water activity allowed to vary with added salt (a_w -free), the average slope over the salt concentration range 0.05–0.8 M gives the previously inferred 1.6 chlorides per hemoglobin (1–4). The curvature in the plot has generally been interpreted to indicate that there are at least two allosteric chloride binding sites, one of which binds Cl^- only weakly.

The difference between the a_w -constant and the a_w -free Cl^- titration results reflects the potentially large contribution to the deoxy-T $\rightleftharpoons$ oxy-R transition from differences in the number of solute-excluding water molecules solvating the two states. If, in addition to differences in the number of Cl^- ions directly bound to the T and R states, salt also acts "osmotically" as do the neutral solutes investigated previously (6) so that salt too is excluded from hemoglobin-solvating water, then the a_w -constant experiment is the proper one for extracting the allosteric effect of direct Cl^- binding only. The a_w -free experiment would in this case probe not only changes in Cl^- binding but also changes in hemoglobin hydration, a situation corresponding to Eq. 8.

The best two-parameter fit of Eq. 8 to the a_w -free Cl^- titration data of Fig. 1 is shown in Fig. 2. The adjustable parameters Δn_{Cl^-} and Δn_w are assumed to be independent of chloride concentration. We find the curve is best described by $\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1.02 \pm 0.02$ and $\Delta n_w = +65 \pm 2.4$. The nonlinearity of the data is now seen to be a natural conse-

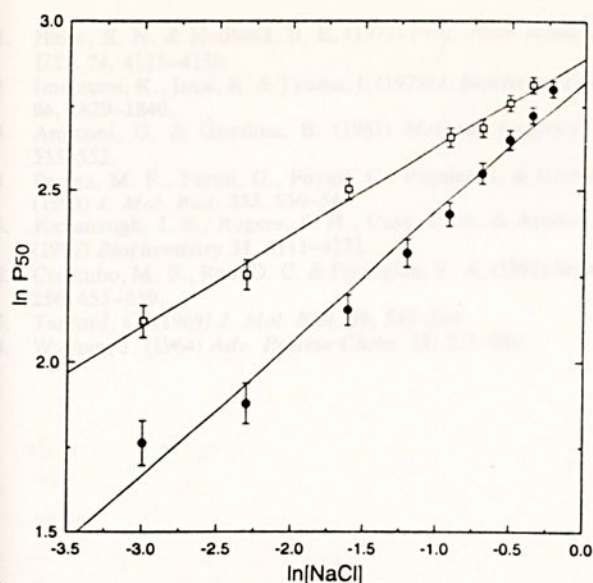


FIG. 1. Effect of chloride concentration on the oxygen partial pressure at half saturation of hemoglobin, P_{50} , is shown for two cases: a simple salt titration without controlling water activity and a salt titration under conditions of fixed water activity (●). Measurements were made in the usual way with water activity allowed to change freely with added salt. The best fitting straight line to the data gives an apparent release of 1.6 Cl^- per hemoglobin tetramer during the deoxy-to-oxy transition, in accord with earlier reports (1–4) (□). The activity of water was maintained at 1.50 ± 0.05 osmoles/kg of water by combining NaCl with an appropriate amount of sucrose. Osmotic pressures of sucrose and NaCl were found to be additive to within about 5%. The data points shown are the average of three sets of measurements. The slope here gives a release of only 1.06 ± 0.06 chloride ions associated with the fully deoxy T to fully oxy R state transition. Data sets at other constant water activities ranging from 1.0 to 1.5 osmoles/kg of water gave identical results.

quence of the nonlinear dependence of water chemical potential on $\ln[\text{NaCl}]$.

DISCUSSION

By recognizing changes in water activity, we are able to generate self-consistent results for changes in the numbers of Cl^- ions (Δn_{Cl^-}) and water molecules (Δn_w) during the deoxy-T $\rightleftharpoons$ oxy-R transition. From preparations with fixed Cl^- activity and varied water activity, we previously found $\Delta n_w = +60$ to 65 molecules of water per hemoglobin tetramer. Now, with water activity fixed and Cl^- activity varied, we find $\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1$ (Fig. 1). A separate nonlinear fit to data with both Cl^- and water activities allowed to vary closes the circle with $\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1$ and $\Delta n_w = +65$ per tetramer (Fig. 2). By recognizing the importance of water activity, one sees that about 40% of the previously inferred $\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1.6$ could actually reflect the association of an additional 65 waters. The energetics of binding this extra water with oxygenation depends on Cl^- concentration only indirectly, through the effect of added salt on water activity.

The changes in chloride and water binding we infer are differences in the association of these ligands to particular hemoglobin conformations. Given the sensitivity of protein structure and dynamics, in general, to ligand binding, we must emphasize that these results are strictly applicable only to the particular range of solution conditions (pH, NaCl concentration, CO_2 partial pressure, water activities, temperature, etc.) and hemoglobin species examined here. The method used to prepare the hemoglobin, for example, does not remove all organic phosphates. It has previously been observed that the chloride dependence of O_2 affinity is

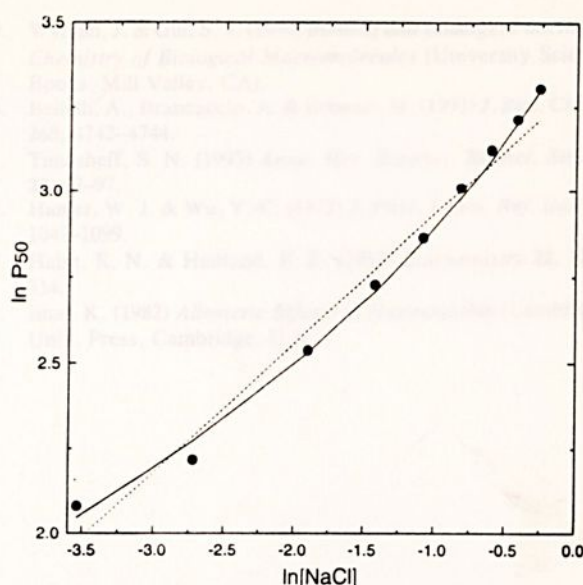


FIG. 2. Dependence of hemoglobin oxygenation to chloride concentration with water activity allowed to vary with salt concentration is well described by recognizing a contribution from changes in water binding. Each point is the average of four chloride titration experiments. The dotted line is the linear fit to the data used with Eq. 1 for calculating Δn_{Cl^-} neglecting the contribution from changes in water activity with added salt. The solid line is a nonlinear fit to the data using the integrated form of Eq. 8 that recognizes the concomitant change in water activity with chloride activity. The best fit to the data gives the changes in both Cl^- and water binding associated with the fully deoxy to fully oxy form transition. The change in bound chloride, $\Delta n_{\text{Cl}^-} = -1.02 \pm 0.02 \text{ Cl}^-$ per hemoglobin tetramer, agrees with that measured under conditions of constant water activity (shown in Fig. 1). The concomitant change in bound water is calculated as $\Delta n_w = +65.2 \pm 2.4 \text{ H}_2\text{O}$ molecules per hemoglobin tetramer, agreeing well with the hydration change measured by the application of neutral solutes (6).

sensitive to the binding of organic phosphates to hemoglobin (14). The osmotic sensitivity of O_2 binding might well also depend on the binding of organic phosphates.

It is conceivable that the osmotic equivalence of NaCl and neutral solutes is only a coincidence and that a different 65 water molecules exclude salt and sugar. It might even be that chloride is not acting osmotically at all, that the traditional weak Cl^- binding picture still holds, and that the constant-water-activity result is simply an additive effect of sucrose. It is possible that the apparent single extra bound chloride is really the aggregate of fractional chlorides at different mutually excluding sites that happen to add up to one or that it is reflecting differences in proximity of neutralizing chloride ions to positive hemoglobin charges in the central cavity in the two forms (4).

Nevertheless, there is now a pleasing possibility that the correlation of Hb oxygenation and hydration extends beyond the neutral solutes used previously and that many solutes as salt act osmotically on the T $\rightleftharpoons$ R transition. If this is true, then one must now reexamine the action of all weakly binding effectors to gauge the extent of their own activity rather than that of solvent water still so neglected in protein regulation.

We thank A. Arnone, W. Eaton, and M. Perutz for their valuable and perceptive comments. This work was supported in part by a grant from the Office of Naval Research (Grant N0014-91-F-0201). M.F.C. gratefully acknowledges support from Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Fundacao Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, and Conselho Nacional de Pesquisa Cientifica e Tecnologia.

1. Haire, R. N. & Hedlund, B. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4135-4138.
2. Imaizumi, K., Imai, K. & Tyuma, I. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 1829-1840.
3. Amiconi, G. & Giardina, B. (1981) *Methods Enzymol.* **76**, 533-552.
4. Perutz, M. F., Fermi, G., Poyart, C., Pagnier, J. & Kister, J. (1993) *J. Mol. Biol.* **233**, 536-545.
5. Kavanaugh, J. S., Rogers, P. H., Case, D. A. & Arnone, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 4111-4121.
6. Colombo, M. F., Rau, D. C. & Parsegian, V. A. (1992) *Science* **256**, 655-659.
7. Tanford, C. (1969) *J. Mol. Biol.* **39**, 539-544.
8. Wyman, J. (1964) *Adv. Protein Chem.* **19**, 223-286.
9. Wyman, J. & Gill, S. J. (1990) *Binding and Linkage, Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley, CA).
10. Bellelli, A., Brancaccio, A. & Brunori, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4742-4744.
11. Timasheff, S. N. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 67-97.
12. Hamer, W. J. & Wu, Y.-C. (1972) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1**, 1047-1099.
13. Haire, R. N. & Hedlund, B. E. (1983) *Biochemistry* **22**, 327-334.
14. Imai, K. (1982) *Allosteric Effects in Haemoglobin* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.).

Parte 2

Mario Francisco Colombo, Claudio D. Parilla & Jürgen

"The water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in
Water/Glucose and Water/Glycerol Solution"

The Journal of Biological Chemistry 271, pp. 4883-4892 (1996)

CAPÍTULO III

"The water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water Glycine Solutions"

The Journal of Biological Chemistry **271**, pp. 4895-4899 (1996)

Parte C

Marcio Francisco Colombo, Gustavo O. Bonilla-Rodrigues

Marcio Francisco Colombo and Gustavo O. Bonilla-Rodrigues

From the Departamento de Física, Instituto de Física de São Carlos, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, 13271-900, Brazil

We have previously proposed a role of hydration in the allosteric control of hemoglobin based on the effect of varying concentrations of polyols and polyethers on human hemoglobin oxygen affinity and on the solution water activity (Colombo, M. F., Rau, D. C., and Persson, V. A. (1992) *Science* **258**, 655-659). Here, the original analyses are extended to test the possibility of concomitant solute and water allosteric binding and by introducing the bulk dielectric constant as a variable in our experiments.

We present data which indicate that glycine and glucose influence Hb's oxygen affinity to the same extent, despite the fact that glycine increases and glucose decreases the bulk dielectric constant of the solution. Furthermore, we derive an equation linking changes in oxygen affinity to changes in differential solute and water binding to test critically the possibility of neutral-solute allosteric binding. Applied to the data, these results support our original proposition that neutral solutes act indirectly on the regulation of allosteric control of hemoglobin by water in solution. This is in agreement with the differences between Hb's allosteric regulation in their different

effect of water activity on the R to T allosteric equilibrium (4). In our former studies of the effect of water activity on Hb's binding properties, we have used chemically different solutes like sucrose, starches, and polyethylene glycols to distinguish solute from water binding to Hb (1). Solute binding influences, for an indirect effect, of solutes through water on the steady-state R to T allosteric equilibrium, we have also determined quantitatively the solvation effect on Hb allosteric transition in terms of the differential number of water molecules bound between the two extreme conformations of Hb. By using two different model approaches, the Wyman linkage equation or the Hill-Schulze equation, we found that 65-72¹ water molecules are linked to the binding of four oxygen molecules to human Hb under the experimental conditions used. Furthermore, this solvation change was found to be in agreement with the difference between the solvent-accessible surface areas of R and T state Hb computed from x-ray structures by Glick et al. (2, 3).

The experimental approach and analyses originally used by us to probe the effect of water on the allosteric regulation of hemoglobin by other biochemical factors (4) have been recently challenged. It has been reported that sucrose has no effect on the energy of iron Hb's oxygen binding (15). In addition, it was shown that 1-4% sucrose causes increased dissociation of human Hb (16) was changed, as measured by flash photolysis. In contrast to our proposition, these results were interpreted by the same authors in terms of solute-specific differential binding to Hb, i.e., that sucrose acts as a weak allosteric effector or, alternatively, that the change in the oxygen affinity of Hb is due to the decreased dielectric constant of the water-sucrose solution as compared to pure water.

In this report, we consider these two proposed hypotheses. Initially, to assess a possible role of bulk dielectric constant on the allosteric regulation of hemoglobin by water, we have used solutes which have been interpreted as a solvent effect and have been used by several authors to measure the apparent number of water molecules involved in biochemical reactions.

However, the proposed role for water in allosteric control has been recently challenged with results which indicate that sucrose has no effect on the energy of iron Hb's oxygen binding (15). In addition, it was shown that 1-4% sucrose causes increased dissociation of human Hb (16) was changed, as measured by flash photolysis. In contrast to our proposition, these results were interpreted by the same authors in terms of solute-specific differential binding to Hb, i.e., that sucrose acts as a weak allosteric effector or, alternatively, that the change in the oxygen affinity of Hb is due to the decreased dielectric constant of the water-sucrose solution as compared to pure water.

In this report, we consider these two proposed hypotheses. Initially, to assess a possible role of bulk dielectric constant on the allosteric regulation of hemoglobin by water, we have used solutes which have been interpreted as a solvent effect and have been used by several authors to measure the apparent number of water molecules involved in biochemical reactions.

In our former estimation of the number of allosteric water molecules bound to Hb due to oxygenation, we had neglected changes in solute pressure or changes in the chemical potential of water at the temperature of 37.3¹ Kelvin degrees, which resulted in 60-65 water molecules. Here, we present the corrected number using the actual temperature at which the previous measurements were carried out.

4895



The Water Effect on Allosteric Regulation of Hemoglobin Probed in Water/Glucose and Water/Glycine Solutions*

(Received for publication, June 19, 1995)

Marcio Francisco Colombo† and Gustavo O. Bonilla-Rodriguez§

From the Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo State, CEP 15054-000, Brazil

We have previously proposed a role of hydration in the allosteric control of hemoglobin based on the effect of varying concentrations of polyols and polyethers on the human hemoglobin oxygen affinity and on the solution water activity (Colombo, M. F., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1992) *Science* 256, 655-659). Here, the original analyses are extended to test the possibility of concomitant solute and water allosteric binding and by introducing the bulk dielectric constant as a variable in our experiments.

We present data which indicate that glycine and glucose influence HbA oxygen affinity to the same extent, despite the fact that glycine increases and glucose decreases the bulk dielectric constant of the solution. Furthermore, we derive an equation linking changes in oxygen affinity to changes in differential solute and water binding to test critically the possibility of neutral solute heterotropic binding. Applied to the data, these analyses support our original interpretation that neutral solutes act indirectly on the regulation of allosteric behavior of hemoglobin by varying the chemical potential of water in solution. This leads to a displacement of the equilibrium between Hb conformational states in proportion to their differential hydration.

It is well established that differential water binding occurs between distinct conformations of a protein. Hence, whether or not differential water binding contributes to the energetic of protein reactions, as some ions and metabolites do, is a key question to fully comprehend the mechanism of biological control. The role of water on allosteric regulation had been previously investigated, using Hb oxygenation as a model, by the so-called osmotic stress method (1, 2). The concept of this method is to use solutes, which are potentially excluded from the protein surface, to set the bulk water activity a_w (3). Haire and Hedlund (4), using ethylene glycol, observed that at a low concentration range ethylene glycol decreases Hb oxygen affinity while at a higher concentration causes the opposite effect. They interpreted these results as reflecting preferential binding of ethylene glycol to Hb at the low solute concentration range, whereas, at high ethylene glycol concentration range, the increased O₂ binding affinity of Hb was attributed to an

effect of water activity on the R to T allosteric equilibrium (4). In our former studies of the effect of water activity on Hb O₂ binding properties, we have used chemically different solutes like sucrose, stachyose, and polyethylene glycols to distinguish solute from water binding to Hb (1). Besides finding evidences for an indirect effect of solutes through water on the deoxy- to oxy-Hb conformational equilibrium, we have also determined quantitatively this solvation effect on Hb allosteric transition in terms of the differential number of water molecules bound between the two extreme conformations of Hb. By using two different model approaches, the Wyman linkage equation or the Gibbs Duhem equation, we found that 65-72¹ water molecules are linked to the binding of four oxygen molecules to human Hb under the experimental conditions used. Furthermore, this hydration change was found to be in agreement with the difference between the solvent-accessible surface areas of deoxy- and oxy-Hb computed from x-ray structures by Clothia *et al.* (5, 6).

The experimental approach and analyses originally used by us to assess and quantify the role of water on the allosteric control of Hb have been tested in several other biochemical systems (7-14). A standard linear dependence of equilibrium and kinetic free energy parameters on water activity rather than solute activity has been lately reported. It has been also found that this phenomenon is independent of the nature of the solute used to set the chemical potential of water. However, it can be dependent on solute size for certain processes used to set the chemical potential of water, μ_w (11-14). In parallel with our work, these solute effects have been interpreted as a solvation effect and have been used by several authors to measure the apparent number of water molecules involved in biochemical reactions.

However, the proposed role for water in allosteric control has been recently challenged with results which indicate that sucrose has no effect on the energy of trout Hb-I oxygen binding (15). In addition, it was shown that 1.45 M sucrose causes increased dissociation of human Hb-CO into dimers, as measured by flash photolysis. In contrast to our proposition, these results were interpreted by the same authors in terms of solute-specific differential binding to Hb, *i.e.* that sucrose acts as a weak allosteric effector or, alternatively, that the change in the oxygen affinity of Hb is due to the decreased dielectric constant of the water/sucrose solution as compared to pure water.

In this report, we consider these two proposed hypothesis. Initially, to assess a possible role of bulk dielectric constant on

*This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Brazil). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

†To whom correspondence should be addressed: Depto. de Física, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, São José do Rio Preto, S.P. CEP 15054-000, Brazil. Tel.: 55-0172-244966 (ext. 59); Fax: 55-0172-248692; E-mail: marcio@ibilce.unesp.br.

§Recipient of a CNPq postdoctoral fellowship.

¹In our former calculation of the number of allosteric water molecules bound to the Hb due to oxygenation, we had converted changes in osmotic pressures to changes in the chemical potential of water at the temperature of 273.2 Kelvin degrees, which resulted in 60-65 water molecules. Here, we present the corrected number using the actual temperature at which the previous measurements were carried out.

the allosteric control of Hb, we present oxygen binding experiments with human Hb in the presence of either glycine or glucose. These solutes cause opposite changes in the bulk dielectric constant of the solution. To evaluate the hypothesis of direct allosteric solute binding, we treat our data with an extended linkage equation that accounts for the global effect of changes in the differential binding of solute and of water molecules to Hb on oxygen binding. This equation, which is developed here in detail, has recently been applied to re-analyze the effect of chloride ions in human Hb (16), where it proved to be appropriate to quantify coupled anion and water heterotropic binding to Hb. Similar equations, as the one proposed by Tanford (17) to account hydration effects on ligand binding, have been applied to analyze the effect of water differential binding on the free energy of binding of lac-rep to DNA (18) and charged peptides to synthetic polynucleotides studied at varying salt concentrations (19).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Procedures—Blood was collected from healthy non-smoking adults by vein puncture using heparinized syringes. All subsequent steps were performed at 4 °C. pH measurements were made at 23 °C with a Corning model 350 pH meter. Red blood cells were washed four times in 10 volumes of cold buffered (50 mM Tris-HCl, pH 7.6) 0.9% saline containing 1 mM EDTA. The packed red blood cells were lysed with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 1 mM EDTA and dialyzed twice against 4 liters of the same buffer. Cellular debris was removed by centrifugation (20,000 × *g* for 30 min). HbA₀ was purified on DEAE-Sephadex following the procedure of Williams and Tsay (20), and purity was checked by electrophoresis on cellulose acetate. The purified hemoglobin was further stripped of organic and inorganic ions by several passages through a Dowex AG 501-X8(D) column (Bio-Rad). The concentration was raised to about 8.5 mM heme using Amicon concentrators and stored in liquid nitrogen until use.

Oxygen binding experiments were performed with 60 μM (heme) hemoglobin solutions in 50 mM bis-Tris acetate buffer, pH 7.0, at room temperature by the tonometric method (21, 22). The functional parameters P_{50} (O₂ partial pressure at half saturation) and cooperativity (n_{50}) were calculated from the Hill Plot by linear regression around half saturation. P'_{50} represents P_{50} obtained in the absence of neutral solutes. Hemoglobin and methemoglobin (Hb⁺) concentrations were estimated using the extinction coefficients of Benesch *et al.* (23). At the end of the experiments, Hb⁺ concentration was below 5%.

The solution osmolalities (Osm) of Hb samples were determined from freezing point depression measurements using a Osmette A model 5002 osmometer (Precision Systems, Inc.) after O₂-binding experiments. The logarithm of water activity was then obtained through the following relation:

$$\ln a_w = \frac{\Delta}{K_f M_w} = \frac{-\text{Osm}}{M_w} \quad (\text{Eq. 1})$$

where Δ is the freezing point depression, $K_f = 1.86$ K Kg mol⁻¹ is the cryoscopic constant, and M_w is the molarity of pure water (24).

Thermodynamic Analysis of the Linkage between either Oxygen and Solute or Oxygen and Water Binding to Hemoglobin—The effect of a single heterotropic ligand *X* coupled with Hb oxygenation is typically analyzed with the Wyman linkage equation (25, 26),

$$\frac{d \ln P_{50}}{d \ln a_X} = - \frac{\Delta n_X}{4} = - (n_X^{\text{oxy}} - n_X^{\text{deoxy}}) \quad (\text{Eq. 2})$$

from the sensitivity of P_{50} , the oxygen pressure at Hb half saturation, on a_X , the activity of *X*. Therefore, the slope of $\ln P_{50}$ versus $\ln a_X$ gives the difference in the number of *X* bound to oxy and deoxy structures of Hb, Δn_X . This analysis is strictly correct when only the activity of a single heterotropic ligand varies, *i.e.* the activity of any other heterotropic ligand than *X* present in the solution, a_i , is maintained constant. In our previous analysis of the effect of neutral solutes on Hb binding characteristics using Equation 2, we considered two extreme cases: (i) direct solute binding only or (ii) considering only the indirect effect of solute on water activity (1). We made the distinction between these two cases using different solutes and found a common dependence of $\ln P_{50}$ on $\ln a_w$, with a_w adjusted using sucrose, stachyose, or polyethylene glycols. This independence on the different chemical natures of the

solutes supported the assumption of the exclusion of these solutes from protein hydration water and from any specific interaction with deoxy or oxy Hb structure.

Thermodynamic Analysis of the Linkage between Oxygen, Solute, and Water Binding to Hemoglobin—To derive a more general linkage equation to couple solute, water, and oxygen binding to hemoglobin, we recognize that the solution activities of water, a_w , and of solute, a_s , are not thermodynamically independent quantities; they are connected by the Gibbs-Duhem equation that, applied to a solution of m_s moles of solute per kg of water, is given by

$$55.51 d \ln a_w + m_s d \ln a_s = 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

even in a presence of tens of micromolar of protein. Another Gibbs-Duhem relationship, the one including protein, can be also used to correctly describe changes in the chemical potential of a protein due to ligand binding (17, 27). Specifically, at constant temperature and hydrostatic pressure, the effect of O₂, water, and solute binding on Hb chemical potential, $d\mu_p$, is given by the following:

$$- \frac{d \mu_p}{RT} = n_{O_2} d \ln pO_2 + n_s d \ln a_s + n_w d \ln a_w \quad (\text{Eq. 4})$$

where n_i accounts for the number of each of these ligands bound to Hb and $d\mu_p$ for the change in their chemical potentials (1, 16). Combining Equations 3 and 4, we obtain the following:

$$- \frac{d \mu_p}{RT} = [n_{O_2}] d \ln pO_2 + \left[\left(- \frac{55.51 n_s}{m_s} + n_w \right) \right] d \ln a_w \quad (\text{Eq. 5})$$

enabling us to write the following Maxwell relation:

$$\frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_w} \Big|_{pO_2} = - \frac{55.51}{m_s} \frac{\partial n_s}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} + \frac{\partial n_w}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} \quad (\text{Eq. 6})$$

which correlates the measured change in O₂ saturation due to changes in a_w at fixed oxygen partial pressure with changes in solute and water saturation due to changes in pO_2 at constant a_w . If Hb oxygen affinity depends solely on either n_s or n_w , it is possible to integrate this equation over the saturation isotherm to determine the differential binding of either n_s or n_w (1).

However, to quantify the concomitant binding of solute and water, Equation 6 has to be rearranged. We start re-writing

$$\frac{\partial n_s}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} \quad (\text{Eq. 7})$$

as

$$\frac{\partial n_s}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} = \frac{\partial n_s}{\partial n_{O_2}} \Big|_{a_w} \cdot \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} \quad (\text{Eq. 8})$$

Since n_{O_2} depends only on pO_2 and a_w , $n_{O_2} = n_{O_2}(pO_2, a_w)$, we take its differential at constant n_{O_2} , which rearranged gives

$$\frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln a_w} \Big|_{pO_2} = - \frac{\partial n_{O_2}}{\partial \ln pO_2} \Big|_{a_w} \cdot \frac{d \ln pO_2}{d \ln a_w} \Big|_{n_{O_2}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Inserting Equations 8 and 9 into Equation 6 produces the following:

$$\frac{\partial \ln pO_2}{\partial \ln a_w} \Big|_{n_{O_2}} = \frac{55.51}{m_s} \cdot \frac{\partial n_s}{\partial n_{O_2}} \Big|_{a_w} - \frac{\partial n_w}{\partial n_{O_2}} \Big|_{a_w} \quad (\text{Eq. 10})$$

Integrating Equation 10 from fully deoxygenated to fully oxygenated state of Hb, following Wyman and his definition of the median ligand activity, P_m (25, 26), we find the relationship we have used to analyze concomitant changes in solute and water binding upon allosteric regulation, as shown in the following example:

$$\frac{d \ln P_m}{d \ln a_w} \Big|_{n_{O_2}} = 4 \left[\frac{55.51}{m_s} \cdot \Delta n_s - \Delta n_w \right] \quad (\text{Eq. 11})$$

Thus, the slope of a plot $\ln P_m$ (or to a good approximation $\ln P_{50}$, the logarithm of the oxygen pressure at half saturation) versus $\ln a_w$, reflects the apparent difference in the number of solute and water molecules (Δn_s and Δn_w , respectively) bound to the fully oxygenated and fully deoxygenated hemoglobin molecules. These same results can be obtained from the plot of $\ln P_{50}$ versus $\ln a_s$, as a consequence of the interdependence of $d \ln a_w$ and $d \ln a_s$ expressed by Equation 3. In such a case, Equation 11 becomes the following:

$$\frac{d \ln P_m}{d \ln a_w} = 4 \left[-d \Delta n_s + \frac{m_s}{55.5} d \Delta n_w \right] \quad (\text{Eq. 12})$$

Tanford (17) has originally derived an equation similar to this starting from the definition of the equilibrium constants for ligand and water binding to a macromolecule.

RESULTS

The effect of glucose and glycine on Hb oxygen affinity in 50 mM bis-Tris/acetate, pH 7.0, expressed as $\ln(P_{50}/P'_{50})$, is presented in Figs. 1–3 representing three distinct linkage plots.

First, we considered a linkage between O_2 and heterotropic water binding by plotting $\ln(P_{50}/P'_{50})$ versus $\ln(a_w)$, the logarithm of water activity varying glucose (Fig. 1A) and glycine (Fig. 1B), both in a Cl^- -free buffer solution. Measurements carried out with Hb in the presence of 0.1 M NaCl and glucose are shown in Fig. 1C. We also measured the effect of glycine with Hb in a buffer containing 0.1 M NaCl (data not shown). The observed effect on $\ln(P_{50}/P'_{50})$ was in this case much smaller than that shown in Fig. 1B, measured also with glycine but in the absence of Cl^- . This effect is probably caused by a decrease on the activity coefficient of ion chloride with added glycine (27).

The plots in Fig. 1, A–C, show that $\ln(P_{50}/P'_{50})$ varies linearly with changes in the chemical potential of water, in agreement with our previous report on the effect of sucrose, polyethylene glycols, and stachyose on Hb O_2 affinity (1). Following the Wyman linkage equation (Equation 1), the rate of change of $\ln(P_{50}/P'_{50})$ on $\ln(a_w)$ gives the apparent number of water molecules (Δn_w) involved with the allosteric transition from the fully deoxygenated to fully oxygenated state of Hb. The measured hydration change for each set of data is shown in the third column of Table I and appears to be constant within the experimental error and independent of the chemical differences between glycine and glucose.

Fig. 2 illustrates the same data shown in Fig. 1, A–C, plotted as a function of the logarithm of solution osmolality, a quantity which is directly proportional to the solute activity. In such a case, the analyses of these plots based only on the Wyman linkage equation (Equation 1) could be interpreted as reporting a weak allosteric solute binding since we assume no energetic contribution from water differential binding promoted by the indirect effect of solutes on the chemical potential of water. However, these data can be better analyzed by the extended linkage Equation 12, which avoids any assumption about binding identity (water, solute, or both). This allows us to quantify the separated contribution of solute and water binding to the regulation of O_2 binding to Hb. The continuous lines drawn in Fig. 2, A–C, represent the best fit of the data to Equation 12. The adjusted parameters Δn_w and Δn_s , the heterotropic contribution of solute and water binding to the control of Hb oxygenation, respectively, are also shown in Table I.

We have further analyzed the correlation between changes in O_2 affinity and changes in dielectric constants. In Fig. 3, we plotted the free energy change of oxygenation (expressed as $\ln P_{50}$) as a function of the solution bulk dielectric constant with increasing glycine (27) and glucose (28) concentrations. As seen in Fig. 3, the Hb- O_2 affinity cannot be attributed to electrostatic differences between R and T Hb conformations, since the changes in $\ln P_{50}$ are in opposite directions for changes in dielectric constant below and above its value in pure water. Clearly, the dielectric hypothesis can be ruled out on the basis of these experiments.

DISCUSSION

The data shown in Figs. 1–3 clearly resolve part of the controversy raised by Bellelli *et al.* (15), who have challenged our interpretation of the effect of neutral solutes on Hb oxy-

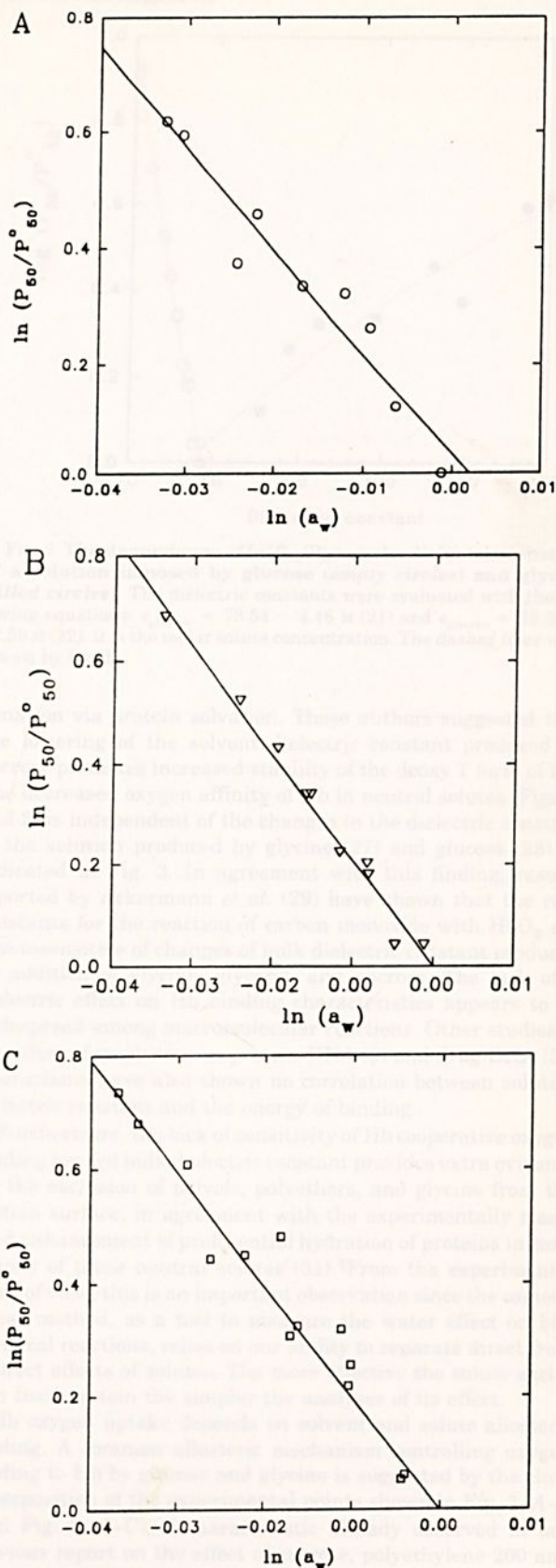


FIG. 1. Relative shift in P_{50} , $\ln(P_{50}/P'_{50})$ as a dependent on solution water activity (a_w) at different conditions (glycine (A), glucose (B), and glucose in the presence of 0.1 M sodium chloride (C)). The straight lines are a linear fit of the data using the integrated form of Wyman linkage equation (Equation 2). We subtracted buffer contribution from the measured osmolality. Experimental conditions: 50 mM bis-Tris acetate buffer, room temperature.

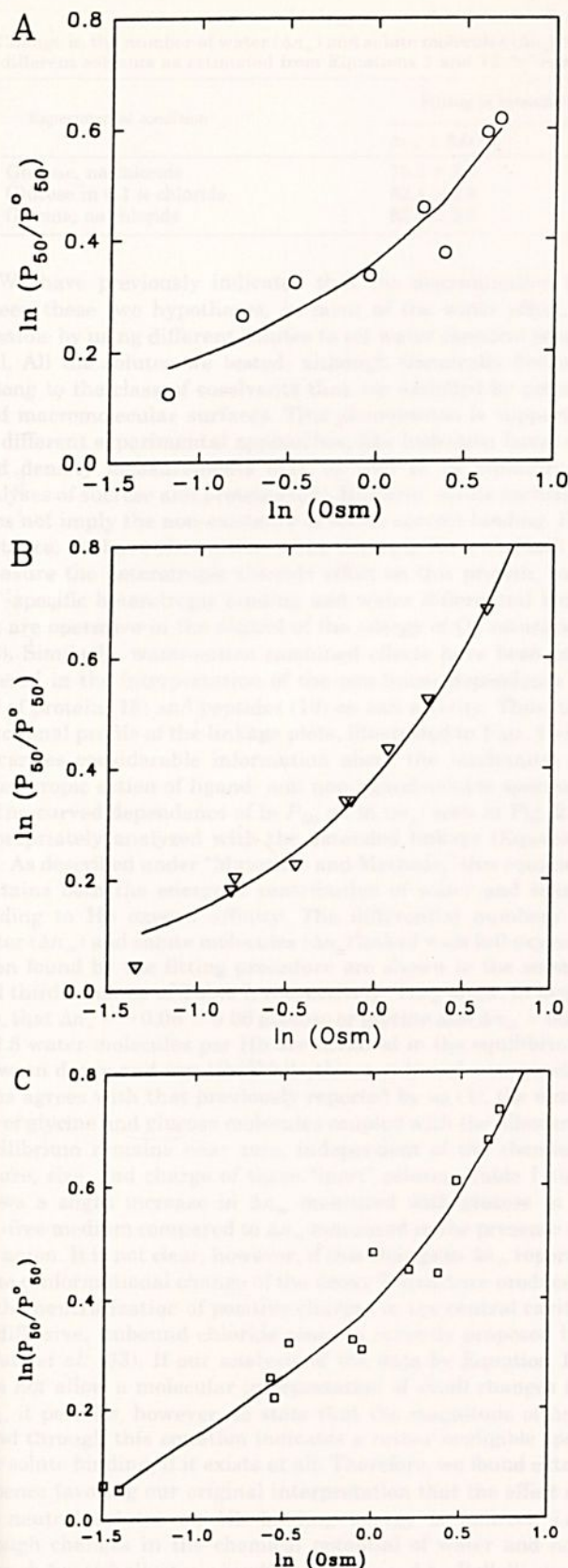


FIG. 2. Relative shift in P_{50} with increasing solute osmolality for glycine (A), glucose (B), and glucose in the presence of 0.1 M NaCl (C). The solid lines are a nonlinear fit of the data using the integrated form of the extended linkage equation (Equation 12). Experimental conditions: 50 mM bis-Tris acetate buffer, room temperature.

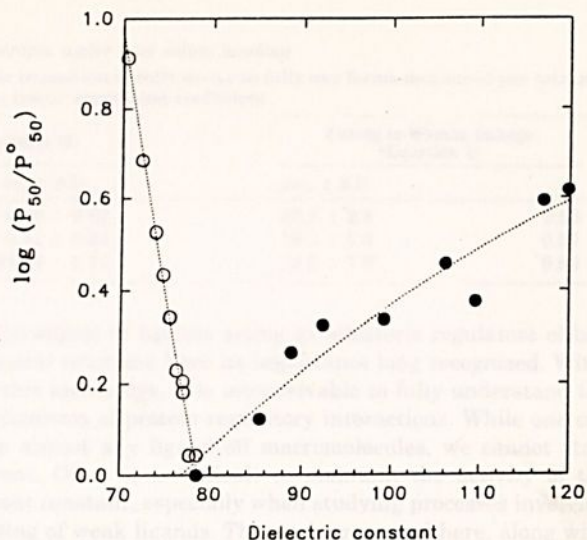


FIG. 3. The dependence of $\ln(P_{50}/P_{50}^0)$ on the dielectric constant of a solution imposed by glucose (empty circles) and glycine (filled circles). The dielectric constants were evaluated with the following equations: $\epsilon_{\text{glucose}} = 78.54 - 4.46 M$ (21) and $\epsilon_{\text{glycine}} = 78.54 + 22.58 M$ (22). M is the molar solute concentration. The dashed lines were drawn by hand.

genation via protein solvation. These authors suggested that the lowering of the solvent dielectric constant produced by sucrose promotes increased stability of the deoxy T form of Hb. The decreased oxygen affinity of Hb in neutral solutes (Figs. 1 and 2) is independent of the changes in the dielectric constant of the solution produced by glycine (27) and glucose (28) as indicated in Fig. 3. In agreement with this finding, results reported by Ackermann *et al.* (29) have shown that the rate constants for the reaction of carbon monoxide with HbO_2 are also insensitive of changes of bulk dielectric constant produced by addition of glycine, glycerol, and sucrose. The lack of a dielectric effect on Hb binding characteristics appears to be widespread among macromolecular reactions. Other studies of the effect of cosolvents on protein-DNA (9) and drug-DNA (30) interactions have also shown no correlation between solution dielectric constant and the energy of binding.

Furthermore, the lack of sensitivity of Hb cooperative oxygen binding toward bulk dielectric constant provides extra evidence for the exclusion of polyols, polyethers, and glycine from the protein surface, in agreement with the experimentally measured enhancement of preferential hydration of proteins in cosolutions of these neutral solutes (31). From the experimental point of view, this is an important observation since the osmotic stress method, as a tool to measure the water effect on biochemical reactions, relies on our ability to separate direct from indirect effects of solutes. The more effective the solute exclusion from protein the simpler the analyses of its effect.

Hb oxygen uptake depends on solvent and solute allosteric binding. A common allosteric mechanism controlling oxygen binding to Hb by glucose and glycine is suggested by the close superposition of the experimental points shown in Fig. 1, A-C (and Fig. 2, A-C), a characteristic already observed in our previous report on the effect of sucrose, polyethylene 200 and 400, and stachyose Hb affinity (1). These plots analyzed with the traditional Wyman linkage equation (Equation 1) offer two distinct interpretations of the effect of solutes on O_2 uptake: (a) Fig. 1 indicates the role of water, linking a fixed differential change in hydration between the structures of the fully oxygenated and fully deoxygenated state of Hb with oxygen affinity; (b) Fig. 2 indicates an identical heterotropic binding of glucose and glycine, despite their different chemical structures.

TABLE I
Linkage parameters between O_2 and heterotropic water and solute binding

Change in the number of water (Δn_w) and solute molecules (Δn_s) $\pm$ S.D. in the transition of fully deoxy to fully oxy forms measured per tetramer in different solvents as estimated from Equations 1 and 12. "r" represents the linear regression coefficient.

Experimental condition	Fitting to extended linkage (Equation 12)		Fitting to Wyman linkage (Equation 1)	
	$\Delta n_w \pm$ S.D.	$\Delta n_s \pm$ S.D.	$\Delta n_w \pm$ S.D.	r
Glucose, no chloride	75.2 $\pm$ 1.6	-0.10 $\pm$ 0.02	83.2 $\pm$ 2.8	0.99
Glucose in 0.1 M chloride	62.4 $\pm$ 2.8	-0.12 $\pm$ 0.04	79.2 $\pm$ 5.6	0.97
Glycine, no chloride	63.2 $\pm$ 3.6	-0.024 $\pm$ 0.12	72.6 $\pm$ 7.6	0.96

We have previously indicated that the discrimination between these two hypotheses, in favor of the water effect, is possible by using different solutes to set water chemical potential. All the solutes we tested, although chemically distinct, belong to the class of cosolvents that are excluded by protein and macromolecular surfaces. This phenomenon is supported by different experimental approaches, like hydration forces (3) and density measurements (31), as well as by equilibrium dialyses of sucrose and proteins (32). However, solute exclusion does not imply the non-existence of solute specific binding. For instance, we have shown that when titrating Hb with NaCl to measure the heterotropic chloride effect on this protein, both Cl^- -specific heterotropic binding and water differential binding are operative in the control of the energy of O_2 saturation (16). Similarly, water-cation combined effects have been considered in the interpretation of the non-linear dependence of ΔG of protein (18) and peptides (19) on salt activity. Thus, the functional profile of the linkage plots, illustrated in Figs. 1 and 2, carries considerable information about the mechanism of heterotropic action of ligand- and non-ligand-soluble species.

The curved dependence of $\ln P_{50}$ on $\ln (m_s)$ seen in Fig. 2 is appropriately analyzed with the extended linkage (Equation 12). As described under "Materials and Methods," this equation contains both the energetic contribution of water and solute binding to Hb oxygen affinity. The differential numbers of water (Δn_w) and solute molecules (Δn_s) linked with full oxygenation found by the fitting procedure are shown in the second and third columns of Table I, respectively. They show, in average, that $\Delta n_s = -0.08 \pm 0.06$ glucose or glycine and $\Delta n_w = 66.8 \pm 2.8$ water molecules per Hb are involved in the equilibrium between deoxy and oxy Hb. While this number of water molecules agrees with that previously reported by us (1), the number of glycine and glucose molecules coupled with the allosteric equilibrium remains near zero, independent of the chemical nature, size, and charge of these "inert" solutes. Table I also shows a slight increase in Δn_w measured with glucose in a Cl^- -free medium compared to Δn_w measured in the presence of the anion. It is not clear, however, if this change in Δn_w reports some conformational change of the deoxy T structure produced by the neutralization of positive charges in the central cavity by diffusive, unbound chloride ions, as recently proposed by Perutz *et al.* (33). If our analysis of the data by Equation 12 does not allow a molecular interpretation of small changes in Δn_w , it permits, however, to state that the magnitude of Δn_s found through this equation indicates a rather negligible specific solute binding, if it exists at all. Therefore, we found extra evidence favoring our original interpretation that the effect of the neutral solutes on Hb binding energy is indirect, *i.e.* through changes in the chemical potential of water and not through "weak" allosteric binding as proposed by Bellelli *et al.* (15).

The effects of ligands acting as allosteric regulators of biochemical reactions have its importance long recognized. Without this knowledge, it is inconceivable to fully understand the mechanisms of protein regulatory interactions. While one can strip almost any ligand off macromolecules, we cannot strip solvent. Often it is difficult to maintain the activity of the solvent constant, especially when studying processes involving binding of weak ligands. The work presented here, along with others (1, 7–14, 17–19, 27), shows some strategies, by choosing appropriated inert solutes and thermodynamic models, that can be useful to reveal and quantify the role of solvation on biochemical regulation.

Acknowledgments—We are grateful to V. Adrian Parsegian and Donald C. Rau (National Institutes of Health) and to Richard Ward and Raghuvir K. Arni for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Colombo, M. F., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1992) *Science* **256**, 655–659
- Colombo, M. F., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1993) *Science* **259**, 1336
- Parsegian, V. A., Rand, R. P., Fuller, N. C., and Rau, D. C. (1986) *Methods Enzymol.* **127**, 400–416
- Haire, R. N., and Hedlund, B. E. (1983) *Biochemistry* **22**, 327–334
- Clothia, C., Wodak, S., and Janin, J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3793–3797
- Janin, J., Wodak, S., and Clothia, C. (1985) *J. Mol. Biol.* **183**, 267–270
- Kornblatt, J. A., and Hui Bon Hoa, G. (1990) *Biochemistry* **29**, 9370–9376
- Rand, R. P., Fuller, N. L., Butko, P., Francis, G., and Nicholls, P. (1993) *Biochemistry* **32**, 5925–5929
- Robinson, C. R., and Sligar, S. G. (1994) *Biochemistry* **33**, 3787–3793
- Parsegian, V. A., Rand, R. P., Colombo, M. F., and Rau, D. C. (1994) *Adv. Chem. Ser.* **235**, 177–196
- Colombo, M. F., and Rau, D. C. (1992) *Biophys. J.* **61**, 344 (abstr.)
- Preisler, R. S., Chen, H. H., Colombo, M. F., Choe, Y., Short, B. J., and Rau, D. C. (1995) *Biochemistry* **34**, 14400–14407
- Sidorova, N. Y., and Rau, D. C. (1995) *Biopolymers* **35**, 377–384
- Gardner, M. M., and Rau, D. C. (1995) *EMBO J.* **14**, 1257–1263
- Bellelli, A., Brancaccio, A., and Brunori, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4742–4744
- Colombo, M. F., Rau, D. C., and Parsegian, V. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10517–10520
- Tanford, C. (1969) *J. Mol. Biol.* **39**, 539–544
- Ha, J. H., Capp, M. V., Hohenwarter, M. D., Pakerville, M. P., and Record, M. T., Jr. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**, 252–264
- Mascotti, D. P., and Lohman, T. M. (1993) *Biochemistry* **32**, 10568–10579
- Williams, R. C., and Tsay, K. Y. (1973) *Anal. Biochem.* **54**, 137–145
- Riggs, A., and Wolbach, R. A. (1956) *J. Gen. Physiol.* **39**, 585–605
- Rossi-Fanelli, A., and Antonini, E. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 478–492
- Benesch, R. E., Benesch, R., and Yung, S. (1973) *Anal. Biochem.* **55**, 245–248
- Glasstone, S. (1977) *Termodinamica para Químicos*, 5th Ed., pp. 460–470, Aguilar, Madrid
- Wyman, J. (1964) *Adv. Protein Chem.* **19**, 223–286
- Wyman, J., and Gill, S. J. (1990) *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules*, University Science Books, Mill Valley, CA
- Edsall, J. T., and Wyman, J. (1958) *Biophysical Chemistry*, Vol. 1, p. 368, Academic Press, Inc., New York
- Malmberg, C. G., and Maryott, A. A. (1950) *J. Res. Natl. Bureau Standards* **45**, 299–303
- Ackermann, E., Berger, R. L., Blair, W. L., and Strother, G. K. (1963) *Biophys. J.* **3**, 469–478
- Varani, G., Della Torre, I., and Baldini, G. (1987) *Biophys. Chem.* **28**, 175–181
- Timasheff, S. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 67–97
- Bull, H. B., and Breese, K. (1978) *Biopolymers* **17**, 2121–2131
- Perutz, M. F., Shih, D. T., and Williamson, D. (1994) *J. Mol. Biol.* **239**, 555–560

CAPÍTULO IV - Água como Ligante:

Descrição termodinâmica da hidratação macromolecular em solução e de sua contribuição para o equilíbrio de reações bioquímicas

Os trabalhos apresentados no Capítulo III demonstram que a energia livre de oxigenação da Hb responde linearmente à variações do potencial químico da água. Neste capítulo apresentamos os modelos termodinâmicos que mostram que a medida da dependência da variação da energia livre da reação, ΔG , com a variação do potencial químico da água, $d\mu_w$, possibilita determinar a variação de hidratação aparente associada à uma reação. Ademais, pretendemos demonstrar que quando o único ligante com atividade variável é a água, a dependência linear entre ΔG e $d\mu_w$, observada nas reações com Hb descritas no Capítulo III, é uma assinatura do efeito de água em reações biológicas.

Teoria de ligação de múltiplos ligantes à uma macromolécula.

Frequentemente nos deparamos com reações bioquímicas que envolvem a interação de uma macromolécula com mais de um tipo de ligante. Dentre estas, estaremos interessados naquelas reações onde não há competição entre ligantes distintos pelo mesmo sítio de ligação na macromolécula. Esta não competição, entretanto, não implica na ausência de interações de longo alcance através das quais a afinidade de um dado ligante pelo seu sítio pode ser controlada pelo grau de saturação de outros sítios equivalentes ou não. Este tipo de interação de longo alcance, denominada de interação alostérica, esta na base de vários eventos moleculares típicos ao sistema biológico. Dentre outros, a Hb é um exemplo típico de proteína alostérica, onde a ligação sequencial das primeiras moléculas de oxigênio à forma estrutural desoxi do tetramero de Hb impõe pequenas mudanças na conformação local de seu sítio de ligação. Este stress estrutural localizado é transmitido pela cadeia protéica até a interface entre as cadeias que formam a Hb e induz mudanças na estrutura quaternária da forma desoxi (T) para formar a estrutura oxi (R) desta proteína



[22,23]. Como consequência, a afinidade dos sítios de ligação de O₂ não ocupados aumenta em relação aos sítios já ocupados, pontes salinas, que ocorrem na interface entre as cadeias da proteína na forma T, são desfeitas expondo novos sítios de ligação para prótons na forma R e desfazendo um sítio de ligação específico para fosfatos orgânicos e para íons cloreto que ocorrem na forma T e não na forma R da proteína. Estas mudanças estruturais implicam, ainda, no desmanche de várias interações intramoleculares e consequente exposição de grupos protéicos ao solvente com consequente mudanças de hidratação da macromolécula [22-26]. Portanto, a oxigenação da Hb, além de envolver a ligação de moléculas de O₂ aos quatro grupos heme, processa-se com a participação de outros ligantes, conhecidos como ligantes alostéricos heterotrópicos, que se ligam com estequiometrias e afinidades diferentes às diferentes conformações da proteína em solução [21,21,27]. A ocupação destes sítios heterotrópicos determina, adicionalmente, a diferença de energia entre as diferentes conformações da proteína e, consequentemente, a sua afinidade por O₂ [20,21]. Um outro exemplo, no qual a ocupação de sítios distintos por diferentes ligantes determina o equilíbrio da reação, é o efeito da ligação de prótons, íons e água na reação de enovelamento / desenovelamento de proteínas. Nestas reações a ligação de prótons em meio ácido, ou seu desligamento em meio alcalino, geralmente leva ao rompimento das interações entre grupos laterais e do esqueleto polipeptídico e sua exposição ao solvente, criando novos sítios de protonação e de um numero imenso de novos sítios de hidratação. No re-enovelamento, ambos prótons e água de hidratação devem ser liberados pelo polímero permitindo o re-establishimento dos contatos intramoleculares rompidos na desnaturação. Portanto, também neste caso, a ligação de diferentes ligantes a sítios distintos da macromolécula, próton e água, e o equilíbrio entre diferentes isômeros conformacionais não são fenômenos independentes.

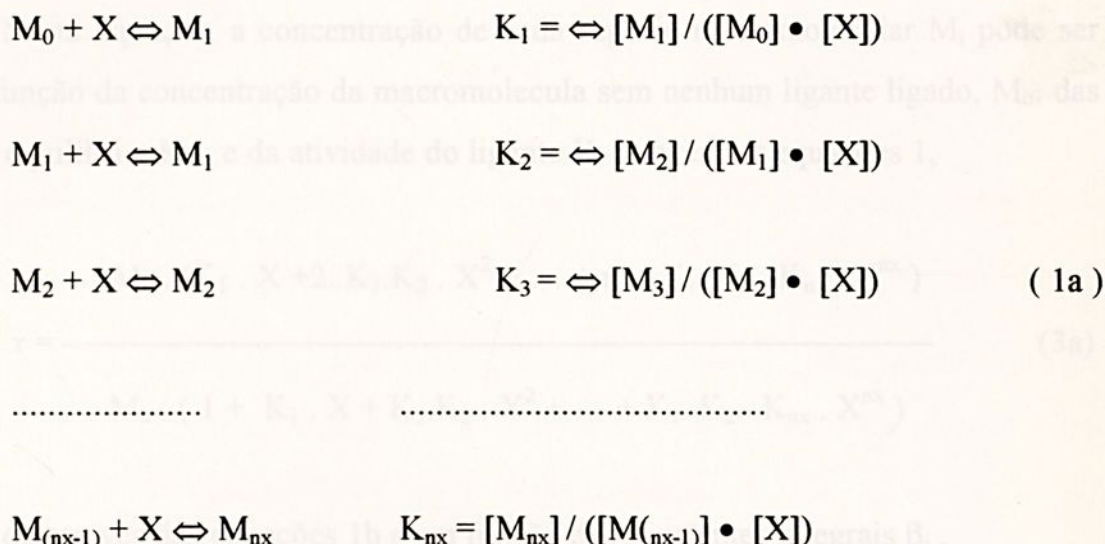
O modelo mais popular para descrever o efeito de ligação múltipla a diferentes estados conformacionais de uma macromolécula sobre o equilíbrio da reação se deve a J.Wyman, em sua teoria de equações de "linkage" químico [20]. Nos próximos parágrafos pretendemos apresentar os aspectos fundamentais desta teoria ao considerar inicialmente a interação de um único ligante X a n_X sítios de uma macromolécula M, e, em seguida a interação de dois ligantes X e Y que se ligam a n_X e n_Y sítios desta macromolécula. Destas expressões derivaremos as relações de "linkage" que permitem considerar o efeito da ligação



de um ligante sobre a afinidade de outro ligante ou sobre o equilíbrio conformacional de uma macromolécula.

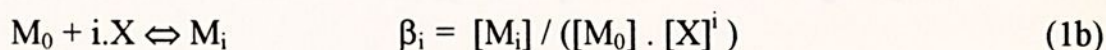
Interação de um ligante X à n_X sítios de uma macromolécula M.

O processo de ligação de n_X moléculas de X a n_X sítios de ligação pode ser descrita por uma sequencia de ligações por passo, como se segue



onde $[X]$ representa a atividade do ligante X em solução, M_i a concentração da espécie com i ligantes ligados, e, K_i a constante de associação macroscópica sequencial para o i -ésimo ligante.

Outra descrição equivalente deste processo de ligação é considerar a reação da macromolécula M_0 com i moléculas do ligante X com as constantes de equilíbrio integrais β_i



É facil mostrar que as constantes, sequencial e global, estão relacionadas através da igualdade

$$\beta_i = K_1 \cdot K_2 \dots K_i \quad \text{com } i \text{ variando de } 0 \text{ à } n_X \text{ e } \beta_0 = K_0 = 1$$



Geralmente, em experimentos de ligação de ligante a quantidade experimental determinada é a fração de saturação da macromolécula em função da atividade do ligante, expressa pela razão entre o numero de sítios ocupados pela concentração total d macromolécula, x , dada por

$$x = \{ (M_1 + 2. M_2 + \dots + n_X . M_{n_X}) \} / \{ (M_0 + M_1 + \dots + M_{n_X}) \} \quad (2)$$

Nesta equação, a concentração de cada espécie macromolecular M_i pode ser expressa em função da concentração da macromolecula sem nenhum ligante ligado, M_0 , das constantes de equilibrio, K_1 , e da atividade do ligante X , através das equações 1,

$$x = \frac{M_0 \cdot (K_1 \cdot X + 2. K_1 \cdot K_2 \cdot X^2 + \dots + n_X \cdot K_1 \cdot K_2 \dots K_{n_X} \cdot X^{n_X})}{M_0 \cdot (1 + K_1 \cdot X + K_1 \cdot K_2 \cdot X^2 + \dots + K_1 \cdot K_2 \dots K_{n_X} \cdot X^{n_X})} \quad (3a)$$

ou através das equações 1b e em função das constantes integrais β_i ,

$$x = \frac{M_0 \cdot (\beta_1 \cdot X + 2. \beta_2 \cdot X^2 + \dots + n_X \cdot \beta_{n_X} \cdot X^{n_X})}{M_0 \cdot (1 + \beta_1 \cdot X + \beta_2 \cdot X^2 + \dots + \beta_{n_X} \cdot X^{n_X})} \quad (3b)$$

É facil notar que a expressão do numerador nas equações 3a ou 3b corresponde à derivada do denominador multiplicada pela atividade do ligante, i.é,

$$X \frac{d}{dX} (1 + \beta_1 \cdot X + \beta_2 \cdot X^2 + \dots + \beta_{n_X} \cdot X^{n_X}) = (\beta_1 \cdot X + 2. \beta_2 \cdot X^2 + \dots + n_X \cdot \beta_{n_X} \cdot X^{n_X})$$

ou, de forma sintética, escrevendo o polinômio do denominador como o somatório

$$\left(\sum_{i=0}^{n_X} \beta_i \cdot X^i \right), \text{ a equação acima reduz-se a}$$

$$X \frac{d}{dX} \left(\sum_{i=0}^{n_X} \beta_i \cdot X^i \right) = \left(\sum_{i=0}^{n_X} i \cdot \beta_i \cdot X^i \right) \quad \text{com } \beta_0 = 1$$

dividindo esta expressão pelo somatório do denominador e rearranjando reconstituimos a expressão para o numero de sítios ocupados da proteína ligada, x , dado por

$$x = \frac{X}{\left(\sum \beta_i \cdot X^i \right)} \cdot \frac{d\left(\sum \beta_i \cdot X^i \right)}{dX} = \frac{d \ln \left(\sum \beta_i \cdot X^i \right)}{d \ln(X)} = \frac{\sum i \cdot \beta_i \cdot X^i}{\sum \beta_i \cdot X^i} \quad (4)$$

Esta expressão mostra que podemos expressar o número de sítios saturados da proteína pela derivada do logaritmo do $\left(\sum_{i=0}^{n_X} \beta_i \cdot X^i \right)$ em relação ao logaritmo da atividade do ligante. Por outro lado, nós também notamos que este somatório corresponde à razão entre a concentração da proteína total M_T pela concentração da proteína sem ligante algum ligado M_0 . Em virtude desta propriedade vamos definir a função

$$P = [M_T] / [M_0] = \sum_{i=0}^{n_X} \beta_i \cdot X^i \quad (5)$$

conhecida como o Polinômio de Ligação do ligante X à macromolécula M com n_X sítios de ligação. A equação 5, que define o polinômio de ligação junto à equação 4, que motiva esta definição, mostram que se for possível medir experimentalmente a concentração da proteína sem ligante algum ligado, M_0 , em função da atividade do ligante, este polinômio fica automaticamente definido, as constantes de equilíbrio relevantes do sistema podem ser determinadas por métodos de ajuste numérico dos parâmetros β_i à estes dados, e, a saturação da proteína pode ser obtida por simples derivação deste dados.

O polinômio de ligação tem uma série de outras propriedades importantes, muito bem discutidas no livro de Gill e Wyman [21], e que não serão discutidas aqui. Excessão, entretanto, será feita à propriedade, originalmente demonstrada por Schellman, de que este polinômio é também uma medida direta da contribuição da energia livre de ligação do ligante ao potencial químico da macromolécula [28]. Também não repetiremos a elegante



derivação de Schelmann, e a leitura do artigo original é altamente recomendada. Para os nossos propósitos basta considerar o potencial químico da proteína na ausência e na presença do ligante e relaciona-los com o potencial de ligação, como se segue.

Considere uma macromolécula em solução, na ausência de ligantes outros que não o solvente à concentração M_0 . A excessão ao solvente será feita só temporariamente, uma vez que é nele que estamos principalmente interessados. O potencial químico desta macromolécula na ausência de ligante esta definida por

$$\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln ([M_0]) \quad (6)$$

onde μ_P^0 é o potencial químico da proteína no estado de referência, normalmente atribuído à concentração de proteína unitária. Na presença de ligantes, encontraremos a proteína não só sem ligante algum, mas distribuida entre diferentes estados de saturação, com distribuição expressa pelo polinômio de ligação **P**, definido pela equação 5. Nesta circunstâncias a concentração de M_0 é, por rearranjo da equação 5, dada por

$$\ln([M_0]) = \ln([M_T]) - \ln\left(\sum_{i=0}^{nx} \beta_i \cdot X^i\right)$$

onde, lembramos, $[M_T]$ representa a soma de todas as espécies em solução e portanto a concentração total de proteína dissolvida. Substituindo esa equação na equação 6, obtemos

$$\mu_P = \mu_P^0 + \ln([M_T]) - RT \ln \left(\sum_{i=0}^{nx} \beta_i \cdot X^i \right) \quad (7)$$

que é o **potencial químico da proteína na solução à atividade de ligante X**. É importante notar que, desde que o processo de ligação de ligante é um processo energeticamente favorável o potencial químico da proteína deve diminuir com o aumento da saturação em consequência do aumento da atividade do ligante. É exatamente isto o que esta mostrado na equação 7.



Um outro aspecto que pode ser mostrado é que , a diferença de energia livre entre a proteína na presença e na ausência do ligante fornece ΔG_{int} , a variação de energia de interação da macromolécula com o ligante por mol de macromolécula. Esta quantidade pode ser calculada subtraindo-se a equação 7 de 6 e, lembrando que na ausência de ligante $[M_0] = [M_T]$, temos

$$\Delta G_{\text{int}} = (\mu_P - \mu_P^0) = - RT \ln \left(\sum_{i=0}^{n_X} \beta_i \cdot X^i \right) = - RT \ln (\mathbf{P}) \quad (8)$$

que é diretamente proporcional ao logaritmo do polinômio de ligação $\mathbf{P}$. Estes resultados, que são absolutamente gerais, serão explorados mais adiante, quando iremos considerar a água como ligante.

Interação de ligantes X e Y à n_X e n_Y sítios de uma macromolécula M.

O procedimento para a determinação do polinômio de ligação de dois ligantes distintos, X e Y, à n_X e n_Y sítios de uma macromolécula é equivalente àquele utilizado para um ligante à n sítios. Consideremos o equilíbrio entre i moléculas de X e j moléculas de Y com a macromolécula M



com constante de equilíbrio de associação global dada por

$$\beta_{i,j} = [M.X_i.Y_j] / [M]. [X]^i . [Y]^j \quad (10)$$

O grau de saturação da macromolécula por X à atividade de Y constante é dada por

$$\sum_{j=0}^{n_Y} (M_{1,j} + 2. M_{2,j} + \dots + n_X . M_{n_X,j})$$

$$x = \frac{\sum_{j=0}^{n_Y} (M_{0,j} + M_{1,j} + M_{2,j} + \dots + M_{n_X,j})}{\sum_{j=0}^{n_Y} (\beta_1 \cdot X \cdot Y^j + 2 \cdot \beta_2 \cdot X^2 \cdot Y^j + \dots + n_X \cdot \beta_{n_X} \cdot X^{n_X} \cdot Y^j)} \quad (11)$$

em termos das constantes de equilíbrio macroscópicas definida pela equação 10, temos,

$$x = \frac{\sum_{i=0}^{n_X} (\beta_1 \cdot X \cdot Y^j + 2 \cdot \beta_2 \cdot X^2 \cdot Y^j + \dots + n_X \cdot \beta_{n_X} \cdot X^{n_X} \cdot Y^j)}{\sum_{i=0}^{n_X} (1 + \beta_1 \cdot X \cdot Y^j + \beta_2 \cdot X^2 \cdot Y^j + \dots + \beta_{n_X} \cdot X^{n_X} \cdot Y^j)}$$

ou,

$$x = \frac{\sum_{i=0}^{n_X} \sum_{j=0}^{n_Y} (i \cdot \beta_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j)}{\sum_{i=0}^{n_X} \sum_{j=0}^{n_Y} (\beta_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j)} \quad (12)$$

Como no caso de um único ligante, nós definimos o potencial de ligação para a interação de X e Y a n_X e n_Y sítios de ligação, respectivamente, pela razão entre a concentração de proteína total M_T e a concentração de proteína sem ligante algum ligado, M_{00} , como segue

$$P(X,Y) = [M_T]/[M_{00}] = \sum_{i=0}^{n_X} \sum_{j=0}^{n_Y} (\beta_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j) \quad (13)$$

E, como anteriormente, o numerador da equação 12 iguala-se ao produto de X pela derivada de $\ln(P(X,Y))$ em relação a X com Y constante, i.e.,

$$X \frac{\partial \ln(P)}{\partial X} \Big|_Y = \sum_{i=0}^{nx} \sum_{j=0}^{my} (i \cdot \beta_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j)$$

e a saturação de x é obtida dividindo-se a expressão acima por $\mathbf{P}(X,Y)$

$$x = \frac{X}{P} \frac{\partial \ln(P)}{\partial X} \Big|_Y = x = \frac{\partial \ln(P)}{\partial \ln(X)} \Big|_Y \quad (14)$$

De maneira absolutamente equivalente podemos obter a saturação da proteína por Y , y , à atividade constante de X , que vem dada por

$$y = \frac{Y}{P} \frac{\partial \ln(P)}{\partial Y} \Big|_X = \frac{\partial \ln(P)}{\partial \ln(Y)} \Big|_X \quad (15)$$

Uma propriedade importante deste polinômio de ligação é encontrada quando se calcula as derivadas de x em relação à $\ln(Y)$ mantendo a atividade de X constante, e, de y em relação à $\ln(X)$ mantendo a atividade de Y constante.

$$\frac{dy}{d\ln(X)} = \frac{d\ln(\mathbf{P}(X,Y))}{d\ln(X) d\ln(Y)} = \frac{\sum_{i=0}^{nx} \sum_{j=0}^{my} (i \cdot j \cdot K_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j)}{\sum_{i=0}^{nx} \sum_{j=0}^{my} (K_{ij} \cdot X^i \cdot Y^j)} = \frac{d\ln(\mathbf{P}(X,Y))}{d\ln(Y) d\ln(X)} = \frac{dx}{d\ln(Y)}$$

ou simplesmente

$$\frac{\alpha_x}{\partial \ln(Y)} \Big|_X = \frac{\alpha_y}{\partial \ln(X)} \Big|_Y \quad (16)$$

Esta equação estabelece uma das equações de linkage de Wyman, demonstrando a variação no grau de saturação da macromolécula por Y devido à mudança na atividade de X é igual à variação no grau de saturação da macromolécula por X devido à

mudança na atividade de Y. A utilidade de relações deste tipo, ao estudo da interação de múltiplos ligantes à uma macromolécula, está em que com elas é possível quantificar o efeito de um determinado ligante, Y por exemplo, mesmo que não seja possível a determinação experimental da saturação de Y à macromolécula. Para tanto, basta determinar como a saturação do outro ligante, X neste exemplo, responde às mudanças na atividade de Y. Um exemplo de como a relação 16 pode ser usada, na determinação da diferença de hidratação entre as conformações totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada da hemoglobina a partir das medidas da variação da saturação desta proteína por O_2 , é mostrado no artigo que perfaz a parte A do Capítulo III. É importante notar que, a despeito de a expressão 16, naquele artigo, ter sido derivada baseada em outras suposições, i.e., através da equação de Gibbs-Duhem, o resultado final é perfeitamente equivalente ao encontrado acima.

A forma da equação de linkage 16, não é única. Pode-se, usando as propriedades de diferenciais exatas, obter outras relações por transformações de Legendre desta equação [20,21]. Um exemplo de uma transformação deste tipo está descrito, detalhadamente, na seção de Termodinâmica do artigo que compõe a parte C do Capítulo III. Neste e no artigo apresentado na parte B do Capítulo III, a equação de linkage 16 é usada como ponto de partida para a derivação de uma outra equação para descrever uma situação mais complexa, qual seja, a do efeito da ligação diferencial de dois ligantes distintos, cujas atividades não são variáveis independentes, sobre a afinidade global da Hb por oxigênio.

A contribuição da hidratação ao potencial químico de uma macromolécula em solução via o polinômio de ligação de moléculas de água.

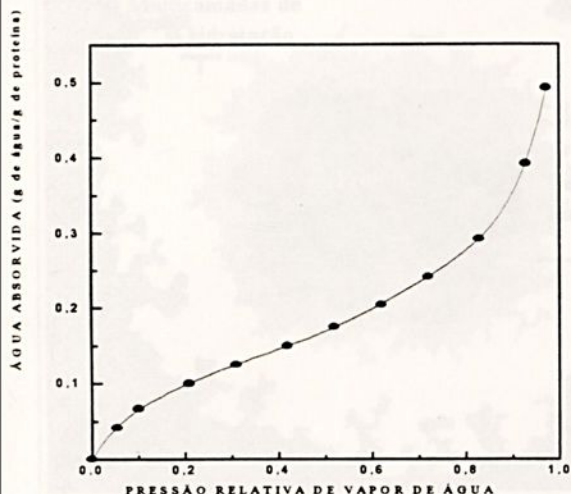


Figura 4.1 - Gráfico da quantidade de água absorvida em função da pressão relativa de vapor de água. Reproduzido da ref.34

Históricamente, a energética da hidratação de macromoléculas tem sido estudada através da obtenção experimental de isotermas de hidratação, i.é, da determinação da massa de água absorvida por massa de polímero, em equilíbrio com uma atmosfera controlada de vapor de água, em função da pressão de vapor [29 e ref.incluídas]. A descrição teórica destas isotermas tem sido realizada, principalmente, a partir de modelos de absorção isotérmica de água pela superfície da macromolécula. Uma ampla revisão da literatura concernente à

estudos de hidratação de proteínas e polipeptídeos, incluindo resultados relevantes obtidos através da análise de isotermas de hidratação, foi publicada por Kuntz e Kauzmann em 1972 [29]. Apesar desta revisão ter mais de 20 anos, ela continua uma referência bastante atual neste tópico. Como exemplo, a Figura 4.1 mostra uma isoterma de hidratação de proteína típica. Em essência, a análise de isotermas de hidratação experimentais deste tipo, com o auxílio de modelos teóricos como o de Langmuir e BET, indica:

1) a existência de uma monocamada de hidratação fortemente associada à superfície protéica. Na figura 4.1, esta monocamada corresponde ao trecho inicial da curva de hidratação, que se completa em torno da atividade de água em torno de 0.20 e quantidade de água absorvida de aproximadamente 0.1 grama de água por grama de proteína.

2) para valores de atividades de água acima de 0.20 a água absorvida pela proteína forma várias multicamadas associadas muito mais fracamente à macromolécula que a água da primeira camada de hidratação. Os valores de entalpia e entropia de absorção de água pela proteína rapidamente se aproximam dos valores de entalpia e entropia de vaporização de água pura, atingindo este valor à hidratações correspondentes à aproximadamente 0.3-0.4 gramas de água por grama de proteína [29].

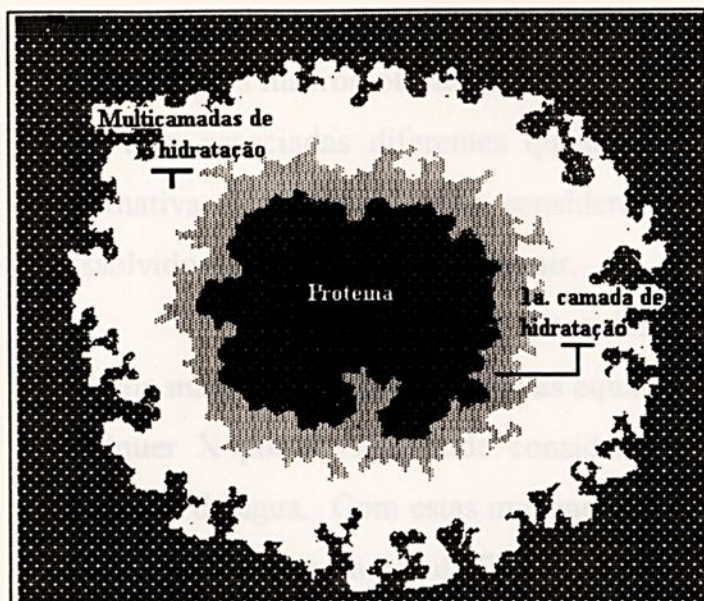


Figura 4.2- Representação das camadas de hidratação de uma proteína

Estes resultados tem levado vários autores a considerar a proteína em solução como representado pictóricamente na figura 4.2, [30]. A camada de hidratação A, mais próxima à proteína, representaria a monocamada de hidratação. Nesta camada não haveria a solubilização de componentes de solutos presentes na solução. A camada B, corresponde àquela que faz a transição entre a primeira camada de hidratação e a água do volume da solução. Dinamicamente, esta camada de hidratação é arrastada pela proteína em seu

movimento de translação e difusão. Este modelo concorda, qualitativamente, mais ou menos bem com varias características físicas da água de hidratação de proteínas medidas por diversas técnicas, tais como medidas de capacidade térmica, ponto de congelamento, tempo de correlação de prótons medido por RMN, medidas de densidade específica de proteínas em soluções ternárias, viscosidade hidrodinâmica, entre outros [1,29,30,31 e refs. incluídas nestas]. Entretanto, nenhum dos modelos de isothermas de absorção de água à superfícies protéicas, entre elas as de Langmuir e BET, possibilitam a análise do papel da água em reações bioquímicas. A dificuldade, neste caso, advem do fato de que estas teorias de hidratação consideram unicamente o equilíbrio do polímero hidratado em matriz sólida com o vapor de água. Com estes modelos, aspectos importantes como a ocorrência de possíveis mudanças conformacionais induzidas no polímero devido à desidratação / rehidratação são impossíveis de serem modelados².

Entretanto, ao considermos os aspectos moleculares responsáveis pela termodinâmica de reações bioquímicas aqueles relativos ao rearranjo nas camadas de hidratação dos polímeros e ligantes envolvidos na reação não podem ser desconsiderados.

²Talvez, a única exceção à esta regra seja a teoria de Flory-Huggins que é uma teoria de solução e não de superfície como as de Langmuir e BET

Portanto, seria fundamental podermos descrever como o potencial químico de macromoléculas e de seus ligantes variam com a atividade de água haja visto que diferentes conformações macromoleculares e diferentes graus de associação macromolécula - ligantes tem a si associadas diferentes quantidades de água de hidratação. Uma possibilidade, alternativa às isotermas, seria considerar a água como qualquer outro ligante porventura dissolvido na solução, como a seguir.

Vamos retomar, então, a descrição da interação de um ligante X com n_X sítios de uma macromolécula conforme as equações 1b, 5 e 7, e, simplesmente substituir o ligante qualquer X por H_2O e, onde consideramos a atividade de X passemos a considerar a atividade de água. Com estas mudanças, a interação de moléculas de água com n_w sítios de hidratação da macromolécula fica

$$M_0 + i \cdot a_w \rightleftharpoons M_i \quad e \quad \beta_i = [M_i] / ([M_0] \cdot [a_w]^i) \quad (17)$$

$$P_w = [M_T] / [M_0] = \sum_{i=0}^{n_w} \beta_i \cdot (a_w)^i \quad (18)$$

$$\mu_P = \mu_P^0 + \ln([M_T]) - RT \ln(P_w) \quad (19)$$

Portanto, se pudermos determinar o potencial de ligação representado na equação 18, a contribuição da energia livre devido à interação de água com a macromolécula para o potencial químico desta fica automaticamente determinada via equação 19. Existem duas possibilidades de se determinar o polinômio de ligação P_w para a água. Uma seria determina-lo experimentalmente. Entretanto esta tarefa parece impossível, visto que estamos interessados em conhecer os parâmetros que descrevem a ligação de água à uma macromolécula biológica dissolvida em meio aquoso. Nestas circunstâncias, todos os sítios de hidratação expostos ao solvente estarão sempre saturados qualquer que seja a atividade de água da solução. A outra possibilidade, é propor um modelo de ligação de água à macromolécula que xom base nas evidências experimentais existentes.



Modelo para a hidratação energeticamente relevante ao potencial químico de uma macromolécula em solução.

Ao nos propormos formular um modelo para a contribuição energética da água sobre o potencial químico de macromoléculas biológicas em solução não pretendemos descrever este potencial em todo o intervalo de atividade de água, nem mesmo alimentamos a expectativa de poder descrever os detalhes moleculares desta interação. Nosso interesse, entretanto, estará focalizado naquela parcela da hidratação macromolecular cuja perturbação é capaz de alterar o equilíbrio de uma determinada reação bioquímica. Portanto, nos limitaremos à considerar no cálculo do potencial de ligação de água, equação 19, somente os sítios da primeira camada de hidratação, que são aqueles com maior probabilidade de promover um débito energético significativo à energia livre da reação. Qualquer outra contribuição de água de hidratação ao potencial químico da macromolécula, mas que não contribui energeticamente para reações, estará automaticamente incluída no potencial químico de referencia desta macromolécula.

Em síntese, o modelo consiste em:

1) considerar somente as águas que formam a primeira camada de hidratação da macromolécula. A justificativa para esta proposição esta em que vários estudos demonstraram que as moléculas de água desta camada estão associadas muito mais fortemente à macromolécula que a águas que constituem para a formação das multicamadas de hidratação, e

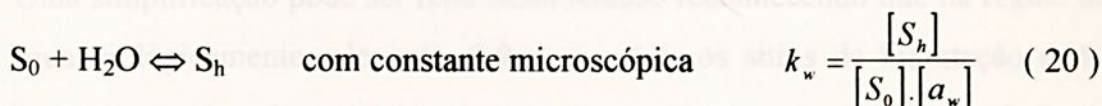
2) supor, também, que a água liga-se à superfície macromolecular em sítios idênticos e independentes. Em outras palavras, vamos supor que a constante de afinidade intrínseca da água pelo sítio na superfície da macromolécula, k_w , é a mesma para todos os sítios existentes na superfície e cuja magnitude independe da fração de saturação dos sítios vizinhos. Esta suposição encontra respaldo pelos resultados da análise de dados de absorção de água por proteínas e polipeptídeos com diversos modelos de isoterma de hidratação. Segundo Kuntz e Kauzmann [29 pag 251], as curvas de absorção de água por proteínas e polipeptídeos são bastante bem descritas por um parâmetro que mede a afinidade da ligação e um outro um fortemente correlacionado à superfície macromolecular exposta ou, ao



número de moléculas de água associadas à primeira camada de hidratação. Este resultado independe, inclusive, do modelo utilizado para a análise em questão.

Com estas suposições, o problema que temos que resolver para extrair a contribuição da água ao potencial químico da macromolécula é um problema de ligação de um ligante com constante intrínseca (ou microscópica) k_w à n_w sítios de ligação. Para tanto, nós podemos fazer uso das equações de equilíbrio e das constantes de equilíbrio macroscópica K_i definidas pelas equações (1a). Se adotarmos este procedimento temos que considerar os fatores estatísticos que acoplam a constante macroscópica K_i com a constante microscópica k_w em virtude de o numero de maneiras de se associar uma molécula do ligante à ($n_w - i$) sítios de ligação desocupados no passo i diminui com o aumento da saturação. Este procedimento está descrito na referência [32] por Cantor & Schimell. Aqui, vamos optar uma derivação alternativa. Vamos calcular, inicialmente, a fração de saturação de um único sítio e, então, multiplicar esta fração pelo numero total de sítios, resultando na saturação total. O resultado é idêntico ao descrito na referência [32].

Vamos considerar o equilíbrio entre um sítio desidratado, S_0 , com um sítio hidratado, S_h , à atividade de água a_w e constante k_w , descritos pela equações abaixo



a ocupação fracional deste sítio é dada pela razão

$$\Theta = \frac{[S_h]}{[S_0] + [S_h]}$$

Substituindo o valor de S_h obtido com a equação 20 na expressão acima, encontramos

$$\Theta = \frac{k_w \cdot a_w}{1 + k_w \cdot a_w} = \frac{d \ln(1 + k_w)}{d \ln(a_w)} = \frac{d \ln(P_1)}{d \ln(a_w)} \quad (21a)$$

onde $P_1 = (1 + k_w \cdot a_w)$ é o polinômio de ligação para um sítio. A fração de saturação de n_w sítios na macromolécula, h , é então obtida multiplicando-se o numero de sítios pela saturação de um único sítio, como segue

$$h = n_w \cdot \Theta = n_w \cdot \frac{d \ln(1 + k_w)}{d \ln(a_w)} = \frac{d \ln(1 + k_w)^{n_w}}{d \ln(a_w)} = \frac{d \ln(P_w)}{d \ln(a_w)} \quad (21b)$$

e, por comparação obtemos o polinômio de ligação para água à macromolécula

$$P_w = (1 + k_w \cdot a_w)^{n_w} \quad (22)$$

Substituindo este resultado na equação 19 poderemos obter o potencial procurado

$$\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln([M_T]) - RT \cdot n_w \cdot \ln(1 + k_w \cdot a_w) \quad (23)$$

Uma simplificação pode ser feita nesta relação reconhecendo que na região de atividade de água biologicamente relevante, $0.9 < a_w < 1$, os sítios de hidratação estão saturados, e, $(k_w \cdot a_w) \gg 1$. Com isto, $\ln(1 + k_w \cdot a_w) \approx \ln(k_w \cdot a_w) = \ln(k_w) + \ln(a_w)$, e a equação 23 pode ser aproximada por

$$\mu_P = \mu_P^0 + RT \ln([M_T]) - RT \cdot n_w \cdot \ln(a_w) \quad (24)$$

onde o termo em $\ln(k_w)$ foi incorporado ao potencial químico do estado de referência, i.é, $\mu_P^0 = \mu_P^0 + RT \cdot n_w \cdot \ln(k_w)$.

A equação 24 é o resultado relevante desta seção. Ela mostra, que em decorrência do modelo de hidratação aqui proposto, o potencial químico da proteína é proporcional ao número de sítios de hidratação e à $\ln(a_w)$.

Este expressão demonstra que com a diminuição da atividade de água, pela adição de solutos à solução por exemplo, ocorre o aumento do potencial químico da



macromolécula em relação a seu potencial em água pura. Esta predição, decorrente do modelo proposto, concorda muito bem com os resultados de Timasheff e colaboradores [33 e refs. citadas] que, por mais de 20 anos tem mostrado por técnicas densimétricas, o potencial químico de diversas proteínas dissolvidas em soluções ternária, de água, proteína e solutos, aumenta com o aumento da concentração de solutos. Este fenômeno é atribuído à hidratação preferencial da macromolécula originada pela exclusão dos solutos pela superfície protéica das camadas de hidratação próximas à proteína. Estes autores tem mostrado, também, que o aumento do potencial químico destas proteínas é proporcional à sua hidratação, e, provavelmente à concentração do soluto adicionado. Estes aspectos são, também, reproduzidos pelo modelo proposto, pois n_w é uma medida aparente de hidratação da Proteína e $\ln(a_w)$ é proporcional à concentração de partículas dissolvidas em solução.

Sobre o efeito da atividade de água sobre alguns equilíbrios simples

Nesta seção vamos considerar o efeito da atividade de água sobre o equilíbrio em dois tipos de reação bastante comuns à sistemas bioquímicos: a) isomerização conformacional e b) ligação de uma macromolécula com um ligante.

a) Isomerização conformacional

O tipo mais simples de equilíbrio envolvendo isômeros conformacionais de uma macromolécula é representado pela reação de enovelamento / desenovelamento de uma proteína. Entretanto, também é muito comum que macromoléculas em seu estado nativo apresente mais de uma conformação em equilíbrio em solução e, use estas diferentes formas conformacionais para a regulação de sua interação com o ligante. Este tipo de macromoléculas são conhecidas como macromoléculas alostéricas. Vamos então considerar, o equilíbrio entre dois estados conformacionais, N e D, em uma solução que contenha só água e proteína e, supor que o número de hidratação destes estados seja n_w^N e n_w^D , respectivamente.



$N \rightleftharpoons D$ e constante de equilíbrio aparente $K = [D]/[N]$

A variação da energia livre desta reação, ΔG é dada pela diferença de potencial químico da proteína no estado D em relação ao estados N, $\mu^D - \mu^N$. No equilíbrio

$$\Delta G = \mu^D - \mu^N = 0$$

substituindo a potencial químico dado pela equação 24

$$\begin{aligned} \Delta G = \{ \mu_D^0 + RT \ln([D_T]) - RT \cdot n_w^D \cdot \ln(a_w) \} \\ - \{ \mu_N^0 + RT \ln([N_T]) - RT \cdot n_w^N \cdot \ln(a_w) \} = 0 \end{aligned}$$

e rearranjando

$$\ln([D_T]/[N_T]) = -\Delta G_0 / RT + (n_w^D - n_w^N) \cdot \ln(a_w) \quad (25)$$

Reconhecendo que a razão de concentrações $[D_T]/[N_T]$ é igual a constante de equilíbrio aparente, que pode ser medida, por exemplo, através de técnicas espectroscópicas, e $-\Delta G_0 / RT$ a constante de equilíbrio K_0 no estado de referência, temos que

$$\ln(K) = \ln(K_0) + (n_w^D - n_w^N) \cdot \ln(a_w) \quad (26)$$

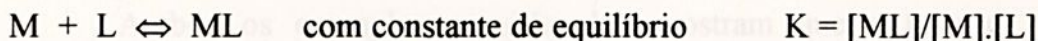
Esta relação mostra, portanto, que o logaritmo da constante de equilíbrio da transição conformacional observada varia proporcionalmente ao logaritmo da atividade de água com constante de proporcionalidade definida pela diferença de hidratação entre o estado D e o estado N. Portanto, se D for o estado mais hidratado da proteína, a diferença entre o numero de moléculas de água associadas ao estado D e o numero de moléculas de água associadas ao estado N é positivo. Consequentemente, esta expressão prediz que a diminuição da atividade de água desloca o equilíbrio para o estado menos hidratado e, vice e versa.



Antes de passar à discussão da equação de equilíbrio acima, vamos analisar um outro exemplo simples.

b) Equilíbrio de ligação entre uma Macromolécula M e um ligante L.

A reação de uma macromolécula M com um ligante L qualquer geralmente envolve a substituição de contatos moleculares do sítio de ligação na macromolécula e da molécula ligante com moléculas de água por contatos diretos entre a macromolécula e seu ligante. Consequentemente, a diferença dos graus de hidratação da macromolécula e ligante livres em relação ao complexo deve sensibilizar o equilíbrio da reação às mudanças na atividade de água. Como no exemplo anterior, vamos escrever a reação



e calcular a variação da energia livre, no equilíbrio

$$\Delta G = \mu^{ML} - \mu^M - \mu^L = 0$$

em função dos potenciais químicos dos reagentes e produtos. Substituindo o potencial químico dado pela equação 24

$$\begin{aligned} \Delta G = & \{ \mu_{ML}^0 + RT \ln([ML_T]) - RT \cdot n_w^{ML} \cdot \ln(a_w) \} \\ & - \{ \mu_M^0 + RT \ln([M_T]) - RT \cdot n_w^M \cdot \ln(a_w) \} \\ & - \{ \mu_L^0 + RT \ln([L_T]) - RT \cdot n_w^L \cdot \ln(a_w) \} = 0 \end{aligned}$$

e rearranjando

$$\ln([ML_T]/[M_T].[L_T]) = -\Delta G_0/RT + (n_w^{ML} - n_w^M - n_w^L) \cdot \ln(a_w) \quad (27)$$



Reconhecendo os diversos termos, como anteriormente, tem-se

$$\ln(K) = \ln(K_0) + (n_w^{ML} - n_w^M - n_w^L) \cdot \ln(a_w) \quad (28)$$

que prediz a dependência da constante de equilíbrio com a atividade de água via a diferença de hidratação entre o produto e os reagentes. Um exemplo típico de reação bioquímica à qual esta relação se aplica é a reação de interação de uma enzima com seu substrato ou a ligação de uma droga ou proteína à ácidos nucleicos.

Sobre a linearidade observada entre o logaritmo da constante de equilíbrio e o logaritmo da atividade de água.

Ambos os exemplos considerados mostram que a taxa de variação do logaritmo da constante de equilíbrio com a variação do logaritmo da atividade da água é proporcional à variação da hidratação que acompanha a reação. Esta assertiva pode ser quantitativamente representada pela derivando qualquer uma das equações 26 ou 28, que fornecem

$$\frac{d \ln(K)}{d \ln(a_w)} = \Delta n_w$$

onde K é a constante de equilíbrio da reação e Δn_w a diferença de hidratação aparente entre o estado final e inicial da reação que envolve a presença exclusiva da macromolécula, no caso da isomerização, e de macromolécula mais ligante, no segundo exemplo, ambos em solução aquosa. Esta é uma simplificação ao problema do equilíbrio uma vez que uma macromolécula frequentemente interage com outros componentes da solução, como prótons, íons e outros ligantes. Esta limitação, entretanto, pode ser facilmente retirada, mesmo para soluções mais complexas, se a medida da constante de equilíbrio for realizada mantendo a atividade de todos os outros possíveis ligantes da solução com atividade constante. Neste caso, a derivada acima será representada pela derivada parcial abaixo



$$\left. \frac{\partial \ln(K)}{\partial \ln(a_w)} \right|_{a_i} = \Delta n_w \quad (29)$$

Esta derivada, nos informa que a constante de equilíbrio da reação varia com a atividade de água em proporção à variação da hidratação entre os estados inicial e final da reação desde que as atividades a_i de todos os outros i ligantes da proteína em solução sejam mantidas extritamente constante. É importante notar, que se considerarmos a ligação de qualquer outro ligante, como prótons, por exemplo, e mantivermos a atividade de água constante, a dependência de $\ln(K)$ com o pH, será descrita por uma relação de linkage equivalente à equação 29. Para tanto, basta substituir a_w pela atividade de prótons, a_H , e Δn_w pelo número de prótons diferencialmente ligados ao estado final e inicial da reação, Δn_H , e encontrar a relação de linkage utilizada nestes casos [34]. Este tipo de equações, propostas por Wyman, tem sido amplamente utilizadas na análise do efeito de ligação diferencial de ligantes ordinários sobre o equilíbrio químico de reações biológicas.

Um aspecto importante a ser notado, em relação à equação de linkage 29, é que a variação de hidratação aparente Δn_w pode ser diretamente medida pela inclinação do gráfico de $\ln(K)$ em função de $\ln(a_w)$. Os exemplos experimentais, descritos nos artigos apresentados no capítulo III, mostram que a constante de associação de oxigênio à Hemoglobina varia linearmente com a atividade de água. Isto porque no intervalo de atividade de água no qual a afinidade da Hb por O_2 foi medida, o número de moléculas de água envolvidos na reação é constante. De fato, já adiantamos que esta linearidade deve ser uma característica do efeito de água de hidratação sobre reações bioquímicas em solução aquosa. A justificativa para esta conclusão está no fato de que a água não é um ligante ordinário. Dada as suas características de solvente, qualquer que seja o grupo protéico exposto à solução deverá estar solvatado. Portanto, qualquer que seja o estado conformacional de uma proteína todos os n_w sítios de hidratação, que contribuem para a variação Δn_w medida pela equação de linkage, estarão saturados independentemente da atividade da água. Consequentemente, o logaritmo da constante de equilíbrio da reação deve variar linearmente com o logaritmo da atividade de água. A linearidade entre estas

duas grandezas foi originalmente apontado por nós como uma das características do efeito de água de hidratação em reações biológicas e, tem sido confirmada por diversos autores nos mais distintos tipos de reação.

Sobre o efeito da adição de solutos neutros à solução e seu papel na medida do efeito de água sobre o equilíbrio químico de reações.

A água, a despeito de ser o solvente biológico universal, não é um líquido inerte à adição de solutos. Suas propriedades termodinâmicas mudam e, apesar disto, sua capacidade de solvatação é plenamente mantida. Isto não quer dizer, entretanto, que a energia livre dos componentes solvatados por água não variem quando as propriedades termodinâmicas da água variam. Um exemplo disto foi apresentado ao considerarmos, hipoteticamente, o efeito da atividade da água no equilíbrio de isomerização transcorrendo em uma solução binária simples de água e macromolécula, ou no equilíbrio de ligação de ligante em uma solução ternária de água, macromolécula e ligante. Entretanto, o que não consideramos naqueles casos foi a magnitude das perturbações no potencial químico da água sobre a energia livre da reação nem a origem da variação da atividade de água. Nesta seção estas questões serão analisadas.

a) Dependência da atividade de água na concentração de solutos dissolvidos em solução [35,36].

Vamos considerar, inicialmente, uma solução binária composta por N_w moles do solvente mais N_2 moles do soluto³, com potenciais químicos dados, respectivamente, por

$$\mu_w = \mu_w^0 + RT \ln (a_w) \quad (30)$$

e

$$\mu_s = \mu_s^0 + RT \ln (a_s) \quad (31)$$

³A partir de agora vamos reservar letras maiúsculas para designar o número de moles de soluto e solvente dissolvido na solução, enquanto manteremos a notação minúscula para designar o número de moles do ligante ligado à macromolécula



onde μ_i^0 são os potenciais químicos dos elementos puros e, a_i as atividades destes componentes em solução. Estes potenciais químicos não são variáveis independentes, como veremos a seguir. Para tanto vamos considerar a energia livre de Gibbs total da solução

$$G = N_w \cdot \mu_w + N_s \cdot \mu_s$$

e calcular o diferencial desta função, que nos informa como a energia livre da solução varia com a composição e potenciais químicos de seus componentes

$$dG = N_w \cdot d\mu_w + \mu_w \cdot dN_w + N_s \cdot d\mu_s + \mu_s \cdot dN_s \quad (32)$$

Por outro lado, a função energia livre de Gibbs é uma função de estado que depende exclusivamente da temperatura, pressão e composição do sistema, i.é, $G = G(T, P, N_i)$. Portanto, a variação desta função só depende de como G varia com a variação de cada uma destas variáveis, mantidas as restantes constantes. Para solução binária, à temperatura e pressão constantes, a variação da energia livre $G = G(T, P, N_i)$ é também dada por

$$dG = \left. \frac{\partial G}{\partial N_w} \right|_s \cdot dN_w + \left. \frac{\partial G}{\partial N_s} \right|_w \cdot dN_s$$

onde, em virtude de G ser uma função de estado, as derivadas parciais correspondem aos potenciais químicos de w e S , i.é

$$dG = \mu_w \cdot dN_w + \mu_s \cdot dN_s \quad (33)$$

As equações 32 e 33 descrevem exatamente o mesmo processo, e, se o sistema esta em equilíbrio, dG é igual a zero, e ambas as expressões são nulas. Portanto, para manter a identidade entre estas as expressões 32 e 33 temos que

$$N_w \cdot d\mu_w + N_s \cdot d\mu_s = 0 \quad (34)$$



que é a equação de Gibbs-Duhem, para uma solução de soluto mais solvente, que estabelece a interdependência entre os potenciais químicos do soluto e do solvente em solução. Substituindo os potenciais químicos do soluto e do solvente, definidos pelas equações 30 e 31, nesta expressão, obtemos como a atividade da água varia quando a atividade do soluto varia pela equação

$$d\ln(a_w) = - N_s / N_w \cdot d\ln(a_s)$$

à baixas concentrações do soluto, a atividade do soluto se aproxima de sua concentração na solução, i.é,

$$a_s \approx \frac{N_s}{N_s + N_w} \approx \frac{N_s}{N_w}$$

que substituído na expressão anterior, e após usar das propriedades da derivada do ln, fornece

$$d\ln(a_w) \approx -d \frac{N_s}{N_s + N_w} \approx -d\chi_s$$

onde χ_s é a fração molar do soluto em solução. Integrando esta equação de $N_s = 0$ até N_s , tem-se

$$\ln(a_w) \approx -\chi_s \quad (35)$$

A relação 35 mostra que o logaritmo da atividade de água é aproximadamente proporcional à fração molar do soluto. É bom notar que esta expressão não faz distinção sobre a homogeneidade ou não do soluto adicionado. Assim, se mais de um tipo de soluto esta presente na solução, desde que eles tenham comportamento próximo do ideal, a contribuição de cada um à atividade do solvente será aditiva. Portanto, ao considermos o



efeito da água sobre uma reação bioquímica devemos levar em conta dois aspectos: 1) quando uma proteína, por exemplo, é isolada de seu meio fisiológico para ser estudada em solução, provavelmente, a atividade da solução de estudo não reproduz a fisiológica, e, 2) a presença de sais e tampões, utilizados para reproduzir a força iônica e pH fisiológico contribuem para a diminuição da atividade de água, e, muitas vezes, ao variar a concentração de um componente da solução, para estudar-se seu efeito na reação, a atividade de água também varia.

Sobre o controle experimental da atividade de água via utilização de osmólitos.

Se por um lado, a atividade de água varia por condições impostas pelo próprio experimento, por outro, o possível efeito desta variável termodinâmica para a energética das reações exige seu controle. Para tanto utilizamos, também, solutos, que potencialmente não interagem diretamente com os componentes da reação, que, em concentração variada permite o ajuste do potencial químico da água dentro do intervalo de interesse. Dentre estes solutos, a própria natureza se incumbiu de selecionar açúcares, polióis e amino-ácidos, para o controle da osmolalidade de células e organelas [37]. Estes solutos, conhecidos como osmólitos, compartilham duas propriedades notáveis. Entre elas: eles são acumulados quando células são sujeitas à stress osmótico ou de temperatura exercendo um papel protetivo sobre os componentes celulares. Sabe-se, atualmente, que entre outras coisas estes osmólitos estabilizam macromoléculas biológicas contra desnaturação. Esta propriedade tem sido atribuída ao fato deste osmólitos não interagirem diretamente com macromoléculas, ficando excluídos da superfície e das camadas de hidratação mais próximas à proteína [33]. Daí, a proposição de que na presença de solutos, macromoléculas são preferencialmente hidratadas. Segundo Timasheff, cujas referências devem ser consultadas para a descrição da base experimental e termodinâmica do fenômeno de hidratação preferencial, a estabilização de formas mais compactas de proteínas na presença de osmólitos ocorre devido ao aumento da tensão superficial de soluções com estes componentes [33]. Entretanto, com o objetivo de utilizarmos osmólitos como tampões da atividade de água não é necessário, para o momento, entrar em detalhes sobre os



Figura 43 - Representação esquemática da fase macromolecular e da fase do volume da

representada na equação 36, o potencial químico da macromolécula deve aumentar. Este aumento do potencial químico da proteína pode ocorrer tanto devido à variação de sua

modular sua interação com ligantes, aparentemente só ocorre graças à capacidade

macromolécula, supostamente interna à membrana. Estas características permitem considerar, então, a existência de duas fases da solução em equilíbrio: a fase macromolecular e a fase do volume da solução. Vamos, a seguir, considerar o equilíbrio entre estas duas fases.

O equilíbrio termodinâmico entre fases de um sistema é adequadamente analisado via a equação de Gibbs-Duhén escrita para ambas as fases. Conforme a figura 4.3 a fase do volume da solução esta constituida por N_w moles de água, N_L moles de um ligante, e N_S moles de um soluto neutro e, a fase macromolecular composta pela macromolécula, n_w moles de água e hidratação e n_L moles de ligante ligados por mol de proteína.

À temperatura e pressão constantes, as equações de Gibbs-Duhén associadas à estas fases são dadas por

$$d\mu_M + n_L \cdot d\mu_L + n_w \cdot d\mu_w = 0 \quad (36)$$

$$N_S \cdot d\mu_S + N_L \cdot d\mu_L + N_w \cdot d\mu_w = 0 \quad (37)$$

Se soluto for adicionado na fase 2, o potencial químico da água diminue (eventualmente o potencial químico do ligante também muda, mas por questões de simplicidade vamos supor um caso em que ele não mude), conforme a equação 37. Dado que no equilíbrio o potencial químico dos componentes comuns às fases deve ser o mesmo em todas as fases, a variação negativa do potencial químico água na fase 2 será a mesma na fase 1, a da macromolécula. Para compensar esta variação, e manter a igualdade representada na equação 36, o potencial químico da macromolécula deve aumentar. Este aumento do potencial químico da proteína pode ocorrer tanto devido à variação de sua hidratação quanto devido à mudanças induzidas no número de ligantes L associados à proteína, o que pode ocorrer independentemente do fato de a atividade do ligante L permanecer constante durante o processo. Esta impressionante maleabilidade que macromoléculas, como proteínas e ácidos nucléicos e ribonucleicos, apresentam para modular sua interação com ligantes, aparentemente só ocorre graças à capacidade

desenvolvida por polímeros de acoplar distintas interações para o efetivo controle de sua função biológica⁴. Dentre estas interações, a interação com água pode, segundo o modelo acima discutido, ter participação não desprezível.

Um exemplo da utilização deste esquema, para a determinação da variação de hidratação da Hemoglobina durante sua oxigenação, está apresentado no artigo apresentado na parte A do Capítulo III. A utilização destas duas equações, para a determinação do efeito acoplado de ligação de dois ligantes e água à Hemoglobina está exemplificada nos dois artigos subsequentes apresentados no Capítulo III.

⁴No decorrer da análise que acabamos de fazer apontamos que mesmo que a atividade do ligante não mude há a possibilidade do número de ligantes associados à macromolécula variar. Esta passa a ser uma interpretação corriqueira a partir do momento em que passamos a quantificar a conexão entre a ligação de água e outros efetores sobre a ligação de ligantes à proteínas. Entretanto, só agora eu me dei conta de que a aplicação deste conceito não está restrita só ao número de ligantes ligados, n_L , mas, também, deve ser estendido para a entropia S e o volume V da fase, variáveis estas que estão escondidas na equação de Gibbs-Duhem sob a condição de Temperatura e Pressão constantes, como segue

$$- S_1 dT + V_1 dP + d\mu_M + n_w d\mu_w + n_L d\mu_L = 0 \text{ para a fase macromolecular, e}$$

$$- S_2 dT + V_2 dP + N_S d\mu_S + N_w d\mu_w + N_L d\mu_L = 0 \text{ para a fase do volume da solução}$$

Como os casos analisados até então são condicionados à dT e $dP = 0$, estes termos desaparecem, reproduzindo as equações 36 e 37. Entretanto, nós não podemos nos esquecer que, ao considerar um sistema de fases fechado e em equilíbrio termodinâmico, a entropia total do sistema, $S_T = (S_1 + S_2)$ é máxima, e portanto

$$dS_T = d(S_1 + S_2) = 0 \text{ implicando que } dS_1 = -dS_2$$

De fato, esta é a condição de equilíbrio de fases. Entretanto, o que devemos considerar é que como a fase macromolecular troca partículas de água e ligantes com o volume da solução, pode ocorrer que a entropia destes ligantes na fase do volume da solução não seja a mesma quando diferentes solutos são utilizados para tamponar a atividade da água. Se isto ocorrer, quanto maior o ganho de entropia ao transferirem-se Δn moléculas de água da fase macromolecular para o volume da solução, mais positivo dS_2 e, portanto, mais negativo dS_1 , i.e., maior será a diminuição de entropia na fase macromolecular. Realmente, como demonstrado por J.H. Hildebrand (*J.Chem.Phys.*, 15, 225-228, (1947)), a entropia molar do solvente com volume molar v_w em uma solução com soluto de volume molar v_s , aumenta com o volume molar deste último.

Este efeito de tamanho de solutos na medida do efeito de água tem sido observado em várias reações estudadas, por nós e por outros autores.



CAPÍTULO V - Discussão

Neste capítulo, destinado à apreciação dos estudos apresentados sobre o papel da água de hidratação macromolecular sobre as características estruturais e funcionais da Hemoglobina, pretendemos traçar ainda, nossa visão perspectiva das questões suscitadas pelas observações do efeito da atividade de água sobre diversas outras reações bioquímicas que tem sido recentemente investigadas com a técnica de stress osmótico e analisadas conforme a metodologia descrita no Capítulo IV deste texto.

Análise do papel da hidratação no equilíbrio conformacional Hb em filmes: o papel da ligação de água à sítio específico e a contribuição da água de hidratação para a energia livre conformacional.

Um exemplo muito claro da contribuição água para a estabilidade conformacional de proteínas é apresentado no artigo que constitui a parte A do Capítulo II. Ali, estão relatados experimentos demonstrando que a Hemoglobina sofre mudanças conformacionais reversíveis, entre os estados metaHb e hemicromo, induzidas pela variação da atividade da água da atmosfera em equilíbrio com a proteína. Estas mudanças conformacionais são mais significantes quando reconhecemos que elas ocorrem diretamente no centro ativo da Hb, modificando drasticamente suas características funcionais, particularmente sua reatividade com oxigênio (resultados não mostrados) [38]. É notável, neste exemplo, que a perturbação estrutural em questão ocorre em uma faixa de atividade de água relativamente alta, entre 0.7 e 1 (ou em termos de umidade relativa, entre 70 e 100 %), conforme Figura II-3, pag.11. Estudos de isoterma de hidratação demonstram que nesta região de atividade de água a primeira camada de hidratação da proteína esta completa e, variação do conteúdo de água de hidratação da proteína se deve à mudanças na quantidade de moléculas de água associadas as multicamadas de hidratação [30,31]. Vários autores tem apontado que proteínas sofrem mudanças conformacionais irreversíveis quando sujeitas à desidratação / rehidratação, baseados na observação de que as isotermas de desorção e reabsorção de água apresentam histerese nítida. Os resultados espectroscópicos por nós obtidos aparentemente não mostram esta irreversibilidade para a hemoglobina. Uma



possível explicação para esta discrepância pode estar no fato de que as isotermas de hidratação medem o conteúdo de água total absorvida pela proteína, podendo ser sensível à vários níveis de mudanças estruturais, enquanto as mudanças espectrais por nós observadas refletem absorção/desabsorção de água ligadas à sítios específicos na Hb e, portanto, induzidas por um numero reduzido de moléculas de água estrategicamente localizadas na estrutura proteica. Esta possibilidade pode ser analisada determinando o número de moléculas de água associadas à transição meta-Hb hemicromo, o que é possível a partir dos dados de variação espectral, mostrados na figura 3, medida em função da atividade de água. Esta análise não esta incluída naquele artigo, mas pode ser facilmente acompanhada. A transição metaHb / hemicromo apresenta indicando uma transição entre dois estados. Nestas circunstâncias a constante de equilíbrio aparente da transição conformacional é facilmente calculada a partir da variação espectral medida [33]. Conhecendo como a constante de equilíbrio conformacional varia com a atividade de água, podemos, através da equação 29, pag. 35, calcular o numero de moléculas de água associadas à esta transição. O resultado desta análise mostra que a transição metaHb / hemicromo envolve um único sítio de ligação de água por monomero de Hb cuja ocupação estabiliza a estrutura terciaria da metaHb. Nossos resultados não permitem localizar este sítio conquanto saibamos que este sítio não é a 6a. posição de coordenação do ferro-III, por comparação com resultados obtidos com desoxi-Hb [39]. Entretanto, estes dados permitem calcular a constante de afinidade da água por este sítio estrutural e, considerar o possível mecanismo para a transição conformacional observada. Dado que a equação 29 indica a existência de um único sítio responsável pela transição, podemos escrever a constante de associação aparente da água à este sítio como

$$k_w = [\text{meta-Hb}]/[(\text{hemi-Hb}) \cdot [a_w]]$$

O valor desta constante de associação iguala-se, segundo a equação acima, ao valor da atividade da água onde se observa 50% da transição conformacional. Conforme o gráfico da figura 3, pág. ___, este valor é aproximadamente igual a 0,93 e,

$$k_w = 1 / 0.93 = 1,075$$



A diferença de energia livre entre a água ligada ao sítio e a água livre, correspondente à este valor de constante de associação, é dada por

$$\Delta G_w = -RT \cdot \ln(k_w) \approx -43 \text{ cal/mol de água/monomero de Hb}$$

É interessante notar que esta variação de energia de ligação de água é bastante pequena, ainda mais se considerarmos que a ocupação do sítio em questão é responsável pela estabilização de diferentes conformações da Hb. Cabe perguntar como uma perturbação energética tão pequena é capaz de induzir mudanças conformacionais tão significativas na região do grupo heme, o centro ativo da Hb. Uma explicação possível é considerarmos que a reorganização da primeira camada de hidratação, que acompanha a transição conformacional, seja a fonte de energia de cooperação acoplada à esta transição. De fato, a existência de mecanismos de transdução de energia de cooperação associados à energia armazenada na estrutura de proteínas e, disparados pela ligação de ligantes, não é um fato novo. A própria Hb usa energia armazenada nos contatos moleculares entre os dímeros para, com a mudança de conformação entre os estados R e T disparada pela ligação de O_2 , aumentar a afinidade da proteína por este ligante [40]. Se esta suposição é válida para a transição meta / hemicromo, não só uma molécula de água estaria envolvida energeticamente nesta transição conformacional, mas, dezenas delas. Se cada uma contribui com cerca de 40 cal por mol para a reação, a participação de poucas dezenas de moléculas de água pode facilmente gerar uma variação de energia livre da ordem de kilocalorias, energia suficiente para induzir a transição conformacional em questão.

Análise do papel da hidratação em alosterismo: o efeito da atividade de água sobre as características energética da oxigenação da Hemoglobina em solução.

A seguir, passamos a considerar os resultados das investigações do efeito da atividade de água sobre as propriedades funcionais de Hb em solução, descritos nos três artigos que compõem o Capítulo III desta tese, e, que demonstram a participação de cerca de 70 moléculas de água na transição entre as estruturas oxi e desoxi da Hb.



Os estudos que descrevem o efeito de atividade de água sobre as características espectrais da Hb em filmes indicam uma participação energética coletiva das moléculas de água da primeira camada como fonte de energia livre para a transição meta / hemicromo. A extensão natural destes estudos foi passar a estudar o efeito da variação da atividade de água sobre as propriedades funcionais de Hemoglobina em solução. Neste meio, a Hb tem sua afinidade por oxigênio determinada por um mecanismo de controle alostérico, que faz uso do equilíbrio entre pelo menos duas conformação distintas da proteína: a conformação desoxi T e a conformação oxi R. Este equilíbrio esta sujeito ao controle de diversos ligantes, que, ao se ligarem diferencialmente entre estruturas distintas da proteína, alteram a estabilidade relativa entre estas conformações, aumentando ou diminuindo a afinidade global da Hb pelo O_2 . Dada a ocorrência de mudanças conformacionais e consequentes mudanças de hidratação, a atividade da água poderia desempenhar um papel no controle da afinidade da Hb pelo oxigênio. Para investigar esta proposição, foram estudados o efeito da adição de diversos solutos neutros, como açúcares e poliois, à solução de Hb sobre sua afinidade por oxigênio. O primeiro artigo reproduzido no Capítulo III descreve os resultados obtidos. Em síntese, a contribuição descrita neste trabalho foi: a) demonstrar que o efeito da adição de solutos à solução sobre a afinidade da Hb por O_2 é um efeito indireto, via variação da atividade da água, e; propor métodos para analisar quantitativamente o efeito de solutos sobre a oxigenação da Hb que permitiram que cerca de 70 moléculas de água ligam se à Hb com a ligação de 4 moléculas de O_2 . Pela primeira vez, foi possível determinar a variação de hidratação durante uma reação alostérica e correlacionar esta medida com dados estruturais. A ligação de 70 moléculas de água à estrutura oxi-R a mais que à estrutura desoxi-T ésta de acordo com a diferença de superfície acessível ao solvente entre estas estruturas da Hb, quantidade esta calculada com base nas estruturas cristalográficas destas duas formas da proteína. Ao determinarmos a variação de hidratação acoplada à mudança de conformação induzida pela ligação de O_2 à Hb pode-se também determinar a contribuição energética, associada à estas moléculas de água, para a estabilização do estado desoxiHb em soluções com solutos. Estes estudos iniciais deram origem à outros estudos, onde estendemos o tratamento termodinâmico originalmente proposto para analisar situações mais complexas onde o soluto, além de variar a atividade da água, também pode se ligar diferencialmente à Hb e, assim, alterar a afinidade da proteína



pelo O_2 tanto por ligação diferencial de soluto quanto de água às conformações oxiHb e desoxiHb. Dois destes trabalhos foram apresentados nesta compilação, e compõem as partes B e C do capítulo III. Esta série de trabalhos, demonstrou que os resultados obtidos com método de stress osmótico uma vez submetidos à uma análise termodinâmica rigorosa, pode fornecer informações importantes sobre o papel da água de solvatação em reações bioquímicas e, auxiliar na compreensão das relações entre a estrutura e a função de macromoléculas biológicas.

Análise do papel da hidratação em reações bioquímicas diversas

A importância da água como agente energético ativo em reações bioquímicas é ubíqua. Ela não está restrita à hemoglobina. É largamente conhecido que sua substituição por outros solventes frequentemente desestabiliza a estrutura de proteínas e enzimas; que soluções aquosas com diferentes solutos induz diferentes perturbações sobre as propriedades estruturais e funcionais de proteínas e ácidos nucleicos, indo da completa desnaturação ao aumento da reatividade ou da estabilidade conformacional destas macromoléculas. Dissecar estas propriedades e descobrir os mecanismos de ação do solvente aquoso sobre moléculas biológicas tem sido um objetivo longamente perseguido. Diversas estratégias experimentais tem sido elaboradas para investigar a energética de ligação de água à proteínas, desde a mais simples que é a obtenção de isotermas de hidratação de macromoléculas na forma de pó ou filmes [30], até experimentos de partição de pequenas moléculas como amino-ácidos, nucleotídeos e ácidos graxos entre a fase aquosa e cristalina [41] ou, entre a fase aquosa e orgânica [42]. Adicione-se à estas técnicas, medidas de estabilidade estrutural de proteínas mutantes com o objetivo de modificar o seu conteúdo hidrofóbico ou hidrofílico [43], e, medidas da perturbação do potencial químico de proteínas em solução pela adição de solutos [34,45], além de uma infinidade de estudos teóricos que buscam definir um potencial de ligação de água ou atribuir parâmetros fenomenológicos para a estabilização de estruturas associados à maior ou menor exposição de grupos protéicos ao solvente [45].

As metodologias acima arroladas, entretanto, não propiciam quantificar diretamente o número de moléculas de água associadas à reações bioquímicas que ocorrem



em soluções. Portanto, não possibilitam, também, a determinação da contribuição energética da água para a diferença de energia livre entre diferentes estados de conformação, saturação e/ou associação de macromoléculas em solução. Diferentemente, nossa proposição de usar os modelos de linkage químico e a equação de Gibbs-Duhem permite a obtenção destes parâmetros a partir de medidas da variação de energia livre de reações em função da atividade de água, ajustada pela adição de solutos. Estes modelos, apresentados no Capítulo IV são absolutamente gerais, e, não fazem nenhuma distinção entre reações com macromoléculas biológicas ou reações entre moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas que se processem em solução aquosa. A relativa insistência com relação às reações envolvendo macromoléculas tem, entretanto, justificativa no fato de que as variações de hidratação associadas às estas reações são bastante mais acentuadas que aquelas envolvendo pequenas moléculas. Provavelmente, estas variações significativas de hidratação que acompanham reações bioquímicas podem perfeitamente servir como uma fonte de energia cooperativa para reações e, estar envolvidos em processos de reconhecimento e especificidade molecular. Um exemplo desta possível transdução de energia química foi apresentado no início deste capítulo. Ali, avaliamos que a energia de ligação de uma molécula de água a um sítio estrutural da Hb é de cerca de 40 calorias por mol. Notamos que esta é uma variação de energia bastante pequena, insuficiente para induzir a transição conformacional meta / hemicromo. Entretanto, se esta transição conformacional, disparada pela ligação de água a um sítio específico, estiver acoplada com o rearranjo da primeira camada de hidratação devido à mudança conformacional, a pequena contribuição energética de cada molécula de água multiplica-se pelo grande número de moléculas de água rearranjadas na transição.

19.12.14.16 A contribuição energética da hidratação macromolecular para o potencial químico de proteínas, ácidos nucleicos e ribonucleicos em solução foi descrita com base nos modelos termodinâmicos apresentados no Capítulo IV. A equação 24 descreve este potencial, e prediz que o potencial químico da macromolécula em solução aumenta com o aumento do número de moléculas de água associadas à macromolécula e, com a diminuição da atividade de água. Este comportamento tem sido medido por outros autores, com técnicas de densimetria [34] e equilíbrio de dialise [45], desde o final da década de 60, em soluções



ternárias de água, proteína e osmólitos⁴. O modelo apresentado também reproduz a linearidade observada entre a variação da energia livre de várias reações com a variação do potencial químico da água, observada quando a atividade de outros ligantes à macromolécula é mantida constante [34]. Outra qualidade, intrínseca aos modelos apresentados, é que eles permitem descrever reações mais complexas, envolvendo a ligação concomitante de ligantes e moléculas de água, quando consideramos interações de proteína com ligante de baixa afinidade. Nestas circunstâncias, a medida da interação do ligante com a macromolécula requer a utilização de altas concentrações deste último. Consequentemente, não só a atividade do ligante varia mas também a atividade da água. Dois exemplos deste uso são relatados nos artigos mostrados nas partes B e C do Capítulo III. Particularmente, deve se destacar a utilização deste formalismo para a análise criteriosa da possibilidade de ligação dos solutos utilizados para o ajuste da atividade da água. Como havíamos adiantado, um dos aspectos que mais despertavam ceticismo em relação à utilização do método de stress osmótico para a investigação do papel da solvatação em reações biológicas era a inexistência de modelos termodinâmicos que permitissem a análise rigorosa da possibilidade de o soluto agir ligando-se diretamente à macromolécula, ou indiretamente, através da perturbação da atividade de água. A teoria apresentada permite esta análise como demonstrado no artigo apresentado na parte C do Capítulo III.

Apesar do pouco tempo transcorrido desde a proposição de utilização da técnica de stress osmótico acoplada à análise termodinâmica apresentada no Capítulo IV, esta metodologia já tem sido utilizada para investigar a contribuição da hidratação em diversas reações bioquímicas, além da de oxigenação de Hb. Dentre elas, podemos citar os estudos do efeito de água sobre : a interação de drogas e proteínas com DNA [9,12,14,16,17], a cinética de reações enzimáticas [8,10], a estabilidade e o enovelamento de proteínas [11,46], a transição conformacional em DNA [13], o transporte de elétrons em citocromo [7], o grau de superenovelamento de plasmídeos [47], o potencial de oxi-redução

⁴ No presente estágio, estamos considerando que a concordância entre o comportamento previsto pela equação 24 e os resultados de medidas densimétricas do potencial químico de proteínas na presença de osmólitos é apenas qualitativa. Uma comparação quantitativa pode ser realizada procedendo a análise quantitativa dos resultados publicados na literatura com a utilização da referida equação.



de hemoproteínas [19], entre outros. Os resultados até então compilados já permitem reconhecer algumas características gerais do efeito de stress osmótico sobre estas reações bioquímicas:

1) A relação linear entre a variação da energia livre de reação com a variação da atividade de água é uma característica comum à estas reações. Em alguns poucos casos, não publicados, tem sido observado que à altas concentrações de solutos dissolvidos observa-se uma tendência de reversão do efeito com o aumento da concentração do soluto.

Esta última observação não tem, ainda, uma explicação satisfatória e especula-se que a diminuição muito acentuada da atividade de água possa estabilizar outras estruturas protéicas, normalmente não observadas em soluções com atividade de água mais altas. Entretanto, outras possibilidades, como mudanças da atividade dos ligantes com o aumento da concentração de solutos também devem ser consideradas. Porém, desde que se mantenha a_w acima de 0.96 o efeito linear é característico.

2) Em alguns casos, como a interação de Actinomicina à sítios de ligação de baixa afinidade em DNA de timo de bezerro [12], na interação do repressor *gal* à uma sequência inespecífica de bases de DNA e [17], na interação de RNA com 2'-3'-Citidina mono Fosfato [10], a energia livre de reação é insensível à mudanças na atividade de água.

Nestes três exemplos a insensibilidade da energética da reação com a atividade de água já esta relativamente bem estabelecida. É interessante notar que, aparentemente, esta não susceptibilidade da interação de droga e proteína com certas sequências de DNA e do substrato com RNA esta associada com a não especificidade destas interações. Por outro lado, ao considerarmos a interação de Act-D e *gal* com as sequências específicas de ligação e, a interação da RNase com RNA, que também é específica, o efeito de água é claro e mensurável. Ao desenvolvermos os modelos de interação de água com macromoléculas descritos no Capítulo IV não foi necessário fazer nenhuma suposição à cerca de especificidade ou não da ligação. Entretanto, é notável que o método de stress osmótico, junto à análise termodinâmica proposta, possa eventualmente ser desenvolvido a ponto de



podermos relacionar a especificidade de reconhecimento molecular e a energética de solvatação destes sítios.

3) Para as reações: de oxigenação de Hemoglobina humana e bovina [2-6,48]; de ligação de glucose à Hexokinase [8]; de oxi-redução de Hb [19]; equilíbrio de associação dímero / tetrâmero de Hb [49], entre outras, a variação de hidratação aparentemente medida independe do tamanho do soluto utilizado para tamponar a atividade de água. Entretanto, para uma série de outras reações, como: re-enovelamento de proteínas [11]; intercalação de Actinomicina à DNA [12]; cinética de clivagem de RNA por RNase [10] e, transição B-Z em DNA sintético [13], apesar da relação de linearidade entre a energia livre de reação com o potencial químico da água ser mantida para um dado soluto, o que permite determinar a variação de hidratação aparente, esta sensibilidade, ou seja a variação de hidratação aparente cresce proporcionalmente com o volume específico do soluto usado para tamponar a atividade da água em solução.

A dependência linear da variação de hidratação medida com o tamanho, ou volume molar, do soluto utilizado para tamponar a atividade de água é um fenômeno claramente demonstrado em pelo menos 3 reações distintas: re-enovelamento de apoMioglobina em solução ácida, intercalação de Act-D à sítio de interação forte do DNA e na transição B-Z de polímeros sintéticos de DNA. Além disto, este efeito está sendo observado para a interação entre RNase e RNA. Deve-se notar que, entre outros aspectos, este efeito está relacionado com interações específicas seja na re-estruturação de proteínas ou DNA, seja na interação de droga ou proteína com ácidos nucleicos e ribonucleicos.



CAPÍTULO VI - Conclusões e Perspectivas

O conjunto destas observações demonstram que a contribuição da hidratação para a energética de reações bioquímicas não é desprezível e, nem mesmo, restrita à alguns poucos tipos de interação. Esta contribuição parece estar presente em uma gama bastante representativa das diversas reações que ocorrem para o controle e funcionamento do sistema biológico. Como insistimos anteriormente, a termodinâmica por nós proposta para a descrição destes fenômenos é adequada para a sua quantificação. Do ponto de vista formal, a determinação termodinâmica dos agentes que participam ativamente de uma dada transformação é independente de modelos. Entretanto, a racionalização dos mecanismos moleculares envolvidos em uma transformação termodinâmica requer a elaboração de modelos. O modelo por nós apresentado, permite, ao considerar o fenômeno de exclusão do soluto da fase macromolecular, compreender o mecanismo pelo qual perturbações na atividade de componentes da fase do volume da solução são transmitidas para a fase protéica, via a troca de moléculas de água e ligantes entre estas duas fases, e, quantificar o trabalho químico exercido sobre a macromolécula através da determinação do número de moléculas de água transferidas de uma fase para a outra. Entretanto, não sabemos até que ponto este mesmo modelo pode ser elaborado para explicar porque reações aparentemente inespecíficas entre proteínas e DNA com ligantes são insensíveis à mudanças na atividade da água, e, porque para uma série de reações importantes como enovelamento de proteínas e a interação drogas e proteínas com DNA e RNA a medida da variação da hidratação nestas reações dependente do volume molar do soluto utilizado nestes experimentos para sondar o efeito de água.

As questões acima formuladas apontam para a necessidade de aprofundar na elaboração e interpretação do modelo termodinâmico proposto para descrever e quantificar o papel da água sobre a funcionalidade de macromoléculas biológicas. Apesar de não termos respostas à estas questões, os estudos por nós iniciados e, logo seguido por outros pesquisadores em seus sistemas de estudo próprios, já permitiu a observação da intermediação da água no controle do mecanismo de ação alostérico de proteínas e, de sua



participação efetiva no mecanismo de reconhecimento molecular, seja ela favorecendo a interação de uma proteína com ácidos nucleicos seja ela favorecendo o enovelamento proteico. Um dos desafios que o método de stress osmótico no coloca, entretanto, é o de responder o porque o efeito de água depende linearmente do tamanho dos solutos presentes em solução. Esta resposta, provavelmente, poderá nos levar a conhecer como o meio intracelular, tipicamente congestionado por macromoléculas, metabólitos, sais e osmólitos, contribue, via modulação da atividade da água, para o controle das transformações bioquímicas que mantêm estes sistemas vivos. Um dos paradigmas da vida biológica é considerar a água elemento insubstituível. O outro é que a organização biológica se produz e reproduz alimentada pelo aumento de entropia do universo. Quiça, estes dois paradigmas estariam vinculados um ao outro via a troca de moléculas entre a macromolécula reagente e o volume da solução, conforme sugerido pela nota de rodapé 3, página 42 ?

9. C.R.Robinson, S.G.Sligar, *J.Mol.Biol.*, 234, 302 (1993)

10.R.C. Cactano, M.F. Colombo, in *XXVII Reunião Anual da SBBq*, Caxambu-MG, 114 (1994)

11.M.F. Colombo, S.R. Marão, *Biophysical Journal*, 70 (2) A63 (pos) (1996)

12.J.Ruggiero Neto, M.F.Colombo, *Biophysical Journal*, 70 (2) A155 (pos) (1996)

13.R.S.Preisler, H.H. Chen, M.F.Colombo, Y.Choe, B.J.Short Jr., e D.C.Rau, *Biochemistry*, 34, 14400-14406 (1995)

14.Ruggiero Neto, J.; Covissi, U.D.S. and Colombo, M.F. *Biophysical Journal*, 68(2), A408 (1995)

15.V.A.Parsegian, R.P.Rand, D.C.Rau, *Methods in Enzymology*, 259, 43-94 (1995)

16.C.R.Robinson, S.G.Sligar, *Methods in Enzymology*, 259, 395-426 (1995)

17.Gamer, M.M. e Rau, D.C., *EMBO J.*, 14, 1257 (1995)

18.Neves, A.C.D.; Colombo, M.F. in *XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 06 a 09/05/95, Caxambu-MG, p. 176. (1995)

19.Colombo, M.B.R.; Colombo, M.F. in *XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 06 a 09/05/95, Caxambu-MG, p. 176. (1995)

20.R.P.Rand, *Science*, 256, 618 (1992)

21.Wyman, J., *Adv.Protein Chem.*, 29, 223 (1964)



REFERÊNCIAS

1. M.F.Colombo, e R. Sanches, *Biophysical Chemistry*, 36, 33-39. (1990)
2. M.F. Colombo, D.C. Rau, e, V.A. Parsegian, *Science* 256, 655-659. (1992)
3. M.F. Colombo, D.C. Rau, e, V.A. Parsegian, *Science* 259 (5099), 1336, (1993)
4. M.F. Colombo, D.C. Rau, e, V.A. Parsegian, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 91, 10517-1052 (1994)
5. V.A. Parsegian, R.P. Rand, M.F. Colombo, e D.C. Rau, in *Biomembrane Electrochemistry, ACS Advances in Chemistry Series*, vol. 235, eds. Blanck.M. e Vodyanov, I., 177-195 (1994)
6. M.F. Colombo, e O. Bonilla-Rodriguez, *J.Biological Chemistry*, 271, 4895-4899 (1996)
7. J.A. Kornblatt e G. Hui Bon Hoa, *Biochemistry* 29, 9370(1990)
8. R.P. Rand, N.L. Fuller, P. Butko, G. Francis, P. Nicholls, *Biochemistry*, 32, 5925 (1993)
9. C.R.Robinson, S.G.Sligar, *J.Mol.Biol.*, 234, 302 (1993)
- 10.R.C. Caetano, M.F. Colombo, in *XXIII Reunião Anual da SBBq*, Caxambu-MG, 114 (1994)
- 11.M.F. Colombo, S.R. Marão, *Biophysical Journal*, 70 (2) A63 (pos) (1996)
- 12.J.Ruggiero Neto, M.F.Colombo, *Biophysical Journal*, 70 (2) A155 (pos) (1996)
- 13.R.S.Preisler, H.H. Chen, M.F.Colombo, Y.Choe, B.J.Short Jr., e D.C.Rau, *Biochemistry*, 34, 14400-14406 (1995)
- 14.Ruggiero Neto, J.; Covissi, U.D.S. and Colombo, M.F. *Biophysical Journal*, 68(2), A408 (1995)
- 15.V.A.Parsegian, R.P.Rand, D.C.Rau, *Methods in Enzymology*, 259, 43-94 (1995)
- 16.C.R.Robinson, S.G.Sligar, *Methods in Enzymology*, 259, 395-426 (1995)
- 17.Garner, M.M. e Rau, D.C., *EMBO J.*, 14, 1257 (1995)
- 18.Neves, A.C.D.; Colombo, M.F. in *XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. 06 a 09/05/95, Caxambu-MG, p. 176. (1995)
- 19.Colombo, M.B.R.; Colombo, M.F. in *XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*. 06 a 09/05/95, Caxambu-MG, p. 176. (1995)
- 20.R.P.Rand, *Science*, 256, 618 (1992)
- 21.Wyman, J., *Adv.Protein Chem.*, 29, 223 (1964)



22. Wyman, J., e Gill, S.J., "*Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules.*" University Science Books, Mill Valley, 1990
23. J. Baldwin e C. Chothia, *J. Mol. Biol.* 129, 175 (1979)
24. M. Perutz, "*Mechanism of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins.*" Cambridge University Press, Cambridge, (1990)
25. C. Chothia, S. Wodak, J. Janin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 3793 (1976)
26. J. Janin e S. J. Wodak, *Biopolymers*, 24, 509 (1985)
27. A. M. Lesk, J. Janin, S. Wodak, C. Chothia, *J. Mol. Biol.*, 183, 267 (1985)
28. E. Antonini e M. Brunori, "*Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands.*" North-Holland, Amsterdam, (1971)
29. J. A. Schellman, *Biopolymers*, 14, 999 (1975)
30. I. D. Kuntz e W. Kauzmann, *Adv. Protein. Chem.* 28, 239 (1974)
31. F. Franks, *Phil Trans. T. Soc. Lond. B*, 278, 33-57 (1977)
32. J. A. Rupley, E. Gratton e G. Careri, *Trends Biochem. Sci.*, 8, 18-22 (1983)
33. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, "*Biophysical Chemistry*" Part III, Freeman, San Francisco, (1980)
34. S. Timasheff, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 67-97 (1993)
35. C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, 23, part A and B, 121 (1968)
C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, 24, part C, 1 (1968)
36. G. Castelan, "*Fundamentos em Físico-Química*", Livros Técnicos e Científicos Ed., Rio de Janeiro, (1986)
37. C. K. Mathews, K. E. van Hold, "Biochemistry", Benjamin/Cummings, Redwood City, (1990)
38. Yancey, M. E. Clarck, S. C. Hand, R. D. Bowlos, G. N. Somero, *Science* 217, 1214-1222 (1982)
39. M. F. Colombo, Te se de Doutorado, IFQSC-USP, São Carlos (1988)
40. J. M. Holt, G. K. Ackers, *Methods in Enzymology*, 259, 1-18 (1995)
41. A. Ben-Naim, "*Hydrophobic Interactions*" Plenum Press, New York
42. C. Tanford, "*The Hydrophobic Effect*", 2nd.ed. Wiley, New York (1980)
43. N. Pace, "*Methods in Enzymology*" 259, 538-554 (1995)
44. Y. Liu, D. W. Bolen, *Biochemistry* 34 12884-12891 (1995)



- 45.H.B.Bull, K.Breese, *Biopolymers*, **17**, 2121-2131 (1978)
- 46.M.F.Colombo, D.C.Rau, *Biophys. J.*, **61**, 344 (abstr.) (1992)
- 47.J.Ruggiero Neto, *comunicação pessoal*
- 48.F.A.V.Seixas, G.O.Bonilla-Rodrigues, M.F. Colombo, in *XXVa. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*, 4-7 Maio, abst.M50, 127 (1996)
- 49.M.F.Colombo, G.O.Bonilla-Rodrigues, *Biophys. J.*, **68(2)** , A338 (pos) (1995)



