

VANESSA DE CÁSSIA TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE
INOSITOL HEXAFOSFATO E CLORETO
COM HEMOGLOBINA HUMANA:
ASPECTOS ENERGETICOS E
ESTRUTURAIIS.**

São José do Rio Preto-SP

2010

VANESSA DE CÁSSIA TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE
INOSITOL HEXAFOSFATO E CLORETO
COM HEMOGLOBINA HUMANA:
ASPECTOS ENERGETICOS E
ESTRUTURAIIS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de São
José do Rio Preto, para a obtenção do título de
Mestre em Biofísica Molecular

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO FRANCISCO COLOMBO

São José do Rio Preto-SP

2010

Silva, Vanessa de Cássia Teixeira da.
Caracterização da interação de inositol hexafosfato e cloreto com hemoglobina humana : aspectos energéticos e estruturais / Vanessa de Cássia Teixeira da Silva - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.
81 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcio Francisco Colombo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Hemoglobina. 3. Ânions. I. Colombo, Marcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU - 577.32

VANESSA DE CÁSSIA TEIXEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE
INOSITOL HEXAFOSTATO E CLORETO
COM HEMOGLOBINA HUMANA:
ASPECTOS ENERGETICOS E
ESTRUTURAIS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de São
José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre
em Biofísica Molecular

COMISSÃO EXAMINADORA: Prof. Dr. Marcio Francisco Colombo
Professor Doutor
UNESP- São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro
Professor Doutor
Universidade Federal de Minas Gerais -UFMG

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
Professor Doutor
Universidade Estadual do Maringá-UEM

São José do Rio Preto, 22 de Janeiro de 2010

À minha mãe Aparecida, meu exemplo de amor e simplicidade...

Meus sinceros agradecimentos...

Ao Professor Marcio Francisco Colombo, pela amizade e orientação a este trabalho.

Aos Professores, funcionários e alunos do Departamento de Física, pela ajuda à minha formação científica.

À Priscilla Tosqui, amiga, colega de laboratório, que sempre torceu e incentivou meu trabalho, tenho orgulho de conviver e aprender com você.

Aos meus colegas de laboratório André e Nayara, por todas as discussões com cafezinhos que fizemos.

À Nadia, Carmélia e Ana Roberta, que aguentaram todos os choros de felicidades e tristezas.

Aos meus amigos e companheiros de profissão Aline, Ana Cristina, Ana Z, Bruna, Brumas, Carol, Cíntia, Elen, Gabriel, Hill, Lílian, Paulo, Paulinha e Rodrigo, a saudade é enorme.

Aos meus amigos Anderson, Mateus e Leandro, que vibram com todas as minhas vitórias.

Aos meus irmãos Luis, Valéria e Vânia e aos cunhados Patty, Ricardo e Anderson que sempre ficaram na torcida pela caçulinha.

Aos meus sobrinhos Yasmin e Gabriel, onde minha energia se renova.

Ao Gustavo, que me mostra sempre o lado bom da vida.

À minha mãe Aparecida, meu exemplo de ternura, responsável por todas as orações e incentivos durante essa jornada, que me ensinou a ter paciência e a nunca desistir dos meus objetivos.

Ao meu pai que cumpriu sua missão formando uma maravilhosa família.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Deus, que me abençoa todos os dias com a graça da minha vida.

“Um dia sem rir é um dia desperdiçado.”
Charles Chaplin

RESUMO

A ligação do O_2 à Hemoglobina (Hb) é um processo regulado por interações alostéricas. Os íons Inositol hexafosfato (IHP) e cloreto, e prótons, são efetores alostéricos que estabilizam a Hb na estrutura quaternária T, diminuindo a afinidade da proteína pelo O_2 em meio alcalino. A ligação de IHP também altera a cooperatividade de algumas hemoglobinas como, por exemplo a hemoglobina desArg, uma variante da HbA α da qual o resíduo arginina 141 das cadeia alfas foram retirados enzimaticamente. Estas argininas são prováveis sítios de interação com íons cloreto. Neste trabalho investigou-se a influência que a ligação de ânions Cl^- e/ou IHP à Hb nas propriedades funcionais e conformacionais da proteína. Foi determinado o efeito destas interações na afinidade e cooperatividade de ligação de oxigênio à proteína, na liberação de prótons com a oxigenação (efeito Bohr), e na conformação da proteína. O papel de resíduos específicos nestes efeitos foi investigado comparando resultados obtidos com HbA α , Hb-desArg, e Hb Chesapeake (R92L), um mutante natural na qual a arginina 92 esta substituída por leucina.

Os resultados mostraram que a retirada do resíduo C-terminal da cadeia alfa, arginina 141, suprimiu a cooperatividade da hemoglobina, diminui o número de prótons liberados durante a oxigenação, e que esta liberação de prótons foi a mesma na presença ou ausência de íons cloreto. Ainda, a retirada deste resíduo não interferiu no efeito Bohr dependente de IHP. Os resultados mostraram que a saturação de oxigênio ligados à HbA α na presença de IHP não induziu a mudança na estrutura quaternária observada na ausência deste ânion, e na sua presença em meio com NaCl. Apesar disto, a cooperatividade da ligação é mantida. A arg-141 α tem papel fundamental na estabilização pelo IHP da estrutura quaternária T da proteína na forma oxigenada ou desoxigenada. Esta conclusão é justificada pelos resultados de oxigenação da Hb desArg determinados na presença de IHP, com e sem NaCl. Ensaio calorimétricos da interação de IHP com as três espécies de Hb, realizados através da Titulação Calorimétrica Isotérmica ratificam a importância da Arg-141 na estabilização do estado T-oxigenado. A correlação entre os resultados funcionais e o das medidas espectrofotométricas da transição quaternária R-T

mostraram que a ligação cooperativa de O_2 à Hb pode ocorrer sem mudanças estruturais quaternárias, e que a ligação de O_2 pode induzir mudança quaternária mas ligar-se não cooperativamente à proteína. Portanto, mudança estrutural quaternária da Hb não é condição necessária para a cooperatividade de ligação de O_2 à proteína, e esta mudança estrutural pode ocorrer sem que a ligação de O_2 seja cooperativa.

ABSTRACT

The hemoglobin (Hb) oxygenation is a molecular process regulated by allosteric interactions. Inositol hexaphosphate (IHP), chloride and protons are heterotropic effectors that stabilizes the deoxy state, the quaternary structure T, decreasing O_2 affinity in alkaline solution. IHP binding also modifies cooperativity of several Hbs, such as desArg Hemoglobin, a variant form of HbA which is obtained by enzymatic cleavage of the two Arg-141 α residues. This residue has been identified to be a Cl^- binding site on Hb. This work follows up previous studies of the structure-function regulation of Hb oxygenation by anions Cl^- and/or IHP. We measured the effect of these interactions on cooperativity and oxygen affinity, protons release upon oxygenation (Bohr Effect), and protein conformation. The role of specific residues on this effect was investigated through results obtained with HbA, desArg Hemoglobin and Hemoglobin Chesapeake (R92L), a natural mutant in which Arg-92 α is changed to Leu.

The results showed that the suppression of C-terminal Arg-141 implies in non-cooperative O_2 -binding to Hemoglobin, lowering the protons released during oxygenation, and the protons release remains the same on chloride absence and presence. The removal of this residue didn't affect the Bohr Effect on IHP presence. The results showed that O_2 binding in the presence of IHP don't induce quaternary structure transition observed in the absence of anions. Nevertheless, the cooperativity was maintained. The arg-141 have a main role on IHP stabilization of oxy and deoxy protein quaternary structure T. This conclusion is supported by results desArg Hemoglobin oxygenation determined in IHP presence, with and without NaCl. Calorimeters assays of IHP interaction with three Hemoglobin species, carried through Isothermal Titration Calorimetry confirm the Arg-141 importance on oxygenated T state stabilization. The functional results and spectrophotometrical measurements of quaternary transition R-T showed that O_2 cooperativity to Hemoglobin happens without quaternary structural change, and that O_2 binding can induce quaternary change, but with an uncooperatively to protein. Therefore, quaternary structural changes of Hemoglobin isn't a necessary condition to the

cooperative oxygen binding, and this structural change happens without the cooperative binding of oxygen.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Grupo Heme 16
- Figura 2 - Molécula de Hemoglobina 17
- Figura 3 - Diagrama esquemático da mudança na estrutura quaternária com a oxigenação da hemoglobina 25
- Figura 4 - Esquema de tonômetro 38
- Figura 5 - Gráfico de titulação de ligante ao tampão e a amostra 43
- Figura 6 - Gráfico da saturação versus pO_2 da Hb A₀ 46
- Figura 7 - Gráfico do efeito do pH na oxigenação da HbA₀ 48
- Figura 8 - Gráfico do efeito Bohr da Hb A₀ 49
- Figura 9 - Gráfico de oxigenação da Hb A₀ e Hb desArg 50
- Figura 10 - Gráfico da saturação versus pO_2 da Hb desArg 51
- Figura 11 - Gráfico do efeito Bohr da Hb desArg 53
- Figura 12 - Gráfico do efeito Bohr da Hb desArg na presença de Inositol Hexafosfato (IHP) 54
- Figura 13- Gráfico da 1ª derivada da diferença entre os espectros da oxi e desoxi-HbA₀ 57
- Figura 14 - Gráfico da 1ª derivada da diferença entre os espectros da oxi e desoxi-HbA₀, região de interesse. 58
- Figura 15 - Gráfico do efeito de IHP na estrutura quaternária da Hb A₀ 59
- Figura 16 - Gráfico do efeito da concentração de IHP na estrutura quaternária da Hb A₀ 60
- Figura 17 - Gráfico do efeito de NaCl na estrutura quaternária da Hb A₀ 61
- Figura 18 - Gráfico do efeito de NaCl em conjunto com IHP na estrutura quaternária da Hb A₀ 62
- Figura 19 - Gráfico do efeito de NaCl com duas concentrações de IHP na estrutura quaternária da Hb A₀ 63
- Figura 20 - Gráfico comparativo do efeito de ânions na estrutura quaternária da Hb A₀ 64

- Figura 21 - Gráfico comparativo do efeito de ânions na estrutura quaternária da Hb desArg 65
- Figura 22 - Gráfico da variação entálpica da titulação de IHP em solução de Hb A₀ e Hb Chesapeake 68
- Figura 23 - Gráfico da variação entálpica da titulação de IHP em solução de Hb desArg 69

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1.Mecanismos de ligação de O ₂ à Hemoglobina | 20 |
| 1.2.Efetores Alostéricos | 28 |
| 2. OBJETIVOS | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 3.1.Purificação da Hb humana | 34 |
| 3.1.1. Cromatografia de troca iônica aniônica | 34 |
| 3.2.Determinação da concentração protéica | 36 |
| 3.3.Preparação da Hb desArg e Hb Chesapeake | 37 |
| 3.4.Obtenção das curvas de oxigenação | 38 |
| 3.4.1. Método Tonométrico-espectrofotométrico | 38 |
| 3.5.Titulações Calorimétricas | 39 |
| 3.6.Análise de dados | 40 |
| 3.6.1. Determinação espectrofotométrica de mudanças estruturais quaternárias | 41 |
| 3.6.2. Tratamento de dados de titulação calorimétrica | 42 |
| 4. RESULTADOS | 45 |
| 4.1.Efeito Bohr | 45 |

| | |
|---|----|
| 4.2.Determinação espectrofotométrica de mudanças estruturais quaternárias | 56 |
| 4.3.Titulação calorimétrica de IHP à forma oxigenada da HbAo, Hb desArg(Arg- α 141suprimida) e Hb Chesapeake (R92L) | 67 |
| 5. DISCUSSÃO | 70 |
| 6. CONCLUSÕES | 74 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 75 |

1-INTRODUÇÃO

O oxigênio (O_2) é uma fonte primária para o processamento da energia biológica. Em organismos complexos o aporte de oxigênio ao meio celular se dá pela respiração, mecanismo que envolve trocas gasosas entre o meio intracelular e sua vizinhança externa próxima. Este processo é espontâneo, e ocorre por difusão do gás na direção do gradiente de concentração, isto é, do meio de maior para o meio de menor concentração do gás. A troca de gases entre células biológicas ocorre, portanto, de maneira passiva, pela passagem de gases através da uma membrana semipermeável que separa o meio de maior do meio de menor concentração.

Alguns micro-organismos são capazes de captar oxigênio do meio em que se encontram, gasoso ou líquido, por simples difusão. O aparecimento de formas de vida mais complexa exigiu o surgimento de sistemas especializados para captação de O_2 e sua distribuição pela massa corpórea.

No sistema respiratório-circulatório dos humanos, o sangue circula entre os pulmões, captando O_2 do meio de alta concentração, e o liberando nos tecidos, com baixa concentração de O_2 . Neste sistema, os glóbulos vermelhos, desempenham papel fundamental. Nestes encontra-se a hemoglobina (Hb), proteína especializada na ligação reversível de O_2 . Sua presença aumenta cerca de 100 vezes a concentração de O_2 transportada pelo sangue em relação à concentração de O_2 dissolvida no plasma. Por outro lado, a afinidade da Hemoglobina por oxigênio varia: ela é mais alta nos pulmões e mais baixa nos tecidos. Isto se deve ao fato que a Hb também transporta uma parte de CO_2 produzido nos tecidos para eliminação nos pulmões. Entender os mecanismos moleculares que regulam a afinidade da Hb por O_2 , adequando-a a função de transportar o oxigênio necessário a manutenção do metabolismo, tem sido um desafio (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

As propriedades funcionais da hemoglobina têm sido estudadas há pelo menos 100 anos. Ainda em 1903-1904, Karl A. Hasselbach and August Krogh determinaram, sob a orientação de Christian Bohr, a influência de CO_2 na interação

de oxigênio com a Hemoglobina. Estes experimentos demonstraram o aumento da concentração do CO₂ favorece a liberação de O₂. “Esta foi a primeira demonstração que as propriedades funcionais da hemoglobina dependem de uma substância que esta permanentemente presente no sangue” (IRZHAK, L. I.,2005). Ainda segundo Irzhah, Bohr concluiu que esta dependência é biologicamente importante. Posteriormente, ficou demonstrado que a afinidade da Hb aumenta com o aumento do pH na região alcalina. Dado que a dissolução de CO₂ na solução diminui o pH, este efeito ficou conhecido como efeito Bohr.

O fato da saturação da Hb por O₂ diminuir com o aumento do pH implica que prótons são liberados devido a ligação de O₂ à proteína, como mostra a equação 1:



Hill em 1910 propõe que a ligação de n ligantes ocorre de forma orquestrada.

K



Adair em 1925 propõe que a ligação de O₂ é seqüencial, propondo quatro diferentes constantes para a saturação da hemoglobina, conhecidas como constantes de Adair, conhecido como Modelo de Adair.



Estes estudos de ligação de O₂ à Hb levaram a uma descoberta importante: que a ligação de O₂ é cooperativa, isto significa que a afinidade da ligação do primeiro oxigênio é menor do que a ligação do próximo e diminui até a saturação com o quarto e ultimo oxigênio possível de se ligar a molécula de hemoglobina (ADAIR, 1925).

A cooperatividade da ligação foi logo reconhecida como um fator, junto com o efeito Bohr, fundamental para o exercício da função de transportadora de O₂ pela proteína. Explicar o mecanismo cooperativo da Hb, considerando as interações moleculares envolvidas no processo de ligação de O₂ levou a determinação de sua estrutura (PERUTZ, 1970). O conhecimento acumulado permite descrever e investigar este mecanismo correlacionando a estrutura da proteína, e as mudanças

conformacionais induzidas nesta estrutura pela ligação de ligantes, com a sua função biológica.

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias globínicas ($\alpha_2\beta_2$). A cadeia α contém 141 resíduos de aminoácidos, e a cadeia β contém 146 resíduos.

Cada cadeia da hemoglobina é formada por oito segmentos de α -hélices acomodadas em um arranjo globular. Esta estrutura cria um bolso hidrofóbico no interior do glóbulo protéico, característica estrutural encontrada em todas as hemoproteínas. Este bolso acomoda o grupo prostético heme (figura1), o grupo não protéico é formado pela protoporfirina IX complexada a um íon ferro 2^+ no centro.

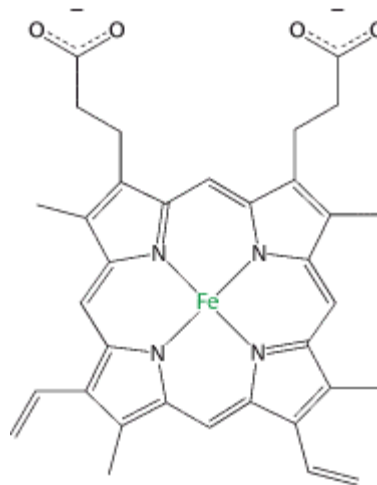


Figura 1: Grupo heme (STRYER et al. 2002)

Um exemplo de estrutura hemoprotéica simples é a mioglobina (Mb). Esta é uma proteína monomérica encontrada nos músculos e é responsável pelo armazenamento de O_2 . A ligação de O_2 à Mb ocorre não cooperativamente, diferente do que acontece com a Hemoglobina.

A figura 2 mostra a estrutura do arranjo quaternário das cadeias da molécula de Hemoglobina humana A_0 . Na hemoglobina, as cadeias α e β formam um dímero muito estável por interações não covalentes; dois destes dímeros se associam não covalentemente para formar a estrutura quaternária, tetramérica da proteína (VOET et al., 2000).



Figura 2: Hemoglobina humana (**HbA₀**). Esta proteína é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias α (cinza claro e cinza escuro) e duas cadeias β (marrom claro e marrom escuro) com 141 e 146 resíduos de aminoácidos cada uma, respectivamente. Figura extraída de Garrett e Grisham, 1995.

Como mencionado anteriormente a ligação de O_2 a Mb não é cooperativa, assim como é não cooperativa a ligação de O_2 ao dímero isolado da Hb ($\alpha\beta$) (ACKERS et al., 1976). Embora existam hemoglobinas diméricas cooperativas, por exemplo a Hb homodimérica de *Scapharca inaequivalvis* (CHIANCONE et al., 1981), a cooperatividade da ligação de O_2 às Hbs de mamíferos e da maioria das Hbs dos organismos mais complexos, requerem o arranjo tetramérico da proteína. Portanto, o arranjo quaternário das Hbs é uma condição geral, mas não exclusiva, para que a ligação de O_2 à Hbs seja cooperativa.

O primeiro modelo de cooperatividade de sucesso, relacionando diferentes estruturas protéicas (estrutural) ao controle da reação (funcional) foi proposto por Monod, Wyman e Changeaux (MWC) em 1965. Neste modelo, a cooperatividade da ligação de O_2 a Hb é atribuída a existência de dois arranjos quaternários da estrutura, um de baixa afinidade pelo O_2 , estado T (tenso), e um de alta afinidade, estado R (relaxado). A outra hipótese do modelo é que o equilíbrio entre os estados alostéricos T e R se desloca para R com o aumento da saturação da proteína.

Embora o modelo de MWC não explique o efeito Bohr, isto é, a dependência de pH na afinidade da Hb por O_2 , a previsão do modelo da existência de dois

estados de conformação da Hb, um ligado e outro desligado, foi confirmado com a determinação das estruturas cristalográficas de Hb totalmente oxigenada e desoxigenada (PERUTZ, 1970). Com isto o modelo de MWC ganha respaldo experimental importante. Na mesma época, Perutz propõe seu modelo estereoquímico para descrever como a mudança da estrutura T para R seria disparada pela ligação de O_2 , e eventualmente descrever os resíduos de aminoácidos da estrutura da Hb responsáveis pelo efeito Bohr. A descrição detalhada dos modelos de ligação de O_2 à Hb encontra-se na seção 1-1.

A análise das diferenças estruturais entre as estruturas cristalográficas da oxiHb (hemoglobina oxigenada) e da desoxiHb (hemoglobina desoxigenada) levou Perutz a sugerir quais seriam os possíveis resíduos de aminoácidos envolvidos no Efeito Bohr, e responsáveis pela estabilização da configuração T em relação a R. Segundo este modelo estereoquímico, Perutz atribui a maior estabilidade da estrutura da desoxi-Hb na conformação T que na conformação R, às pontes salinas observadas na estrutura cristalográfica da desoxi-Hb e ausentes na estrutura da oxi-Hb. A ligação de O_2 ao estado T desestabiliza estas pontes facilitando a mudança da conformação da proteína para o estado de maior afinidade R, no qual os grupos antes envolvidos nestas pontes salinas estão agora expostos ao solvente (PERUTZ, 1970).

Mais especificamente, na estrutura T a histidina 146 da cadeia β está protonada e faz uma ponte com asparagina 94 da cadeia β ; e a arginina 141 da cadeia α faz pontes salinas com os resíduos valina 1 α 1, histidina 122 α e asparagina 126. Na transição para o estado R, estas são as pontes que se desfazem, e com a exposição da his-146 β prótons são liberados (PERUTZ *et al*, 1980).

A contribuição das his-146 β para a diferença entre número total de prótons ligados a oxi e a desoxi-Hb, foi posteriormente confirmado com base nas medidas do pKs intrínsecos das histidinas expostas ao solvente da oxi e desoxi-hemoglobina por NMR (RUSSU & HO, 1986). Estes experimentos demonstraram ainda que a liberação de prótons na transição desoxi-oxi, resulta da soma das contribuições de várias histidinas e não somente das argininas 141 e histidina 122 da cadeia α .

Mas a atribuição dos grupos responsáveis pelo efeito Bohr é mais complexo do que parece. A liberação de prótons na transição T – R depende da concentração

iônica do meio. Por exemplo, na presença de 100mM de NaCl dois prótons são liberados na oxigenação; na ausência de ânions só um próton é liberado com a oxigenação, indicando que o estado de protonação das formas oxi e desoxi-Hb é regulada pela ligação diferencial de ânions à proteína (CASTRO, 1999), sendo um desses ânions os íons Cl^- que se ligam preferencialmente na conformação desoxi, estes íons são liberados na transição T – R induzida pela oxigenação. O estudo funcional do efeito do íon cloreto e Bohr em desArg 141 α , sugerem que este resíduo é responsável pela ligação do íon cloreto (SEIXAS, 2002; KWIATKOWSKI & NOBLE, 1987). Se a arg 141 α estiver envolvida no efeito Bohr prevê-se uma correlação concomitantemente entre estes efeitos.

O efeito do íon cloreto e Bohr, assim como o efeito de ligação de outros efetores alostéricos como DPG (2,3difosfoglicerato) e IHP (inositol-hexafosfato), na afinidade da hemoglobina por O_2 tem sido analisado principalmente com base no modelo de dois estados MWC (PERUTZ, 1970; BENESCH & BENESCH, 1967).

Várias evidências experimentais, entretanto tem demonstrado que o mecanismo de cooperatividade da oxigenação da Hb envolve pelo menos um estado alostérico intermediário (COLOMBO & SEIXAS, 1999). Estes estudos mostram que este terceiro estado alostérico da Hb tem afinidade por oxigênio intermediária às afinidade dos estados T e R; que o número de prótons Bohr ligados a este estado intermediário é menor que aquele ligado ao estado canônico T; e ainda que sua hidratação é intermediária à hidratação dos estados T e R canônicos. Estas evidências sugerem que o modelo de MWC, e o modelo estereoquímico de Perutz, baseados em dois estados alostéricos, são insuficientes para explicar tanto a cooperatividade de ligação de O_2 a Hb quanto o efeito Bohr.

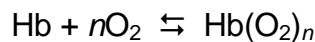
Esta bem estabelecido que o estado alostérico intermediário da Hb é estabilizado na ausência de ânions, e particularmente de NaCl (COLOMBO & SEIXAS, 1999). Isto abre a possibilidade de aprofundar os estudos no papel deste estado para a relação estrutura – função da Hb, e a necessidade de se re-investigar o mecanismo de regulação da função da Hb por ânions monovalentes, particularmente o cloreto.

1.1) Mecanismo de ligação de O₂ à Hemoglobina.

A ligação de O₂ à Hb é um processo cooperativo: a curva de oxigenação é caracterizada por uma curva sigmoide. Essa reação possui uma energia livre de cooperatividade em condições fisiológicas de 3,6 kcal.mol⁻¹ .heme⁻¹ (PERUTZ, 1998). A ligação de O₂ a uma subunidade da hemoglobina interfere na afinidade das outras subunidades pelo próprio O₂.

O primeiro a expressar matematicamente o equilíbrio da ligação de O₂ à hemoglobina foi Hill em 1910, através da “Equação de Hill”. Essa equação descreve o grau de saturação da hemoglobina. O modelo de ligação de Hill supõe a ligação simultânea de *n* moléculas de O₂ à Hb com uma constante de equilíbrio aparente *K*

K



A partir deste sistema, Hill expressou a constante de dissociação do O₂,

$$K = \frac{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]} \quad (04)$$

onde: [Hb] e [O₂] representam as concentrações de proteína e ligante livre em solução e [Hb.(O₂)_n] a concentração de proteína complexada. Definindo a saturação fracional *Y* como a razão da concentração da proteína ligada pela concentração de proteína total

$$\bar{Y} = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{([\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_n])} \quad (05)$$

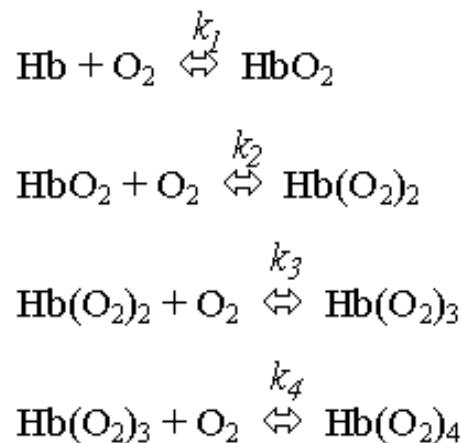
e expressando-se a [O₂] em termos de pO₂, a pressão parcial de oxigênio em equilíbrio com a solução, obtém-se combinando as equações 04 e 05 a equação de Hill, eq.06.

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1-\bar{Y}}\right) = n_H \log(p\text{O}_2) - \log K \quad (06)$$

Em um gráfico de $\log [\bar{Y}/(1-\bar{Y})]$ contra $\log(pO_2)$, chamado de “gráfico de Hill”, a região central da curva de oxigenação aproxima-se de uma reta. Sua inclinação n_{50} no ponto médio de ligação ($\bar{Y} = 0,5$) define o coeficiente de Hill e o valor da afinidade da Hb por O_2 , (p_{50}), é dado pelo valor de pO_2 a 50% de saturação. Neste ponto, o valor de n_{50} , reflete o grau de cooperatividade da ligação, que é um número menor que o número total de sítios de ligação n . Para a Hb, $n = 4$, e o valor de n_{50} em condições experimentais de pH 7,2 e 100mM de NaCl, é por volta de 2,8.

O valor de $n_{50} = 1$ representa ausência de cooperatividade; se $n_{50} > 1$ a reação é considerada positivamente cooperativa (HILL, 1913).

Gilbert Adair, em 1925, derivou a equação de ligação de oxigênio a Hb com quatro constantes de associação, conhecidas como constante de Adair.



Se a expressão da Hb pode ser descrita em termos de constante de equilíbrio teremos:

$$[\text{HbX}] = k [\text{Hb}][\text{X}] \quad (07)$$

A curva de oxigenação pode ser descrita em termos da saturação Y , sendo:

$$Y = \frac{\text{sítios ligados}}{\text{número total de sítios}} \quad (08)$$

Portanto podemos escrever a equação da saturação da hemoglobina por oxigênio como:

$$Y = \frac{[HbO_2] + 2[Hb(O_2)_2] + 3[Hb(O_2)_3] + 4[Hb(O_2)_4]}{4([Hb] + [HbO_2] + [Hb(O_2)_2] + [Hb(O_2)_3] + [Hb(O_2)_4])} \quad (09)$$

Se expressada em termos das constantes de dissociação, teremos:

$$Y = \frac{A_1 X + 2A_2 X^2 + 3A_3 X^3 + 4A_4 X^4}{4(1 + A_1 X + A_2 X^2 + A_3 X^3 + A_4 X^4)} \quad (10)$$

Onde A_1 , A_2 , A_3 e A_4 são as constantes multiplicadas para cada passo e X é a concentração de oxigênio. A solução destas equações para descrever a saturação fracional da Hb por O_2 é a equação de Adair, onde X é a concentração de O_2 .

A quarta constante originada por esta equação através de curvas de oxigenação experimentais em condições fisiológicas, é cerca de 300 vezes superior a primeira. Este fenômeno ocorre devido à cooperatividade que se origina através das interações entre as subunidades da proteína.

Alguns modelos de ligação surgiram na tentativa de descrever o efeito cooperativo de algumas enzimas:

Em 1965, Monod, Wyman e Changeux (MWC) propuseram a mais conhecida teoria de alostericidade de enzimas. Eles descrevem nesse modelo, que o efeito cooperativo é observado por causa de diferentes arranjos das subunidades que alternam entre si duas estruturas. Existe, portanto um equilíbrio entre duas estruturas quaternárias, uma chamada T (“tenso”), que possui baixa reatividade por possuir fortes ligações que resistem a mudanças terciárias necessárias para a ligação de um determinado substrato. A outra estrutura chamada R (“relaxada”), possui uma alta reatividade, dessa forma possui uma alta afinidade à um determinado ligante. Conforme previsto pelo modelo de MWC, a determinação das estruturas cristalográficas da oxi-Hb e desoxi-Hb determinadas por difração de Raios-X apresentam estruturas quaternárias distintas, R e T, que são associadas à estrutura de alta afinidade e baixa afinidade, respectivamente. Segundo o modelo de MWC a cooperatividade de ligação do oxigênio à Hb tem origem no deslocamento

do equilíbrio entre as conformações alostéricas T e R induzida pela ligação do ligante com o aumento da pressão de oxigênio. Quando a proteína muda de um estado para o outro, ela conserva sua simetria molecular. Segundo esse modelo, a regulação da afinidade da proteína pelo seu ligante por pequenas moléculas, chamadas de efetores alostéricos heterotrópicos, alteram a afinidade da proteína modulando o equilíbrio entre os estados de alta e baixa afinidade por O₂, os estados R e T, respectivamente. Neste modelo, os efetores que atuam como inibidores da ligação ligam-se preferencialmente na conformação T, e os ativadores na conformação R. O equilíbrio da ligação de oxigênio nessas duas conformações seria dado por este esquema:



No modelo MWC, o equilíbrio da ligação de O₂ pode ser descrito com apenas três variáveis independentes: K_T e K_R (constantes de associação do ligante à proteína nas estruturas T e R respectivamente) e L_i = [T_i]/[R_i], (razão da concentração das duas estruturas na ausência do ligante, ou constante alostérica). As constantes variam com as concentrações de H⁺, Cl⁻, CO₂ e fosfatos orgânicos. A transição quaternária de T ⇌ R com a oxigenação consiste da rotação do dímero α₁β₁ em relação ao dímero α₂β₂.

Um segundo modelo de cooperatividade em proteínas e enzimas foi proposto por Koshland, Nemethy e Filmer em 1966 (KNF). No modelo KNF não há nenhuma restrição a interação cooperativa: cada subunidade da proteína poderia mudar sua estrutura terciária com a ligação de algum substrato, afetando a interação química entre as subunidades vizinhas e assim mudando a afinidade nos sítios vizinhos.

Estudos cristalográficos de Perutz mostraram que a hemoglobina ligada e não ligada possui diferentes arranjos quaternários das quatro subunidades, indicando a afinidade dos diferentes estados do modelo MWC, com as duas estruturas quaternárias, R e T. Com base na análise das diferenças estruturais entre a oxi e desoxi-Hb Perutz propôs o mecanismo estereoquímico no qual a transição do estado T para o estado R é disparado pelo deslocamento do ferro do heme para o plano do heme que ocorre com a ligação de O₂. Com isto, o ferro que está ligado covalentemente à histidina proximal na cadeia F, posição 8, puxa a cadeia F, desestabilizando as interações entre cadeias que estabilizam o estado T. Este

modelo esteroquímico contribuiu para a ampla aceitação do modelo alostérico de dois estados proposto por MWC (PERUTZ et al, 1968, 1970, 1974). Mais detalhadamente, Perutz propôs que a maior estabilidade da estrutura T em relação a R decorre das pontes salinas que se formam na extremidade C-terminal das cadeias alfa. Segundo esta interpretação, a quebra das pontes salinas na estrutura T induzida pela ligação de O₂ é seguida da liberação de prótons que são responsáveis pelo Efeito Bohr (PERUTZ, 1970). Os resíduos C-terminais responsáveis tanto pela transição conformacional T \leftrightarrow R, quando no rompimento dessas pontes salinas intra e intersubunidades e que liberam prótons (Efeito Bohr) com esse processo, são as Arg141 α e His146 β no estado T (PERUTZ, 1972).

A transição alostérica do estado T para o estado R da Hb é desencadeada pela ligação do oxigênio. A diferença de ordem quaternária entre elas é a rotação de $\pm 15^\circ$ do dímero $\alpha_2\beta_2$ em relação ao dímero $\alpha_1\beta_1$. Essa rotação ocorre em torno de um ponto pivô, localizado na cadeia α_2 perpendicular ao eixo binário (eixo simétrico que passa pela cavidade central da Hb). A oxigenação da Hb causa um movimento muito pequeno entre as interfaces de contato dentro do dímero (contato α_1 com β_1 ou α_2 com β_2), sendo as maiores diferenças acontecendo entre os contatos das subunidades α_1 com β_2 , α_2 com β_1 e β_1 com β_2 , conforme ilustrado na figura 3 (BALDWIN & CHOTHIA, 1979).

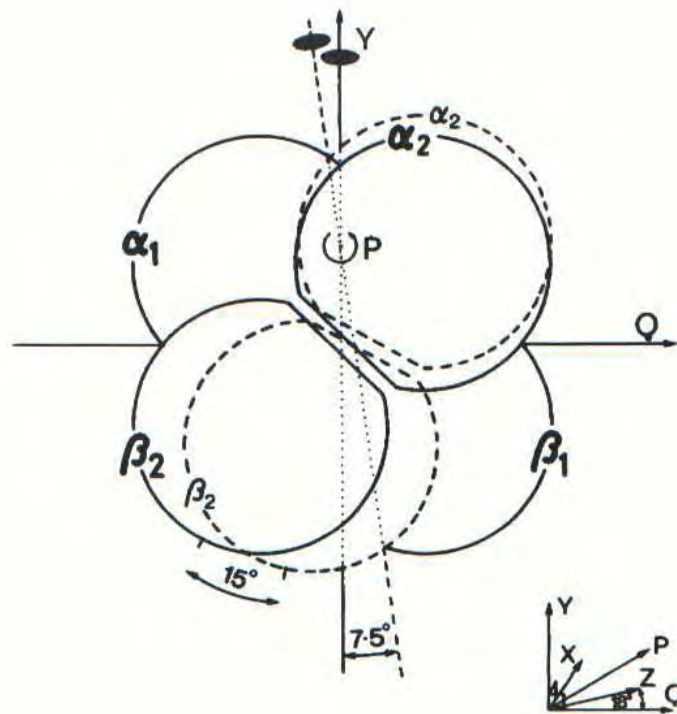


Figura 3 – Diagrama esquemático ilustrando a mudança na estrutura quaternária que acompanha a oxigenação da Hb. De acordo com o diagrama, os dímeros $\alpha_1\beta_1$ das formas oxi e desoxi foram superpostos. A posição do dímero $\alpha_2\beta_2$ oxigenado corresponde aquela obtida com a rotação do dímero $\alpha_2\beta_2$ desoxigenado em torno do eixo pivô P, por um ângulo $\theta = 12^\circ$ à 15° e também transladado neste eixo em 1 Å. O eixo P é perpendicular ao eixo de simetria binária Y de ambas as estruturas oxi e desoxi e também ao plano da figura. As linhas sólidas no diagrama referem-se a desoxiHb, enquanto as linhas pontilhadas referem a Hb oxigenada. Figura extraída do artigo de Baldwin & Chothia, 1979.

Mesmo após a comprovação física dada por meio do estudo cristalográfico de Perutz, o modelo MWC, muito popular no estudo da alostericidade protéica, apresenta algumas limitações, como por exemplo: No estudo de proteínas monoméricas, foi encontrada uma grande influencia de efetores alostéricos, dessa forma, proteínas alostéricas não são necessariamente oligoméricas como exigido no modelo MWC; mudanças quaternárias não são necessárias para a alostericidade dessas proteínas; a cooperatividade negativa é observada e não se encaixa no modelo MWC, e acontece quando o coeficiente de Hill apresenta valores menores que 1 (KISTER *et al*, 1987; CUI & KARPLUS, 2007).

Tanto o modelo MWC como o modelo KNF são fenomenológicos, e não respondem a uma questão fundamental: de como a ligação do ligante ou sua

modificação produz o efeito alostérico observado em nível atômico (CUI & KARPLUS, 2007).

Silva et al, 1992 reproduziram a cristalização da estrutura Hb humana carbomonoxi-hemoglobina (HbCO) estrutura semelhante a estrutura oxigenada, em um ambiente de baixa força iônica, pH 5,8. A resolução dessa estrutura evidenciou uma nova conformação, R₂, que se caracteriza por uma diferença na rotação do dímero $\alpha_2\beta_2$ em relação à estrutura R. Na transição T \rightleftharpoons R, a rotação do dímero $\alpha_2\beta_2$ em torno do ponto pivô é de $\pm 15^\circ$, enquanto que na transição T \rightleftharpoons R₂, esta rotação é de $\pm 22,7^\circ$. A partir desse estudo cristalográfico, outros estudos vieram para responder a questão sobre a possibilidade da existência de outros estados intermediários na transição T \rightleftharpoons R.

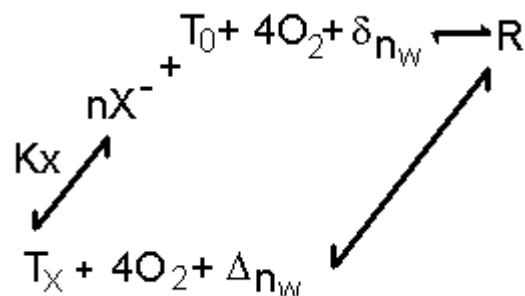
Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa encontraram evidências funcionais e estruturais da existência de um segundo estado T da hemoglobina, com uma alta afinidade por O₂ (COLOMBO & SEIXAS, 1999). O estudo da transição de estado foi feito, utilizando medidas de variação de hidratação que acompanham a oxigenação da hemoglobina (Δn_w) e também estudos cristalográficos, dessa forma descobriram que a ligação de ânions (cloreto, diferentes fosfatos, entre outros) a sítios reguladores na estrutura da desoxiHb promove a mudança do estado alostérico desta proteína. Na ausência de ânions ligados, a estrutura desoxiHb assume uma conformação alostérica de afinidade por oxigênio e de hidratação com valores que são intermediários aos valores de afinidade e hidratação da desoxi-Hb complexada com ânions (estado T_x) e a oxiHb (estado R ou R₂)(SEIXAS, et al 1999). A diminuição da atividade de água diminui a afinidade da Hb pelo oxigênio, em virtude da estrutura da oxi-Hb ser mais hidratada que a estrutura da desoxi-Hb. Portanto, a oxigenação é acompanhada pela ligação de um número extra de moléculas de água que se ligam à superfície protéica exposta ao solvente na transição conformacional. Como resultado destas mudanças, a afinidade da Hb por oxigênio, e a energia livre de oxigenação da Hb, é controlada pelas atividades destes ligantes em solução (COLOMBO & SANCHES, 1990; COLOMBO et al, 1992; COLOMBO et al., 1994; COLOMBO & BONILLA-RODRIGUEZ, 1996; COLOMBO & SEIXAS, 1999).

Colombo et al em 1992, propuseram o método de estresse osmótico: com esse método podemos determinar o número de moléculas de água ligadas na conformação totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada e assim obter o número diferencial durante a oxigenação protéica. Esta metodologia consiste em correlacionar através de equações de “linkage” o parâmetro funcional P_{50} em função da atividade de água do meio (equação 12).

$$-4 \left. \frac{d \ln p_{50}}{d \ln a_w} \right|_{a_i} = (n_w^{\text{oxi}} - n_w^{\text{desoxi}}) = \Delta n_w \quad (12)$$

onde, n_w^{oxi} e n_w^{desoxi} são os números de moléculas de água ligadas as estruturas oxi (R) e desoxi (T) da Hb, respectivamente; a_i é a atividade de todos os ligantes i diferentes da água e que são mantidos constantes.

As primeiras evidências experimentais indicando a existência de dois estados alostéricos correspondentes à desoxi-Hb livre e complexada com ânions foram obtidas medindo-se a influência de ânions em Δn_w de oxigenação, sugerindo que na ausência de ânions ligados a desoxiHb assume o estado alostérico T_0 , e que a ligação do ânions X à esta estrutura muda sua conformação para o estado alostérico T_x . Colombo e Seixas consideraram ainda que a dada concentração de X , a oxigenação segue dois caminhos de reação $T_0 \rightarrow R$ e $T_x \rightarrow R$ regulados pelo equilíbrio $T_0 + X^- \rightleftharpoons T_x$, conforme o esquema:



onde δn_w e Δn_w representam a mudança de hidratação entre os estados totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado da Hb a baixas e altas concentrações salinas, i.e., entre o estado T_0 e R e também T_x e R respectivamente; K_x é a constante de equilíbrio aparente para a ligação do ânion X^- ao estado T da Hb e nX o número aparente de X^- ligados (COLOMBO & SEIXAS, 1999). Outros

trabalhos realizaram medidas de oxigenação de desoxiHb encapsulada em sílica-gel, uma matriz que impede a mudança quaternária da proteína, na presença e ausência de ânions difusíveis (SHIBAYAMA & SAIGO, 1995; BRUNO et al., 2001), e desse maneira comprovaram que a ligação de ânions a desoxiHb leva a diminuição da afinidade pelo oxigênio.

1.2) Efeitores Alostéricos

O 2,3 DPG (2,3difosfoglicerato), é um dos efetores mais abundantes nas células de mamíferos. Nos eritrócitos humanos a sua concentração varia de 4-5 mM, possuindo uma razão de 2:1(DPG:Hb) (VOET et al. 2000). Esse efector liga-se a desoxiHb com alta afinidade na cavidade central entre os resíduos β Val 1, β His2, β Lys82, e β His 143 estabilizando a estrutura T (desoxiHb).

Nos eritrócitos de aves e répteis, o principal efector alostérico é o fosfato orgânico inositol-hexafosfato (IHP). Para a hemoglobina humana, o IHP é um efector alostérico muito mais eficaz que o 2,3DPG, pois sua constante de associação à oxiHb é da ordem de 10^6M^{-1} (Gray & Gibson, 1971), enquanto que a do 2,3DPG é algo em torno de 10^2M^{-1} .

O trabalho de Arnone e Perutz (1974), mostrou que o IHP se liga ao mesmo sítio que o 2,3DPG na desoxiHb humana, porém , o sítio de ligação de IHP à oxiHb não foi estruturalmente confirmado.

Um trabalho recente com simulação computacional sugeriu que tanto o IHP como o 2,3 DPG ligam-se entre as subunidades α na estrutura oxigenada(R) em um sitio envolvendo os resíduos α Lys99 e α Arg141(Laberg et al 2005).

No modelo alostérico de Perutz, o resíduo α Arg141, é um dos resíduos envolvidos em uma ponte salina na estrutura T e que é rompida na transição $T \rightleftharpoons R$ da hemoglobina.

Em trabalho recente Yonetani et al (2002) analisaram curvas de oxigenação da Hb em diferentes condições de IHP e mostraram evidências de que a afinidade

pelo oxigênio e o efeito cooperativo da hemoglobina são modulados principalmente por mudanças estruturais terciárias. Os autores propuseram um modelo alostérico global, indicando que ambos os estados T e R são igualmente acessíveis a efetores alostéricos.

Outro importante efetor alostérico heterotrópico da hemoglobina é o íon cloreto. A modulação da ligação de O_2 pela hemoglobina pode ser acompanhada no aumento da P_{50} (pressão de O_2 necessária para saturar 50 % dos sítios de ligação deste ligante).

O modo de ligação do íon cloreto à Hb ainda não foi definido. Os primeiros estudos apontavam ligação de Cl^- a sítios específicos da proteína: ao resíduo N-terminal do aminoácido Val 1 α_2 e o grupo guanidino da Arg 141 α_1 , resíduo C-terminal (CHIANCONE et al., 1972, 1975; KILMARTIN et al., 1980). Perutz e colaboradores sugeriram que o efeito de íons cloreto na afinidade da Hb não está associada à ligação destes íons a sítios reguladores específicos da proteína, mas a “condensação iônica” em torno dos resíduos com carga positiva encontrados na cavidade central da estrutura T da Hb (PERUTZ et al., 1993, 1994). Por este mecanismo, o excesso de cargas positivas na cavidade central da desoxiHb resultariam em uma repulsão eletrostática suficiente para desestabilizar a estrutura T, deslocando o equilíbrio alostérico para a estrutura R. Dessa forma, este deslocamento do equilíbrio de $T \rightarrow R$, induzido pela ausência de cloreto, aumentaria a afinidade global da Hb por O_2 .

Em 1994, Perutz et al., compararam o efeito de cloreto sobre a afinidade por O_2 de várias hemoglobinas humanas mutantes, que possuem uma variação na carga positiva da cavidade central. Com este estudo, os autores concluíram que as cargas positivas da cavidade central da estrutura desoxi T da Hb seriam as responsáveis pelo efeito de Cl^- na hemoglobina.

Porém em 1999, o trabalho cristalográfico de Hui et al, propôs que o íon cloreto poderia se ligar a Hb pelos resíduos Arg 141 α_1 e Arg 141 α_2 . Estudos cristalográficos realizados por nosso grupo de pesquisa concordaram com os resultados de Hui et al, e encontraram mais dois resíduos possíveis de serem os sítios de ligação de cloreto: as argininas 92 α_1 e 92 α_2 (SEIXAS, 2002).

Além dos fosfatos orgânicos e íons cloretos, o efeito da concentração de prótons (Efeito Bohr) também modula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Durante a oxigenação, ocorre a liberação de prótons (prótons de Bohr) para a solução (PERTUZ, 1970; 1990).

Vários aminoácidos estão envolvidos na ligação deste próton à Hb, em baixas concentrações de íons cloretos. Alguns resíduos que são descritos na literatura, que contribuem para o efeito Bohr alcalino são, Val 1 α , His 122 α , Val 1 β , His 2 β , His 143 β (PERUTZ et al., 1980), His 146 β (PERUTZ et al., 1980; PERUTZ et al., 1985; BUCCI & FRONTICELLI, 1985; RUSSU & HO, 1986; LOUIE et al., 1988; BUSCH et al., 1991; SHIH et al., 1993).

Em 1997, Sun et al., propuseram que o efeito Bohr alcalino ocorre pela existência de uma rede de interações eletrostáticas entre alguns resíduos da Hb, que propicia a ligação do H⁺ a um resíduo específico de Hb ou pela estabilização desse próton pelo aumento do pK_a do resíduo de aminoácido. Kilmartin et al., 1980 em experimentos com Hb normal e com Hb modificada quimicamente (excluindo o resíduo de histidina - des-His146 β), mostraram que o pK_a da Hb independe do tampão a que a proteína está exposta. Em baixas concentrações de cloreto (10 mM) e na ausência de fosfatos, os resíduos histidina contribuem para o efeito Bohr alcalino com algo entre 40 e 60% do total de prótons que são liberados da proteína com a oxigenação. O resíduo de His 146 β forma uma ponte salina com o resíduo de Asp 94 β na forma desoxigenada da Hb, estabilizando o próton de Bohr, que desaparece na Hb modificada quimicamente pela exclusão do resíduo de His 146 β (des-His146 β) (KILMARTIN et al., 1980, PERUTZ et al., 1980).

Outro resíduo também responsável pelo efeito Bohr alcalino é o resíduo Val 1 α , que forma uma ponte salina com o guanidino da Arg 141 da cadeia α vizinha: esta interação é descrita por Arnone, 1972 em seu trabalho, via exclusão química da Val 1 α . Perutz et al., 1980 mostraram que a Val 1 α interage com a Ser 131 α (mesma cadeia α) na desoxi-Hb contribuindo no efeito Bohr. Porém com a exclusão do resíduo de Arg 141 α a interação valina – serina desaparece na ausência de cloreto. Com este estudo mostraram que outro grupo protonável também é a Arg 30 β quando interage com a His 122 α , porém o efeito Bohr não é

dependente da especificidade deste resíduo, pois a troca da Arg 30 β por uma Ser, diminui mas, não extingue o efeito Bohr.

Fronticelli *et al*, 1994, mostrou através de estudos de oxigenação com Hb A_O (fração A_O da hemoglobina humana) e Hb mutantes um decréscimo no efeito Bohr alcalino quando a Hb não possui o resíduo de Val 1 β . A influência de cloreto no efeito Bohr alcalino também ficou demonstrada.

2-OBJETIVOS

Os vários estudos sobre a ação de ânions na regulação da função hemoglobina apontam para a controvérsia quanto à existência ou não de sítios de ligação específicos para o íon cloreto. Perutz em 1993 e 1994, baseado na falta de evidências cristalográficas para a ligação de ânions monovalentes, concluiu que a ação destes na regulação da Hb ocorre via condensação iônica. Esta sugestão é, entretanto, conflitante com as propostas de ligação de cloreto à Arg-141 alfa, e seu papel no efeito Bohr dependente de cloreto.

Este trabalho teve por objetivo aprofundar os estudos da interação de íons cloreto com a Hb, considerando a nova hipótese de que a Arg-92 α , além da Arg-141 α , seja um sítio de ligação específica de cloreto.

Estudos anteriores demonstraram que a ligação de cloreto ao estado deoxi-T da Hb altera tanto o número de prótons Bohr liberados, quanto o número de moléculas de água hidratação que se ligam à proteína com sua oxigenação. Estes resultados conectam o efeito Bohr tanto a mudanças estruturais terciárias quanto quaternárias. As transições terciárias e quaternárias podem ser induzidas no pela ligação O₂ à Hb, enquanto a transição terciária é modulada pela ligação de cloreto. A ligação de IHP à seu sítio específico estabiliza o estado T da proteína. O sítio de ligação de IHP à desoxi-Hb esta localizado na cavidade central entre os resíduos da cadeia beta, em posição diametralmente oposta a região C-terminal das cadeias alfa as Arg-141 α 1 e Arg-141 α 2 o eventual sítio de ligação de cloreto

Os objetivos específicos foram determinar os efeitos da supressão das Arg141 e Arg92, da concentração de cloreto, e da ligação de IHP à Hb sobre:

1 - as propriedades funcionais da Hb, isto é, Efeito Bohr, afinidade por oxigênio e cooperatividade de reação;

2 - os efeitos da ligação destes íons na estabilidade das estruturas quaternárias e na sua transição induzida por O₂ e ligação de IHP, por meio de medidas espectrofotométricas na região UV que apresenta uma banda característica da transição quaternária da proteína;

3 - Estudar o papel das argininas 92 e 141 da cadeia alfa na ligação de IHP e Cloreto à Hb induzida por ligantes.

Para tanto, utilizamos as Hemoglobinas Ao (fração Ao da hemoglobina humana), uma Hb enzimaticamente modificada, a Hb desArg obtida a partir da deleção dos resíduos arginina 141 α 1 e 141 α 2 da HbAo, e um mutante natural a Hb Chesapeake (R92L) no qual a arginina 92 está substituída por leucina.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Purificação da Hb humana

A amostra de sangue para a obtenção da fração Ao e preparação da Hb desArg, foi coletada de um indivíduo adulto, saudável e não fumante através de punção venosa. O sangue após coletado foi centrifugado para retirar o plasma. As hemácias foram lavadas cinco vezes em solução salina tamponada (NaCl 0,9%, Tris-HCl 50mM, pH 8,5 + EDTA 1mM) num volume três vezes maior que o volume das hemácias. As hemácias foram hemolisadas com solução tampão hipotônica Tris-HCl 50 mM + EDTA 1 mM em pH 8,5. Após a retirada dos “debris”, foi adicionado clorofórmio no mesmo volume da amostra, sob agitação constante, formando duas fases. Uma fase contendo a parte polar, onde estão as proteínas e a outra apolar, com os debris. Coletamos o sobrenadante e em seguida centrifugamos a 2300 g por 120 minutos.

Novamente coletamos o sobrenadante e a amostra foi dialisada contra 2 L de tampão Tris-HCl 50 mM contendo EDTA 1mM, pH 8,5 por 12 horas para remoção de fosfatos.

3.1.1) Cromatografia de troca iônica aniônica

Os tampões utilizados na cromatografia foram:

Tampão inicial (A): Tris-HCl 15mM pH 8,4

Tampão final (B): BisTris-HCl 15mM pH 7,0

Cerca de 4,5 g de resina DEAE-SEPHADEX A - 50 (Pharmacia), foram adicionadas em aproximadamente 350 mL de tampão A por 12 horas, antes da montagem da coluna XK-50 (Pharmacia), sendo este o tempo indicado pelo fabricante para a hidratação da resina. A coluna foi posteriormente montada em

temperatura ambiente e equilibrada em câmara fria à temperatura próxima a 4° C com este mesmo tampão.

Com a coluna equilibrada, cerca de 20mL de amostra de Hb foi aplicada à mesma e lavada com tampão A (\cong 700 mL) por 12 horas. Em pH 8,4 a proteína possui carga efetiva negativa, o que resulta na retenção da Hb pelos cátions da resina. O passo seguinte foi acoplar a coluna a um sistema de FPLC modelo LKB da Pharmacia e a um banho térmico com a temperatura mantida constante em 4° C. O FPLC forma um gradiente de pH devido a mistura de frações dos tampões A e B (BisTris-HCl 15mM em pH = 7,0), permitindo assim a eluição da amostra pela coluna. O gradiente foi iniciado em 50% (V/V) de tampão A e B, e a concentração de tampão B foi gradativamente elevada até atingir 100%. O fluxo de saída de tampão pela coluna foi de 4 mL/min.

Para a Hb humana, quando o gradiente atinge a fração de 75% de tampão B ocorre o desprendimento da Hb A₂, que representa aproximadamente 2% do total de Hb, para um indivíduo normal. O pH deste gradiente é próximo a 7,9 (que equivale ao ponto isoelétrico da Hb A₂). Com o início da eluição da Hb A₂, o gradiente foi suspenso e o pH mantido constante para a saída desta fração protéica. Em seguida, o gradiente foi elevado a aproximadamente 100% de tampão B, onde ocorreu o desprendimento da fração de Hb A₀.

Após a eluição da fração de interesse, a amostra foi concentrada por centrifugação utilizando concentradores CENTRICON até um volume de aproximadamente 50 mL e posteriormente passada em uma coluna, de troca iônica mista Amberlite MB-1 SIGMA, para desionização da solução. A resina foi lavada com água ultrapura e depois a solução de Hb foi passada nesta coluna por no mínimo cinco vezes, para que quaisquer íons ficassem ligados à resina. Depois disso a amostra foi novamente concentrada por centrifugação em concentradores Centriprep (AMICON) até aproximadamente 10mM/ heme e armazenada em alíquotas de 250 μ l em N₂ líquido.

Ao final destes procedimentos, a pureza da amostra foi checada através de uma eletroforese não desnaturante - PAGE, com coloração do gel por impregnação de nitrato de prata (LAEMMLI, 1970).

3.2) Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração protéica foi realizada com base no método quantitativo espectrofotométrico (RIGGS, 1981). A equação 1 expressa o cálculo da concentração da proteína, [Hb], a partir das absorvâncias (Abs) aferidas em um dos picos característicos para a oxi-Hb (540 ou 576nm) descontando o valor correspondente à linha de base (700 nm).

$$[Hb] = \frac{(Abs_{576} - Abs_{700}) \cdot (V_{diluição} + V_{Hb})}{(\epsilon_{576} \cdot V_{Hb})} \quad (13)$$

A concentração da Hb é expressa em mM/heme, $(V_{diluição} + V_{Hb})$ representa o volume total da amostra na cubeta e ϵ_{576} o coeficiente de extinção molar para a oxi-Hb em 576nm. Os valores dos coeficientes de extinção molar determinados em pH de 7,2 e nos comprimentos de ondas de 630 e 576 nm, utilizados são aqueles determinados por Benesch et al, 1973: para a oxi-Hb $\epsilon_{630}^{oxi} = 0,014 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ e $\epsilon_{576}^{oxi} = 1,58 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, enquanto que para a meta-Hb, $\epsilon_{630}^{meta} = 0,376 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ e $\epsilon_{576}^{meta} = 0,414 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ (coeficiente de extinção molar heme).

O átomo de ferro presente nos grupos heme da hemoglobina, pode sofrer uma oxidação, passando de Fe^{+2} para Fe^{+3} . Quando isso acontece, forma-se a meta hemoglobina, e essa forma não liga oxigênio. *In vivo* os níveis de meta Hb são mantidos baixos por um sistema enzimático (meta-hemoglobina redutase). Em nossos experimentos utilizamos as enzimas catalase e superóxido dismutase (1mM) para inibir a formação de meta hemoglobina. Como a presença de meta-hemoglobina em excesso pode adulterar os resultados, é importante checar ao final da purificação, assim como ao final de cada experimento a concentração de meta-hemoglobina presente. Para isso, utilizamos as equações abaixo: (RIGGS, 1981)

$$A_{576} = [oxi - Hb] \epsilon_{576}^{oxi} l + [meta - Hb] \epsilon_{576}^{meta} l \quad (14)$$

$$A_{630} = [\text{oxi-Hb}] \epsilon_{630}^{\text{oxi}} l + [\text{meta-Hb}] \epsilon_{630}^{\text{meta}} l \quad (15)$$

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

3.3) Preparação da Hb desArg e Hb Chesapeake

A hemoglobina desArg foi preparada enzimaticamente (KILMARTIN, 1981; BONAVENTURA et al, 1972). A hemoglobina desArg foi obtida a partir da hemoglobina Ao, pela remoção de dois resíduos arginina carboxi-terminais das cadeias α removidos especificamente pela enzima Carboxipeptidase B (CPB).

A enzima foi utilizada em uma proporção de 1 parte de CPB para 1000 Hbs. A reação de digestão ocorreu na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH= 8,0 a temperatura ambiente, por cerca de duas horas. Após este processo, a amostra foi passada em coluna PD-10, Sephadex G25M, Pharmacia Biotech equilibrada com tampão HEPES-NaOH 0,01M, pH=6,9, com o intuito de retirar os resíduos de argininas. Após esta passagem, a amostra foi novamente aplicada em coluna de troca iônica DEAE A50 SEPHADEX, equilibrada com tampão HEPES-NaOH 0,01M, pH= 7,0. Esta passagem separa a Hb desArg da enzima, já que as proteínas possuem pontos isoelétricos distintos (PI = 7,1 para Hb desArg e PI = 6,0 para CPB (WYMAN, 1964, FOLK et al, 1960).

Após este processo a Hb desArg foi deionizada por passagem em coluna de troca iônica mista Amberlite MB-1 (SIGMA), pelo mesmo processo descrito anteriormente na preparação da amostra de Hb humana.

A caracterização do produto de reação HbAo + CPB foi realizada por eletroforese, cromatografia de proteínas (TOSQUI, 2005).

A hemoglobina Chesapeake (R92L), foi fornecida para nossos experimentos pelo Professor Chien Ho, da Universidade de Pittsburgh. A amostra chegou purificada e ligada à CO. Portanto foi necessária a retirada de CO para a ligação de

oxigênio, o que ocorreu em banho de gelo e exposição à luz. Para a retirada do tampão a qual ela foi enviada foi preciso uma diálise.

3.4) Obtenção das curvas de oxigenação

3.4.1) Método Tonométrico-espectrofotométrico

O tonômetro utilizado está representado na figura 4. O tonômetro é formado por um corpo principal de vidro, uma válvula que controla entrada e saída dos gases, uma saída conectora por onde são feitas as injeções de oxigênio, e uma cubeta acoplada, onde fica a amostra com volume de 3 mL.

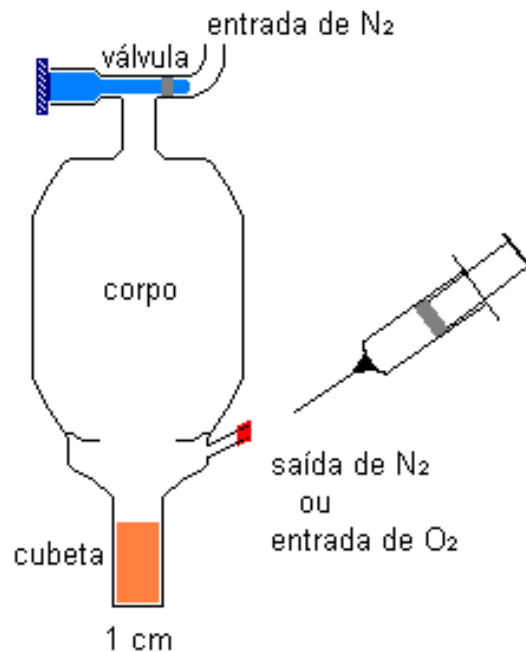


Figura 4 - Representação esquemática do tonômetro. Com uma seringa injetamos um volume conhecido de ar dentro do tonômetro.

Após preparar a amostra nas condições desejadas para o experimento, a aplicamos no tonômetro e coletamos um espectro de absorção da solução contendo a Hb oxigenada. Em seguida esta solução foi desoxigenada através da passagem de nitrogênio gasoso, por cerca de 40 minutos. Então coletamos outro espectro de

absorção, agora com a Hb totalmente desoxigenada. Logo, temos os valores de absorção da Hb nas duas condições extremas, e dessa maneira podemos calcular a fração de saturação com qualquer outro espectro intermediário. Passamos então a adicionar oxigênio por meio de uma seringa e, após cada adição de oxigênio, o tonômetro foi agitado por nove minutos, para que a solução entrasse em equilíbrio entre a fase líquida e gasosa. Então, coletamos um novo espectro. Este processo se repetiu até que a solução estivesse totalmente oxigenada.

A pressão parcial de O₂ no tonômetro é calculada do volume de ar injetado V_i a pressão parcial de O₂ na atmosfera (P_o) e o volume da fase gasosa no tonômetro V_t:

$$pO_2 = \left(\frac{(P_o \times V_i)}{V_t} \right) \quad (16)$$

O grau de saturação \bar{Y} é calculado em cada valor de pO₂ a partir das leituras de absorbância da oxi e desoxi hemoglobina no comprimento de onda de 576nm.

3.5) Titulações Calorimétricas

Os parâmetros termodinâmicos da ligação do IHP na hemoglobina A₀, o efeito dos íons cloreto sobre essa ligação, e a possível modificação desses parâmetros com a retirada da arginina 141 da cadeia alfa e a troca do resíduo da arginina 92 da cadeia alfa por uma leucina, foram obtidos através de medidas calorimétricas utilizando o calorímetro de titulação isotérmica: 5300 Isothermal titration calorimetry (ITC), Calorimetry Sciences Corporation, USA)

Por se tratar de um equipamento muito sensível, todas as soluções utilizadas foram deaeradas. Para não aumentar a temperatura da solução de hemoglobina evitando a formação de metaemoglobina: a deaeração ocorreu em banho de gelo.

3.6) Análise de dados

Os parâmetros funcionais P_{50} e n_{50} são calculados a partir das equações derivadas do equilíbrio hipotético demonstrado por Archibald Hill em 1913, onde:



onde:

$$K = \frac{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]} \quad (18)$$

sua saturação fracional \bar{Y} , é expressa como :

$$\bar{Y} = \frac{n[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{n([\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_n])} \quad (19)$$

Expressando em termos de saturação fracional (\bar{Y}) e o O_2 em pressão ($p\text{O}_2$), podemos expressar como :

$$\bar{Y} = \frac{[p\text{O}_2]^n}{K + [p\text{O}_2]^n} \quad (20)$$

ao expressarmos a fração de oxiHb (\bar{Y}) sobre a fração de desoxiHb ($1 - \bar{Y}$) temos:

$$\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}} = \frac{[p\text{O}_2]^n}{K} \quad (21)$$

Para aplicar ao gráfico de Hill, obtemos o logaritmo de ambos os termos, temos:

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}\right) = n_H \log(p\text{O}_2) - \log K \quad (22)$$

O gráfico de $\log [\bar{Y} / (1 - \bar{Y})]$ contra $\log pO_2$, é chamado de “gráfico de Hill”. Sua inclinação n_{50} no ponto médio de ligação ($\bar{Y} = 0,5$) é chamado de coeficiente de Hill que representa a cooperatividade do processo de oxigenação e o valor da afinidade da Hb por O_2 , (p_{50} , pressão de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios de ligação deste ligante), é dado pelo valor de pO_2 .

Segundo a equação de Wyman, $\left. \frac{d \log P_{50}}{d pH} \right|_{ai} = \Delta n_{H^+} = (n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi})$, com o gráfico de $\log P_{50}$ contra pH , o coeficiente angular fornece o Δn_{H^+} , a diferença do número de H^+ ligados às conformações da Hb totalmente oxigenada ($n_{H^+}^{oxi}$) e totalmente desoxigenada ($n_{H^+}^{desoxi}$), i.é, $\Delta n_{H^+}^{obs} = n_{H^+}^{oxi} - n_{H^+}^{desoxi}$.

3.6.1) Determinação Espectrofotométrica de mudanças estruturais

da Hb.

A absorção de proteínas na região do UV com máximo em torno de 280nm se deve à presença de grupos aromáticos na sua estrutura, triptofano, tirosina e fenilalanina, com coeficientes de extinção em ordem decrescente. Ambos, triptofano e tirosina, são resíduos cujo máximo da absorção varia com a polaridade do meio, se deslocando para o vermelho (comprimentos de onda maior) com a diminuição da polaridade do meio.

A Hb humana contém seis tirosinas e três triptofanos, que mais contribuem para o espectro de UV desta proteína. Os resíduos Trp37 β Tyr42 α e Phe41 β se apresentam diferentemente no espectro da conformação oxi e desoxi. A mudança espectral produzida pela diferença dos espectros oxi e desoxi produz uma banda em 290 nm que serve como um marcador espectroscópico da transição T-R da Hb (ENOKI & TYUMA, 1964). Estas mudanças foram acompanhadas, medindo os espectros de oxigenação nas regiões do visível e UV simultaneamente. Os espectros da diferença entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado foram utilizados na análise das mudanças quaternárias sofrida pela

hemoglobina com a oxigenação e uma possível alteração dessas mudanças com a adição de ligantes heterotrópicos.

Para comparação entre o efeito da ligação de ânions, e da supressão de resíduos, nas estruturas HbO₂ e Hb, foram calculadas a 1ª e segunda derivadas dos espectro diferença. Este procedimento permite uma melhor resolução das mudanças espectrais (LEVINE & FEDERICI, 1982).

3.6.2) Tratamento de dados de titulação calorimétrica.

Praticamente toda a reação de ligação de ligantes à proteína é acompanhada pela liberação ou absorção de calor. O calorímetro de titulação isotérmica, ITC, mede a quantidade de calor gerado durante a titulação. Neste tipo de calorímetro, um sistema de compensação elétrico mede a quantidade de calor transferida para a cela de titulação para que a temperatura do sistema permaneça constante após a adição do titulante. Um exemplo de curva de titulação é mostrada na figura 5.

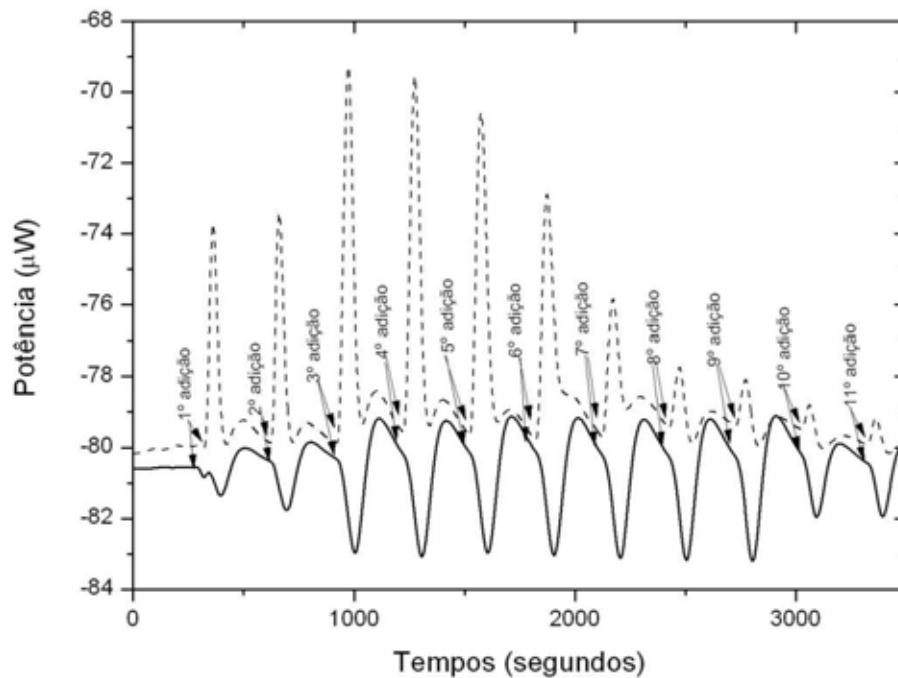


Figura 5: Gráfico mostrando a curva típica de onze titulações. A linha pontilhada mostra a curva da titulação de IHP à Hb, e a linha contínua mostra a titulação do IHP em tampão, o que seria a diluição deste ligante. Quando os picos de cada titulação se posicionam positivamente (para cima), temos uma reação exotérmica, no caso da titulação do ligante a proteína. E quando os picos se direcionam para baixo, temos uma reação endotérmica, no caso da diluição do ligante em tampão.

O calor absorvido em cada titulação corresponde à integral dos picos de potência versus tempo em relação à linha de base. O cálculo dos calores de diluição do titulante e dos calores de reação foram realizados utilizando uma rotina específica implementada no Matlab. O calor de ligação é obtido pela subtração do calor de diluição do calor de reação.

Na prática, um volume v de uma solução do titulante com concentração X_s na seringa é titulada em uma solução de proteína a concentração inicial M_0 na cela calorimétrica, de volume V_0 . O calor gerado na reação se deve à formação do complexo mais o calor de diluição do titulante. Em cada passo i o calor gerado é dado pelas diferenças de entalpia antes (passo $i-1$) e depois (passo i) da adição do titulante, O calor dq_i , por mol de ligante ligado, é igual a:

$$dq(i) = dH_0 \cdot V_0 \cdot \{MX(i) - MX(i-1)\} \cdot f(i) \quad (23)$$

onde dH_o é a entalpia molar da reação

V_o o volume da cela calorimétrica

$MX(i)$ a concentração do ligante no passo i

$f(i)$ é o fator de diluição da amostra no passo $(i-1)$, uma vez que as medidas calorimétricas são realizadas em modo de volume constante.

A determinação da entalpia de reação dH_o requer portanto conhecermos as concentrações de ligante ligado $MX(i)$ em cada passo da titulação. Para tanto é necessário considerar o modelo de ligação do sistema estudado.

Os dados de titulação de IHP com a Hb foram tratados considerando a existência de um sítio por tetrâmero da Hb. Com M e X as concentrações de proteína e ligante livres na solução titulada, tem-se que o equilíbrio de reação é dado por



Onde, a constante de equilíbrio K está definida como

$$K = [MX]/[M]*[X] \quad (25)$$

K é a constante de associação. Em termos das concentrações totais de proteína, $[Mt]$ e de ligante $[Xt]$ na cela, temos:

$$K = [MX]/[Mt-MX]*[Xt-MX] \quad (26)$$

Dada uma constante de equilíbrio, K , a cada par de concentrações $Mt(i)$, $Xt(i)$ podemos, com a equação 26 calcular $MX(i)$.

Substituindo estes valores na equação 23 $[dq(i) = dH_o * V_o * \{MX(i) - MX(i-1) * f(i)\}]$ obtemos a equação, com parâmetros ajustáveis dH_o e K , utilizada para análise dos dados de ligação.

O ajuste dos parâmetros K e dH_o desta equação foi realizado minimizando, por métodos de mínimos quadrados não linear, a diferença entre o calor medido e calculado em cada passo da titulação.

4-RESULTADOS

4.1) Efeito Bohr

O efeito da ligação dos ânions IHP – Inositol-hexafosfato (ácido fitico), Cloreto e pH na afinidade da Hemoglobina humana, HbA₀ e Hb desArg foram determinados neste trabalho com o método tonométrico - espectrofotométrico.

A figura 6 mostra o efeito da adição de NaCl e IHP nas curvas de oxigenação da Hb A₀. Estas determinações foram realizadas com concentração de amostra em torno de 60 μ M(heme) em tampão HEPES 10mM com e sem a adição de 100mM de NaCl e de 200 μ M de IHP.

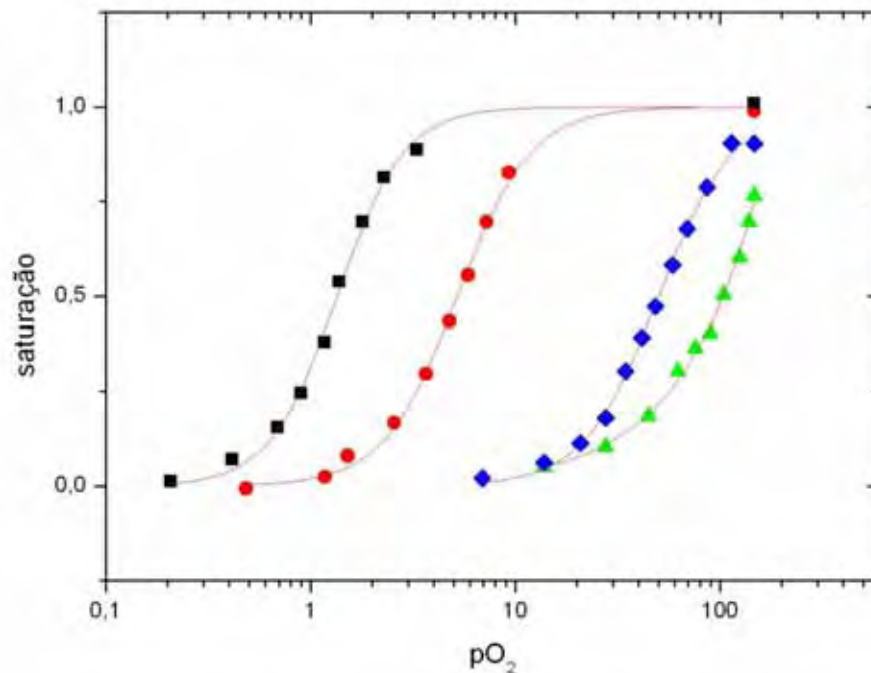


Figura 6: Efeito da concentração de IHP e NaCl na oxigenação da Hb A₀ em tampão HEPES 10mM, pH 7,3. Nas seguintes condições: (■) na ausência de NaCl; (●) com 100mM de NaCl e ausência de IHP; (◆) 100mM NaCl e 200μM de IHP e (▲) 200μM de IHP e ausência de NaCl. Todas as condições a 25°C. As curvas representam o melhor ajuste não linear dos parâmetros. Através da equação de Hill obtemos os parâmetros P₅₀ e n₅₀.

Neste gráfico observamos que a afinidade da HbA₀ por oxigênio é máxima na ausência de ânions, p₅₀ ~ 1,8 mmHg. Observa-se que na presença de 100 mM NaCl a afinidade diminui, aumentando o valor de pressão de O₂ no qual 50% da proteína está saturada, para p₅₀ ~5-6 mmHg. A interação de IHP com a Hb produz uma forte diminuição na afinidade da Hb por O₂, com p₅₀ ~80 mmHg. Na presença de NaCl e IHP, a afinidade medida é de ~60mmHg, portanto intermediária entre as observadas na presença somente de NaCl e só na presença de IHP. A origem destes efeitos de ânions na afinidade da Hb por O₂ é atribuída à ligação preferencial do ânion à estrutura da desoxi-Hb, o que aumenta a estabilidade relativa da conformação quaternária T, de baixa afinidade por oxigênio em relação à conformação quaternária R, de maior afinidade.

O IHP se liga à um sítio constituído por resíduos catiônicos localizados na região N-terminal das cadeias beta, que propiciam a ligação quando a estrutura quaternária da Hb se encontra no estado T.

Porém, a atribuição de sítios de ligação preferencial do íon cloreto à estrutura T é controversa. Uma das hipóteses sugere que o sítio para ligação deste íon esteja localizado no N-terminal das cadeias alfa, mais especificamente na Arg-141 α . Na transição conformacional do estado T para o estado R, os resíduos envolvidos na ligação de IHP e Cloreto se afastam desfazendo a estereó-química favorável à ligação. Portanto, os íons cloretos agem diminuindo a afinidade pelo ligante, aumentando os valores de pO_2 da proteína. O efeito do IHP é semelhante, porém este é um efector muito mais potente que o cloreto em virtude de sua grande afinidade pela proteína.

Embora alterem a afinidade da HbA₀ por O₂, estes efetores alostéricos não alteram a cooperatividade desta ligação. O valor do coeficiente de cooperatividade, ou coeficiente de Hill (n_{50}) da Hemoglobina A₀ na ausência de efetores alostéricos é $n_{50} = 2,40 \pm 0,1$, mostrando uma cooperatividade positiva. Na presença de 100mM de NaCl seu valor passou para $2,20 \pm 0,1$ e na presença de IHP $2,0 \pm 0,1$. Na presença de ânions podemos observar que a cooperatividade se apresenta positivamente. O quadro 1 mostra os valores de n_{50} e P_{50} para Hb A₀ na presença e ausência de ânions.

Quadro 1: Comparação do efeito do IHP e NaCl na cooperatividade e no P_{50} da Hb A₀.

| | Hb A ₀ livre de ânions | Hb A ₀ 100mM de NaCl | Hb A ₀ 200 μ M IHP e 100mM de NaCl | Hb A ₀ 200 μ M IHP |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|-----------------------------------|
| n_{50} | 2,40 \pm 0,10 | 2,20 \pm 0,10 | 2,40 \pm 0,07 | 2,0 \pm 0,10 |
| P_{50} | 1,8 mmHg | 5 mmHg | 60 mmHg | 80 mmHg |

Os dados apresentados no quadro acima, nos mostram que a presença de ânions não modifica a cooperatividade da Hb A₀, apresentando em todas as condições, n_{50} positivo. Por outro lado, a presença de ânions modifica o P_{50} da solução de hemoglobina. Na presença de NaCl e IHP os valores de P_{50} sofreram um aumento.

O efeito do pH na afinidade da HbA₀ na presença IHP é mostrado na figura 7. Esta figura mostra as curvas de oxigenação da Hb A₀ determinadas no pH 6,8 em 10mM HEPES, 200 μ M de IHP, e no pH 9,0 em 10mM CHES, 200 μ M de IHP.

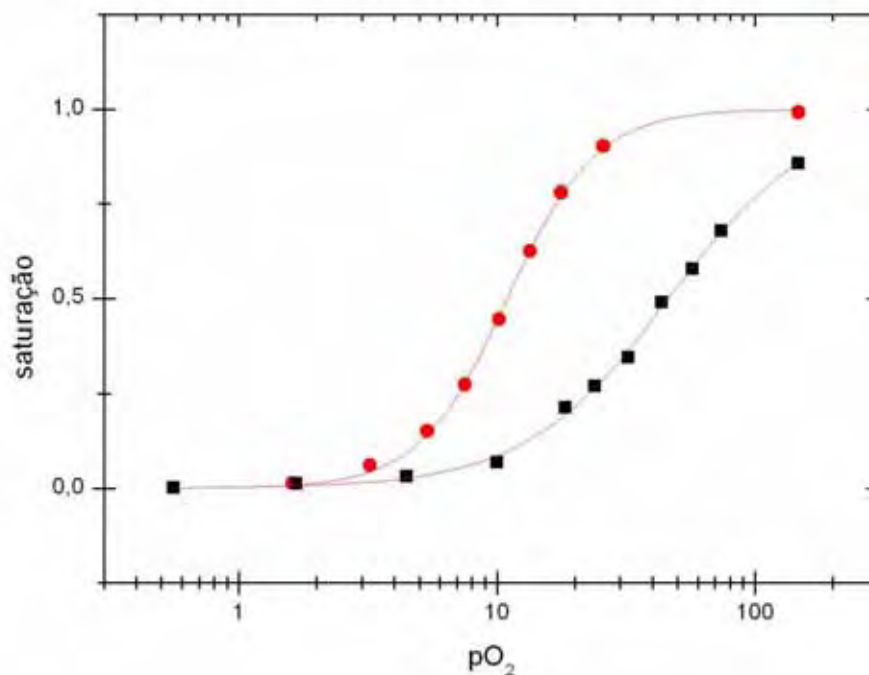


Figura 7: Efeito do pH na oxigenação da Hb A₀. Os pontos representam os valores medidos de saturação da Hb A₀ em 10 mM hepes, 200 μ M IHP em pH 6,8 (■) ;e em 10mM CHES, 200 μ M IHP pH9,0 (●) Nesse gráfico notamos que a afinidade da Hb A₀ pelo O₂, aumenta com o aumento do pH.

Na figura 7 observamos que com o aumento do pH da solução a curva de oxigenação desloca-se para a esquerda, mostrando que a afinidade da proteína pelo oxigênio aumenta com o aumento do pH, e indica que a afinidade da ligação do IHP à desoxi-Hb diminui com o aumento do pH. Os dois fatores, a menor afinidade do IHP pela Hb a pH alto e a maior facilidade na liberação de prótons da proteína

nestas condições, favorecem a transição do estado T para o estado R. A diminuição da afinidade da Hb por IHP com o aumento do pH pode ser atribuído ao aumento do grau de dissociação dos prótons ligados aos resíduos de lisinas e histidinas que constituem o sítio de ligação deste ânion.

O número de prótons associados à transição entre os estados totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb pode ser determinado a partir da dependência de $\log(p_{50})$ com o pH. A figura 8 apresenta um gráfico de valores de $\log P_{50}$ determinados para a HbA₀ em tampão com 200 μ M de IHP, com e sem 100 mM de NaCl, e diferentes valores de pH.

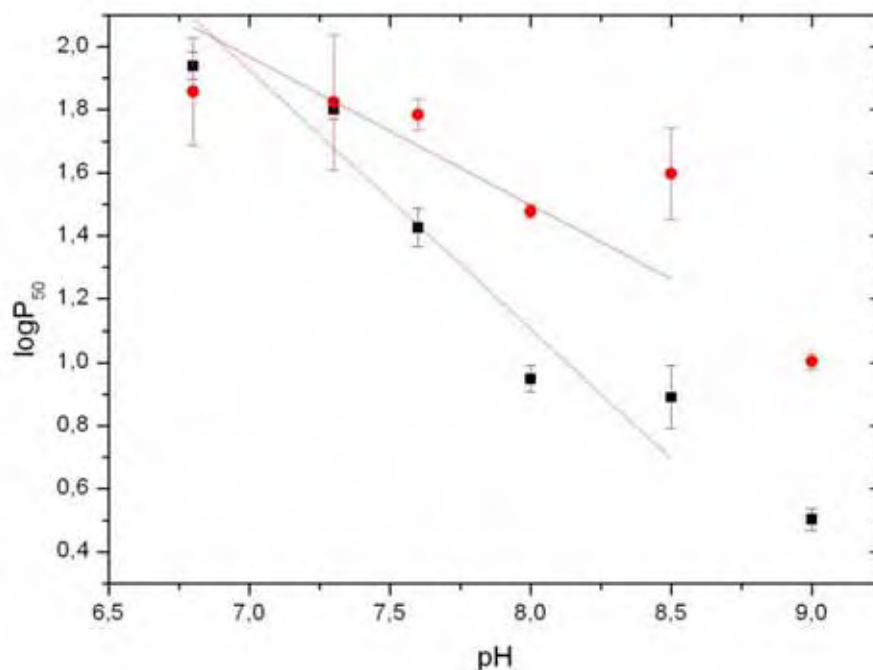


Figura 8: Efeito Bohr na oxigenação da Hb A₀. Na presença de 200 μ M de IHP e 100 mM NaCl (■) e na ausência de sal e presença de 200 μ M de IHP (●). Os pontos experimentais representam os valores de P_{50} em função do pH variando de 6,8-9,0. O ajuste linear fornece o número de prótons liberados durante a oxigenação.

A inclinação do gráfico de $\log(p_{50})$ versus pH fornece Δn_{H^+} , a diferença de prótons associados à oxi-Hb em relação à desoxi-Hb. Esta dependência é conhecida como Efeito Bohr, sendo conhecido que Δn_{H^+} de oxigenação da HbA₀ depende da concentração de NaCl na solução; na ausência de íons cloreto e outros ânions Δn_{H^+}

= $0,98 \pm 0,12$, enquanto em concentrações de NaCl maiores que ~ 50 mM e ausência de outros ânions, o número de prótons liberados na oxigenação da HbAo é de cerca de $2,20 \pm 0,12$ respectivamente [Castro 1999]. A Figura 8 mostra que na presença de IHP e ausência de NaCl $\Delta n_{H^+} = 1,88 \pm 0,17$. Quando NaCl e IHP estão presentes, o número de prótons liberados com a oxigenação aumenta para $\Delta n_{H^+} = 3,20 \pm 0,17$. Os resultados apresentados sugerem que a interação da Hb com estes diferentes ânions alteram diferencialmente os pKs dos diferentes grupos que contribuem para o efeito Bohr da proteína. Na discussão estes resultados serão analisados considerando o efeito da ligação de ânions na conformação da Hb.

A possibilidade da Arg-141 α da HbAo ser um sítio de ligação específico de cloreto foi analisada por meio de experimentos com Hb desArg, HbAo que teve as Arg-141 C-terminal das duas cadeias alfa clivadas enzimaticamente. A figura 9 mostra as curvas de oxigenação da HbAo e Hb desArg determinadas em 10 mM Hepes, pH 7,3. Observa-se que a supressão das Arg-141 aumenta a afinidade da proteína por O₂ e suprime a cooperatividade da reação.

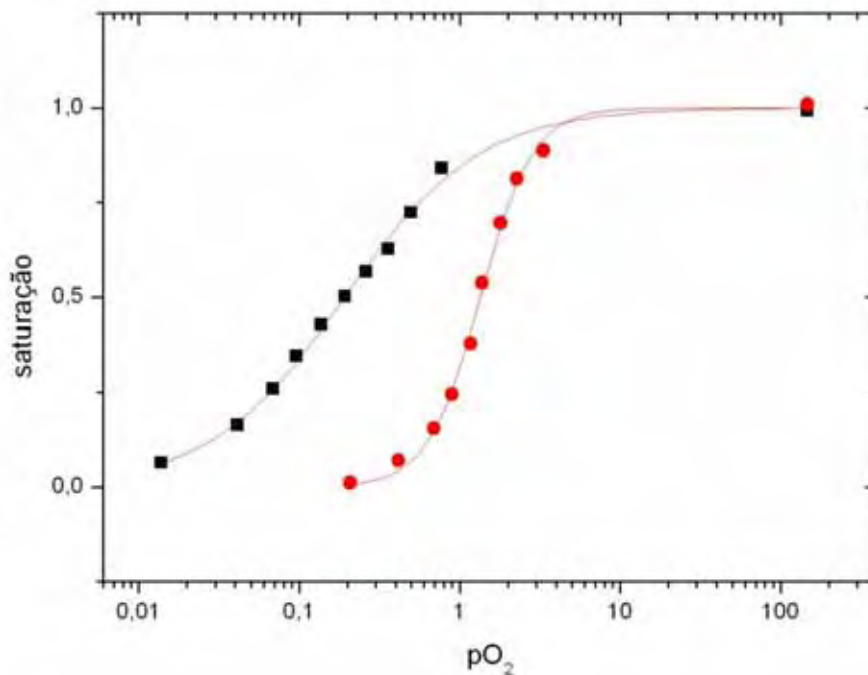
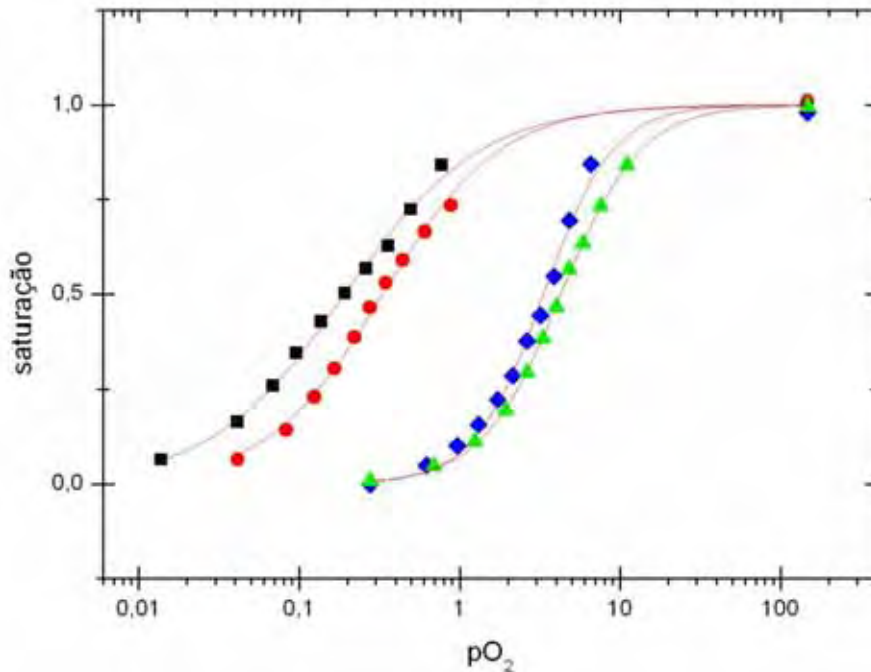


Figura 9 :Curva de oxigenação de Hb A₀(●) e Hb desArg(■), determinadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,3; 25°C.

Os efeitos de Cl e IHP na afinidade da Hb desArg por O₂ é mostrado na Figura 10, através das curvas de saturação determinadas em quatro condições distintas: na ausência de efetores, na presença de 100mM de NaCl, na presença de 200μM de IHP e na presença de 100mM de NaCl com 200μM de IHP.



Figur

a 10: Efeito de IHP e NaCl na afinidade da Hb desArg por O₂. As medidas foram realizadas em tampão Hepes 10mM, pH 7,3 e: (■) completa ausência de NaCl e IHP; (●) na presença de 100mM de NaCl e ausência de IHP; (◆) na presença de 100mM NaCl e 200μM de IHP e (▲) 200μM de IHP e ausência de NaCl. T=25 °C

A figura 10 mostra como as interações dos efetores alostéricos cloreto e IHP com a Hb desArg alteraram a afinidade desta por O₂: a adição de 100 mM NaCl desloca p50 de ~0,19 para 0,33 mmHg, enquanto que a adição de IHP desloca p50 para ~4,3 mmHg; quando na presença de IHP e NaCl o p50 ~3,3 mmHg. Portanto, estes efetores diminuem a afinidade da Hb desArg por O₂. Os valores de n₅₀ e P₅₀ para Hb desArg na presença e ausência de ânions são apresentados no quadro abaixo.

Quadro 2: Comparação do efeito do IHP e NaCl na cooperatividade (n_{50}) e na afinidade (P_{50}) da Hb desArg por O_2 .

| | Hb desArg livre de ânions | Hb desArg 100mM de NaCl | Hb desArg 200 μ M IHP e 100mM de NaCl | Hb desArg 200 μ M IHP |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|---|---------------------------|
| n_{50} | 1,04 \pm 0,05 | 1,10 \pm 0,10 | 1,80 \pm 0,20 | 1,60 \pm 0,10 |
| P_{50} | 0,19 mmHg | 0,33 mmHg | 3,3 mmHg | 4,3 mmHg |

Com relação à Hb desArg, a presença de IHP modificou a cooperatividade, assim essa hemoglobina voltou a apresentar os valores de n_{50} perdido com a retirada do resíduo de arginina 141 da cadeia alfa. Porém a presença de NaCl não foi capaz de modificar a cooperatividade, a qual continuou como não positiva. A presença de ânions aumentou os valores de P_{50} da solução de hemoglobina desArg.

A influência do pH na afinidade da hemoglobina desArg por oxigênio é mostrada na figura 11. A inclinação do gráfico de $\log(P_{50})$ em função do pH fornece o número de prótons envolvidos na oxigenação, conhecido como Efeito Bohr. Os gráficos da fig.10 também mostram que o efeito Bohr da Hb desArg não é alterado pela adição de Cl. O ajuste linear de $\log P_{50}$ versus pH, fornece o $\Delta n_{H^+(100 \text{ mM de NaCl})} = -0,84 \pm 0,11$ próton e o $\Delta n_{H^+(\text{stripped})} = -0,76 \pm 0,02 H^+$, valores que são iguais dentro do erro experimental.

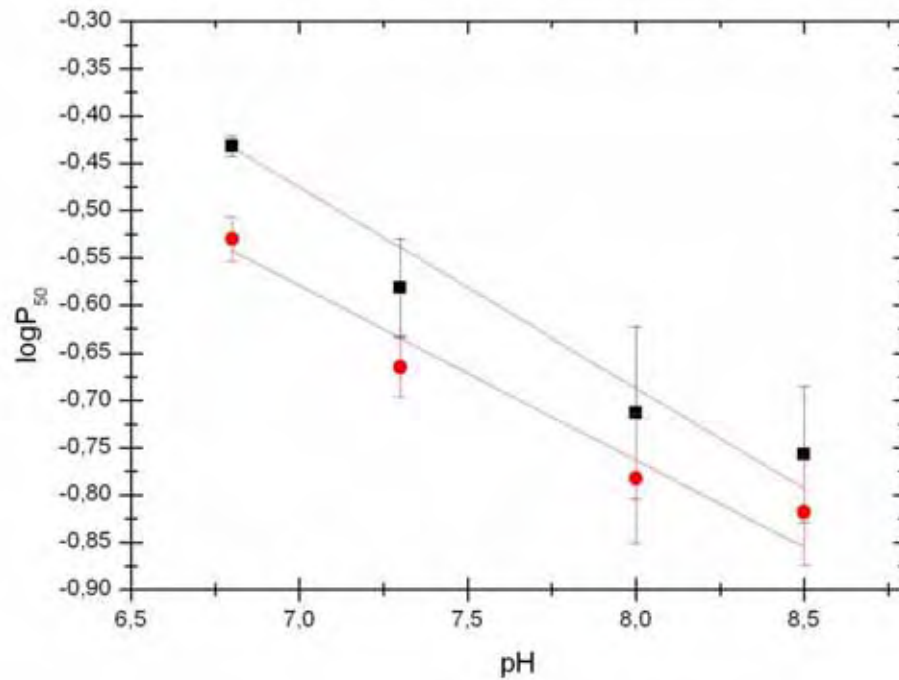


Figura 11: Efeito do pH na afinidade da Hb desArg por O₂. As medidas foram realizadas nas seguintes condições : na presença de 100 mM de NaCl (■) e ausência de sal (●). A inclinação do melhor ajuste linear forneceu o número de prótons liberados por heme.

A influência de Cl e IHP no efeito Bohr da Hb desArg é mostrado na figura 12. Esta figura mostra os gráficos de logP₅₀ da Hb desArg em função do pH determinados na presença de 200 μM de IHP, e na presença e ausência de 100mM NaCl.

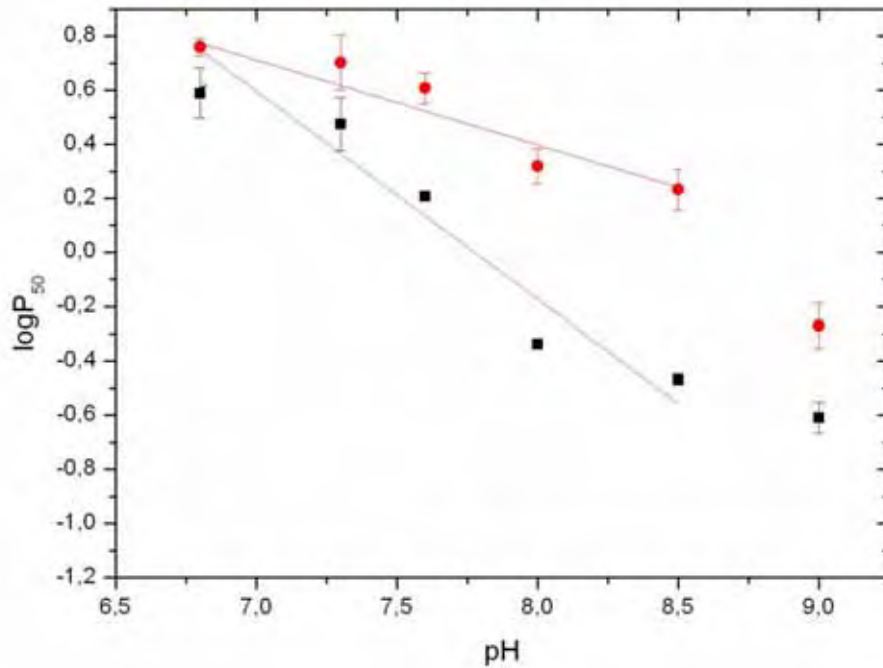


Figura 12: Efeito Bohr da Hb desArg . As medidas foram realizadas na presença de 200 μ M de IHP e 100 mM NaCl (■) e na ausência de NaCl e presença de 200 μ M de IHP (●).

Os resultados da Fig.12 mostram: que $1,24 \pm 0,04$ prótons são liberados na oxigenação da Hb desArg em 200 μ M de IHP, e $3,08 \pm 0,17$ prótons quando estão presentes na solução ambos Cl e IHP.

O quadro 3 apresenta os valores de Δn_{H^+} determinados para Hb A₀ e Hb desArg em diferentes concentrações de IHP e NaCl.

Quadro 3: Comparação do efeito do IHP e NaCl nos resultados de Efeito Bohr para Hb A₀ e Hb desArg.

| | Hb A ₀ * | Hb desArg | Hb A ₀ 200μM IHP | Hb desArg 200μM IHP |
|---------------------------------------|---------------------|-------------|-----------------------------|---------------------|
| Efeito Bohr | 0,98 ± 0,12 | 0,76 ± 0,11 | 1,88 ± 0,17 | 1,24 ± 0,04 |
| Efeito Bohr salino[#] | 2,20 ± 0,12 | 0,84 ± 0,02 | 3,20 ± 0,17 | 3,08 ± 0,17 |

*Castro, 1999

[#]presença de 100mM NaCl

O quadro acima mostra que a retirada dos resíduos de arginina não provocou diferença no Δn_{H^+} na presença e ausência de NaCl, sem IHP; em ambas as condições Δn_{H^+} de oxigenação é aproximadamente igual a 1, isto é, 1 próton é liberado durante a oxigenação da Hb desArg. Quando estes resultados são comparados com a Hb A₀, observamos que na presença de cloreto a retirada dos resíduos Arg 141- α diminuiu a liberação de prótons, passando de 2 para 1 próton liberado com a ligação de oxigênio. A ligação de IHP tanto à HbA₀ quanto à Hb desArg elevaram os valores de efeito Bohr, tanto na presença quanto na ausência de cloreto.

4.2) Determinação espectrofotométrica de mudanças estruturais quaternárias

A mudança conformacional da estrutura totalmente oxigenada (R), para a estrutura totalmente de oxigenada (T), pode ser acompanhada espectroscopicamente, através do espectro de absorção na região UV entre 270 à 300 nm. Quando a proteína passa da conformação R para a T, evidenciamos diferenças nos dois espectros, através de uma pequena banda em 290nm, sendo o único marcador da transição alostérica de T→ R. A diferença encontrada nessa banda é atribuída aos resíduos aromáticos, Tyr42 α , Trp37 β e Phe41 β (ENOKI & TYUMA, 1964) que se localizam na interface α 1 β 2.

Nestes experimentos, investigou-se a mudança estrutural entre o espectro totalmente desoxigenado e totalmente oxigenado, e a influência de efetores alostéricos como o IHP e Cloreto nessa possível mudança. Portanto, monitoramos a região UV entre 279 à 295 nm.

A figura 13 mostra a primeira derivada da diferença entre os espectros de absorção da oxi-Hb A₀ e desoxi-Hb A₀, medidos em 60 μ M (heme), 10 mM epes, pH 7,3, e isenta de outros ânions.

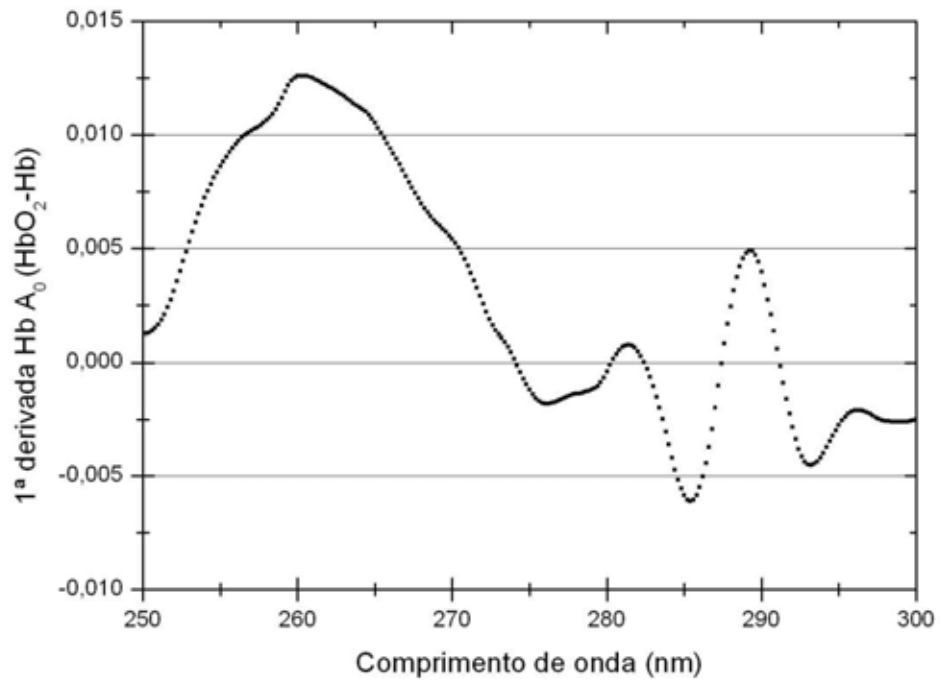


Figura 13- 1ª. derivada da diferença entre os espectros de absorção da oxi-Hb A₀ e desoxi-Hb A₀. Medidas realizadas em 60 microMolar Hb (heme), 10 mM Hepes, pH 7,3, e isenta de outros ânions.

A região entre 280 e 295 nm mostra a derivada da diferença espectral que marca a transição R-T. O efeito da ligação de ânions nas estruturas da Hb será analisado considerando esta região. Na figura 14 mostra o gráfico da figura 13 restrito à região de interesse. Este gráfico representa a condição padrão, ~60 μM Hb em 10mM Hepes, pH 7,3 à 25 °C, com a qual todos os espectros obtidos na presença de ânions e Hb desArg serão comparados.

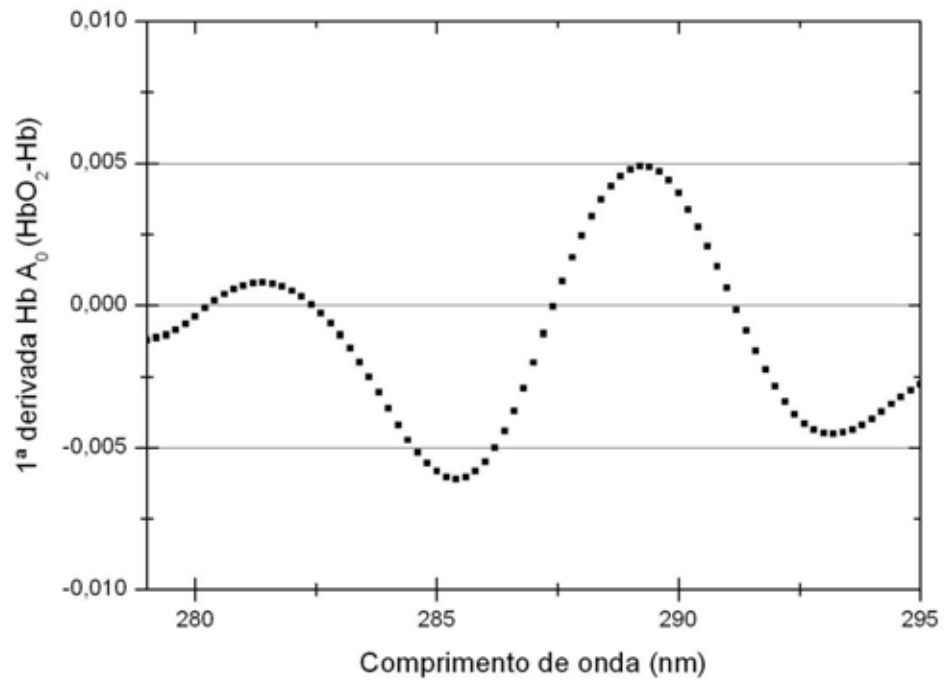


Figura 14: 1ª. derivada da diferença de absorção entre a estrutura oxi e a estrutura desoxi para Hb A₀ na ausência de ânions. Espectro total entre 279 a 295 nm.

O efeito da ligação do IHP à HbA₀ foi investigado a partir das curvas de oxigenação medidas em tampão Hepes 10mM, pH 7,3 na presença de 200μM de IHP. A 1ª. Derivada do espectro diferença oxy-desoxi é mostrado na figura 15, junto com o espectro diferença no estado padrão.

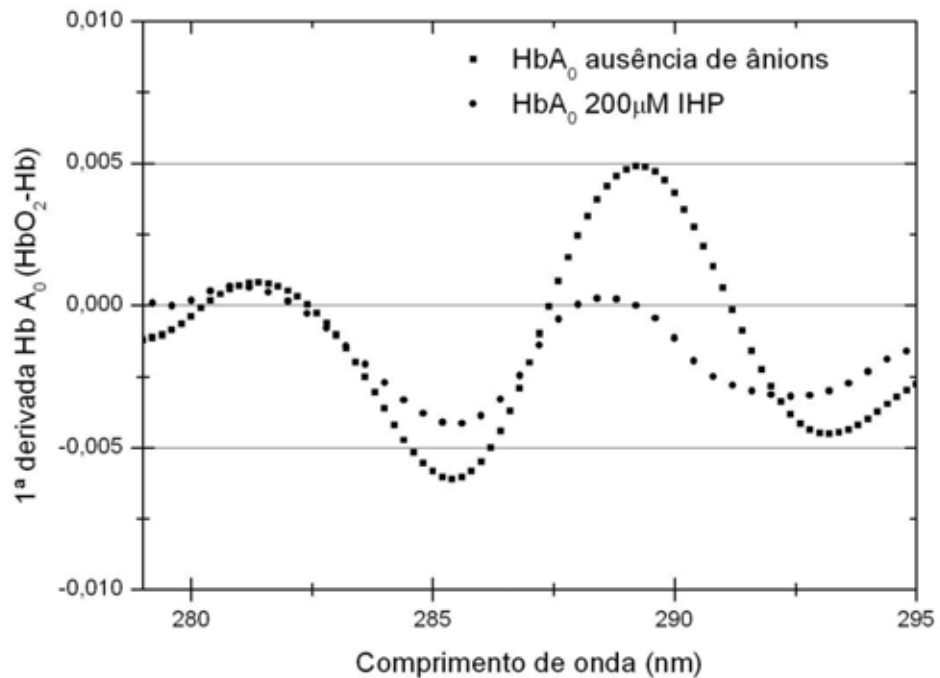


Figura 15: 1ª. derivada da diferença de absorção entre os estado oxi e desoxi da Hb A₀ em duas condições experimentais. Hb na total ausência de ânions (■) e Hb na presença de 200µM de IHP (●).

Observamos que os perfis das curvas nas duas condições mostram uma diferença na banda formada entre 285 a 290 nm. Na ausência de ânions, a curva da primeira derivada da diferença da Hb A₀ apresenta bandas muito nítidas entre 285 a 292 nm. Com a adição de IHP, observa-se um achatamento na 1ª derivada do espectro diferença e um corrimento aparente da banda para o azul (menores comprimentos de onda). Estas mudanças indicam que na presença de 200µM de IHP, a ligação de oxigênio à HbA₀ não altera o ambiente dos resíduos aromáticos da interface $\alpha 1\beta 2$, e que contribuem para a diferença espectral que marca a transição T-R. Pode-se concluir, portanto, que na presença de concentrações saturantes de IHP e ausência de NaCl a oxigenação da Hb ocorre sem que haja mudanças na estrutura quaternária da proteína, isto é, que a oxigenação ocorre toda na estrutura quaternária T, de menor afinidade pelo oxigênio. A afinidade da HbA₀-IHP por oxigênio foi determinada, p50 ~ 80mmHg e índice de cooperatividade n ~2. O alto valor de p50 é consistente com a baixa afinidade do estado T. Entretanto, a cooperatividade da ligação de O₂ à Hb, permanece a mesma na ausência e

presença de IHP. Isto indica que a cooperatividade de ligação pode ser transmitida por mudanças terciárias sem a necessidade de mudanças na estrutura quaternária.

Em concentrações um pouco maiores de IHP, observamos o mesmo efeito na proteína. O gráfico 16 apresenta além da concentração de 200 μ M de IHP a Hb A₀ na presença de 500 μ M de IHP, onde o decréscimo da amplitude da banda correspondente à transição T-R é ainda mais pronunciada que a 200 μ M de IHP.

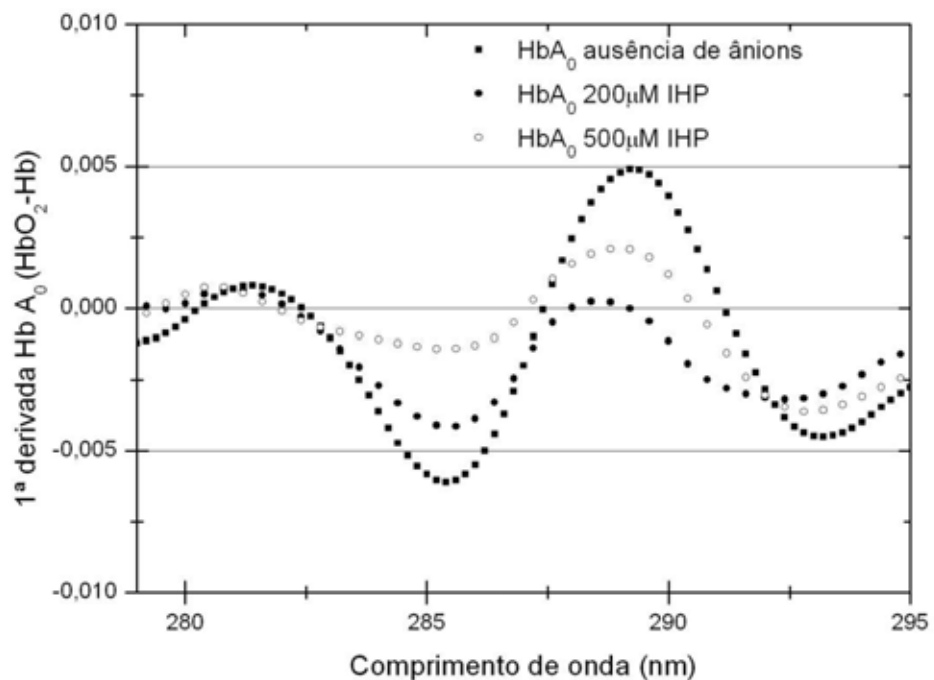


Figura 16: 1ª. derivada da diferença de absorvância da Hb A₀ na presença de duas concentrações de IHP: solução de hemoglobina com 200 μ M de IHP(●) e solução com 500 μ M de IHP(○).

Outro efector alostérico, os íons cloreto, age diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A ação desse efector na estrutura quaternária da hemoglobina também foi estudada. Na figura 17, mostramos o efeito desse anion no espectro diferença entre a Hb totalmente oxigenada e totalmente desoxigenada. Como pode-se observar, os gráficos calculados para a HbA₀ na ausência e presença de 100 mM NaCl não apresentam mudanças significativas. Isto mostra que a transição T \rightarrow R induzida pela oxigenação permanece inalterada, evidenciando

que a ligação dos íons cloreto da Hb não é capaz de prevenir esta transição quaternária. Entretanto, a ligação preferencial do íon cloreto à desoxi-HbA₀ aumenta a diferença de energia entre os estados T e R, o que justifica a diminuição da afinidade da proteína por oxigênio, como o aumentando da P₅₀ de ~1,8 mmHg na ausência de NaCl, para ~5mmHg na presença de 100 mM NaCl. A cooperatividade da HbA₀ não é alterada.

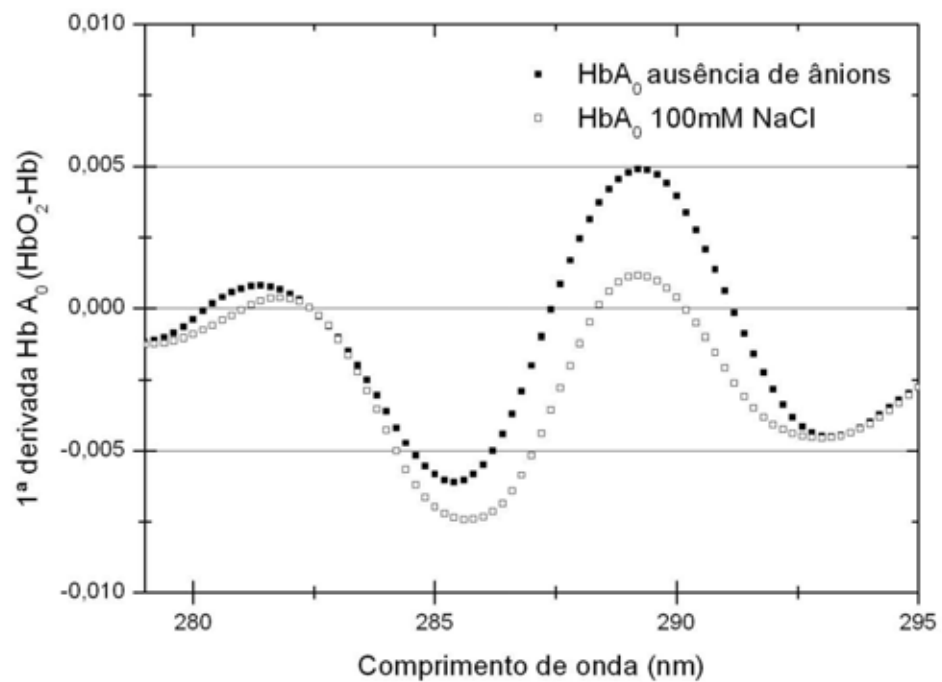


Figura 17: 1ª. derivada da diferença de absorvância da Hb A₀ livre de ânions (■) e Hb A₀ na presença de 100mM de NaCl (□) em Hepes 10mM, pH 7,3. As curvas apresentam perfis semelhantes.

A ação conjunta desses efetores, íons cloreto e IHP, na estrutura quaternária da proteína, é mostrada na figura 18.

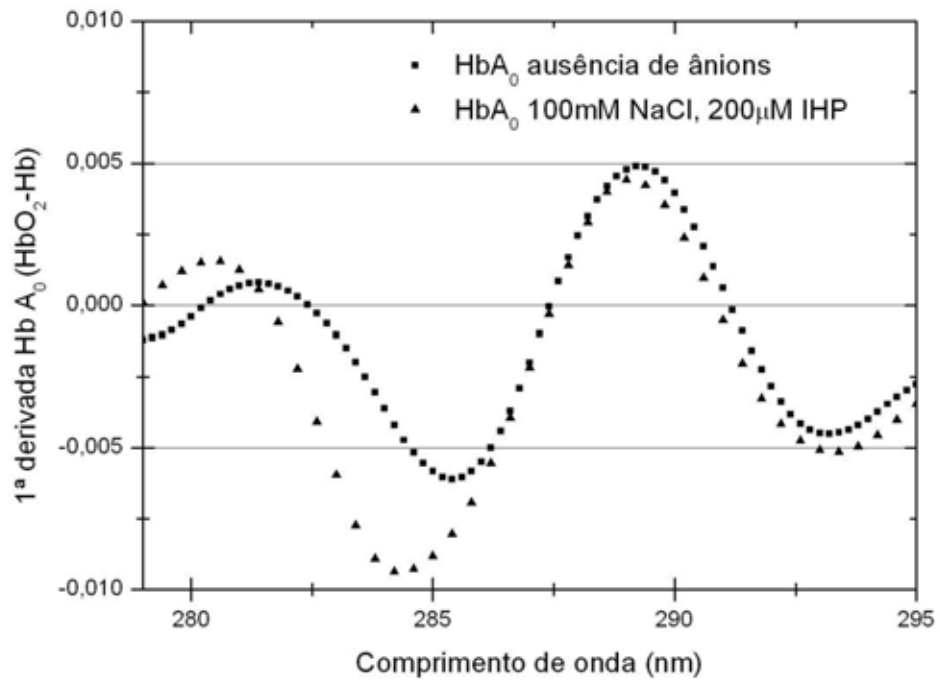


Figura 18: 1ª. derivada da diferença de absorvância da Hb A₀ livre de ânions (■) e Hb A₀ na presença de 100mM de NaCl e 200µM de IHP(▲). Os perfis de ambas as curvas apresentam-se semelhantes.

A presença de cloreto interfere na ação do IHP, diminuindo a constante de associação na presença de cloreto, dessa forma a oxigenação da Hb A₀ na presença de IHP juntamente com o cloreto, volta a apresentar mudança na estrutura quaternária. O valor de P₅₀ permanece em torno de 60mmHg e apresenta cooperatividade com mudança quaternária.

A presença de cloreto em 100mM com concentrações superiores à 200µM de IHP, apresenta o mesmo efeito. Portanto, apresentamos na figura 19 dois perfis de curvas da diferença de absorvância, na presença de cloreto com duas concentrações de IHP.

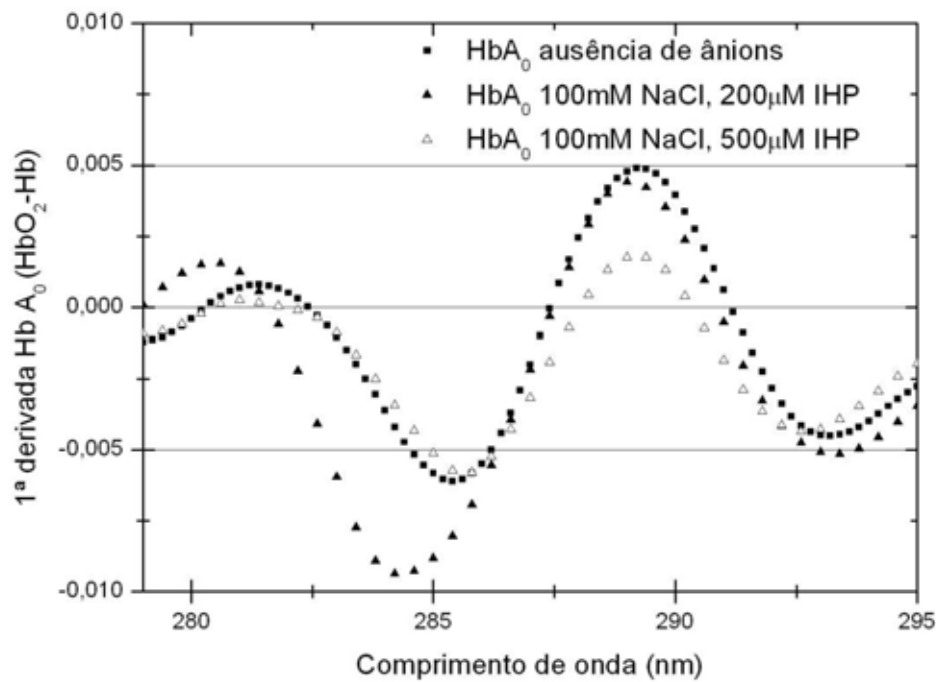


Figura 19: 1ª. Derivada da diferença de absorvância da Hb A₀ livre de ânions (■), na presença de 100mM de NaCl e 200µM de IHP (▲) e na presença de 100mM de NaCl e 500µM de IHP (△).

Assim como o efeito dos íons cloreto em conjunto com IHP, concentrações superiores à 200µM (IHP) apresentam o mesmo efeito.

A visualização do efeito dos dois ânions: cloreto e IHP, em conjunto ou separado pode ser comparado no gráfico da figura 20 onde juntamos todas as curvas de diferença de absorvância dos estado totalmente oxigenado e totalmente desoxigenado da Hb A₀ livre de ânions e na presença desses efetores alostéricos.

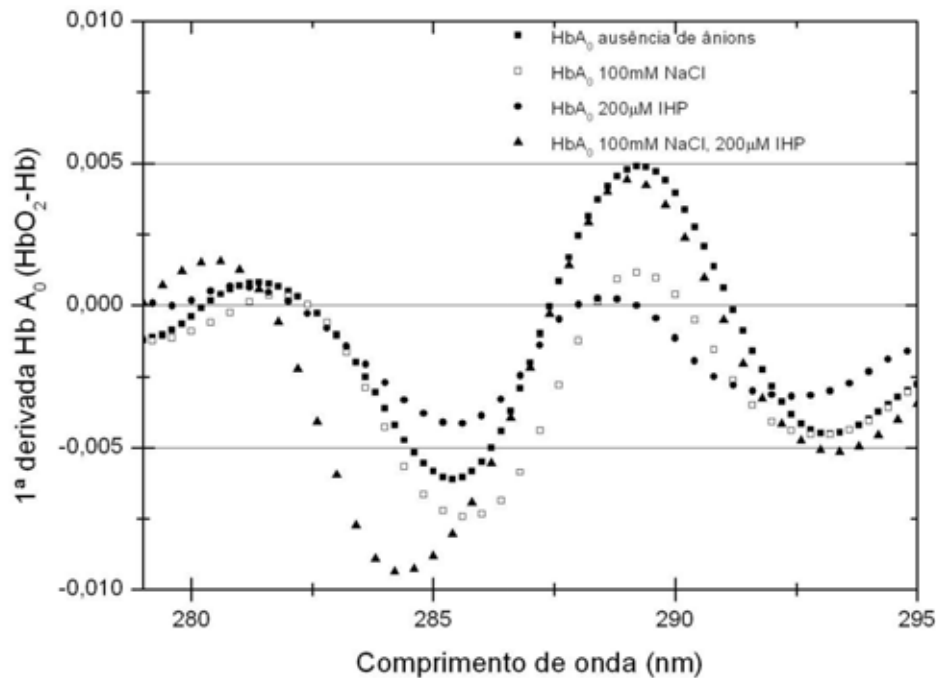


Figura 20: 1ª. Derivada da diferença de absorvância entre os estados oxi e desoxi da Hb A₀ livre de ânions(■), e na presença de: 100 mM de NaCl e ausência de IHP(□), na presença de 200µM de IHP e ausência de NaCl (●) e na presença de 100mM de NaCl e 200µM de IHP (▲).

Como mencionado anteriormente somente na presença de 200µM de IHP, observamos uma diferença no perfil da curva de diferença de absorvância da hemoglobina. Dessa forma evidenciamos que a ligação de IHP à Hb na ausência de NaCl estabiliza a estrutura da proteína na conformação quaternária T. Portanto, a oxigenação ocorre sem mudança deste nível estrutural. Já, a ligação de IHP à Hb na presença de NaCl é mais fraca, tal que a ligação de O₂ induz a transição desoxi-T para oxi-R.

O estudo dos efeitos da ligação de efetores alostéricos (Cl e IHP) sobre a mudança estrutural da Hb induzida pela ligação de O₂ foi estendido para hemoglobina desArg. Isto permitiu investigar o efeito da retirada do resíduo da arginina 141 na estabilidade das estruturas T e R da proteína. A figura 21 mostra a primeira derivada da diferença entre os espectros da proteína totalmente oxigenada e desoxigenada, medidas na ausência de ânions e presença de NaCl e IHP em diferentes concentrações.

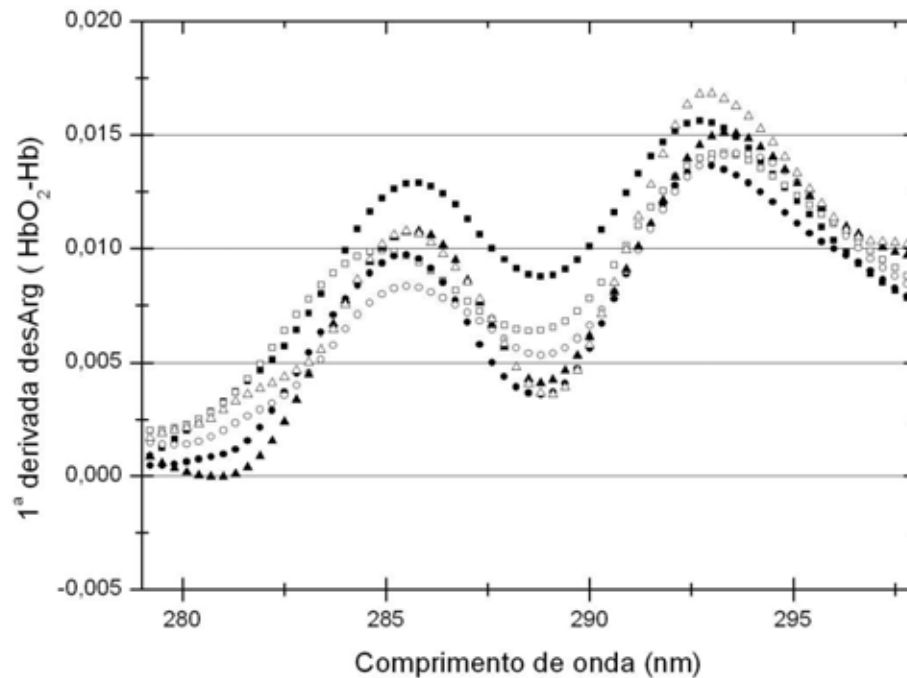


Figura 21: 1ª. derivada da diferença de absorvância entre os estados oxi e desoxi da Hb desArg livre de ânions (■), e na presença de: 100 mM de NaCl e ausência de IHP (□), na presença de 200µM de IHP e ausência de NaCl (●), na presença de 500µM de IHP e ausência de NaCl (○), na presença de 100mM de NaCl e 200µM de IHP (▲) e na presença de 100mM de NaCl e 500µM de IHP (△).

Aparentemente, a diferença espectral na região 285-290 que marca a transição R-T, não é alterada pela mudança nas condições do meio. Diferente da HbAo, a ligação do IHP na ausência de NaCl não trava a estrutura quaternária da Hb desArg no estado T, de baixa afinidade.

A arginina 141 da cadeia alfa é um dos resíduos responsáveis na estabilização do estado T, interagindo através de pontes salinas com a Lys127 α 2, com a Asp126 α 2 e com a Val α 1 (IKEDA-SAITO, 1980, KILMARTIN & ROSSI-BERNARDI, 1971). A ausência deste resíduo desloca o equilíbrio alostérico para a estrutura de maior afinidade R. Este fenômeno se reflete no aumento da afinidade da desArg por O₂, em relação à HbA₀, e conseqüente diminuição de P₅₀.

Através do gráfico da primeira derivada das diferenças de absorvância da hemoglobina desArg, percebemos que conforme adicionamos ânions na solução da Hb desArg, modificamos o pico em 290 nm. Isto pode indicar que tanto o IHP quanto o cloreto modificam a exposição dos resíduos aromáticos responsáveis pela banda que marca a transição de estados durante a oxigenação da hemoglobina interagindo

diretamente com a proteína. A hemoglobina desArg perde a cooperatividade com a perda dos resíduos, mas sofre mudanças quaternárias com a oxigenação. Com a adição de IHP, ela apresenta cooperatividade positiva e apresenta mudança de estado.

4.3) Titulação calorimétrica de IHP à forma oxigenada da HbA₀, Hb desArg (Arg- α 141 suprimida) e Hb Chesapeake (R92L).

Experimentos de titulação calorimétrica de IHP à HbA₀, Hb desArg e Hb Chesapeake em suas formas oxigenadas, na presença e na ausência de 100mM NaCl foram planejados com o objetivo de se determinar as constantes de equilíbrio de ligação, e suas respectivas entalpias. A entalpia de reação é uma quantidade que pode informar, potencialmente e associada à outras informações não calorimétricas (espectroscópicas por exemplo), a contribuição dos diversos termos moleculares que colaboram para o calor gerado na reação.

Os primeiros experimentos de titulação de IHP à HbA₀ foram realizados à temperatura de 25⁰C. Pode-se observar que a linha de base do termograma nesta temperatura não era estável e seu valor subia de forma monótona com o tempo (dados não mostrados). Os picos do calor gerado na titulação do IHP se sobrepunham à esta linha de base, dificultando o calculo do calor de titulação. Além disto, a concentração de proteína medida espectrofotometricamente após o experimento calorimétrico mostrava-se aproximadamente 35% menor que a concentração inicial.

Considerando a dificuldade de análise quantitativa dos dados de experimentos a 25 ⁰C, os experimentos passaram a ser realizados a temperatura mais baixa, de 10 ⁰C, e com maior tempo de equilíbrio entre injeções. Para a determinação do calor de diluição e de reação, foi utilizado amostras de hemoglobinas: A₀, Chesapeake e DesArg em 0,07mM em tampão Hepes 10mM, tituladas com IHP 1mM em Hepes 10 mM ambos em pH7,2 (pH medido À 25⁰ C.

A figura 22 mostra o gráfico das medidas do calor de reação por mol de IHP adicionado em função da razão de IHP adicionado por Hb. Neste gráfico são apresentados os resultados obtidos na titulação de HbA₀ e Hb Chesapeake em tampão na presença e ausência de NaCl. A figura 23 mostra os resultados obtidos na titulação de IHP à Hb desArg em tampão na presença e ausência de NaCl.

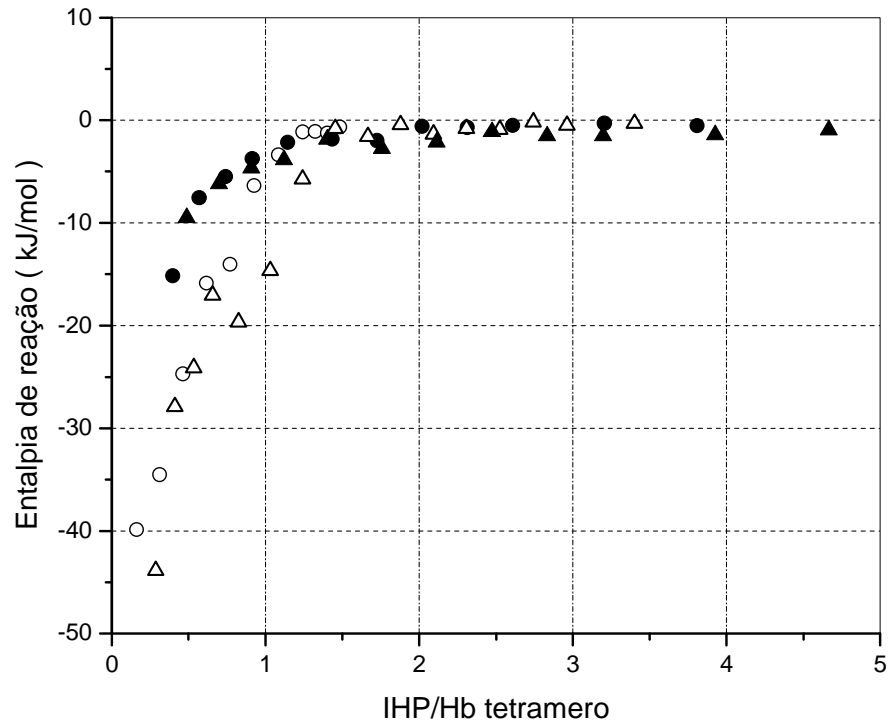


Figura22: Determinação entálpica da ligação de IHP a HbA₀ e Hb Chesapeake na presença e ausência de NaCl, T=10⁰C. Solução de HbA₀ titulada com 1mM de IHP (○); solução de Hb Chesapeake titulada com 1mM de IHP (Δ); solução de HbA₀ titulada com 2mM de IHP na presença de 100mM de NaCl (●); solução de Hb Chesapeake titulada com 2mM de IHP na presença de 100mM de NaCl(▲).

Esta figura mostra o efeito de NaCl na ligação de IHP à forma oxigenada da Hb. Na presença destes íons a variação de entalpia de titulação é bastante menor que na ausência. Isto pode indicar que a ligação pode ocorrer, mas com a liberação de O₂ ligado à proteína. Mesmo na presença de NaCl a afinidade da Hb por O₂ é muito alta e ela pode não se encontrar totalmente oxigenada às concentrações atmosféricas de O₂. Já na ausência de NaCl, além de poder haver alguma desoxigenação da proteína, a entalpia de reação é bastante aumentada.

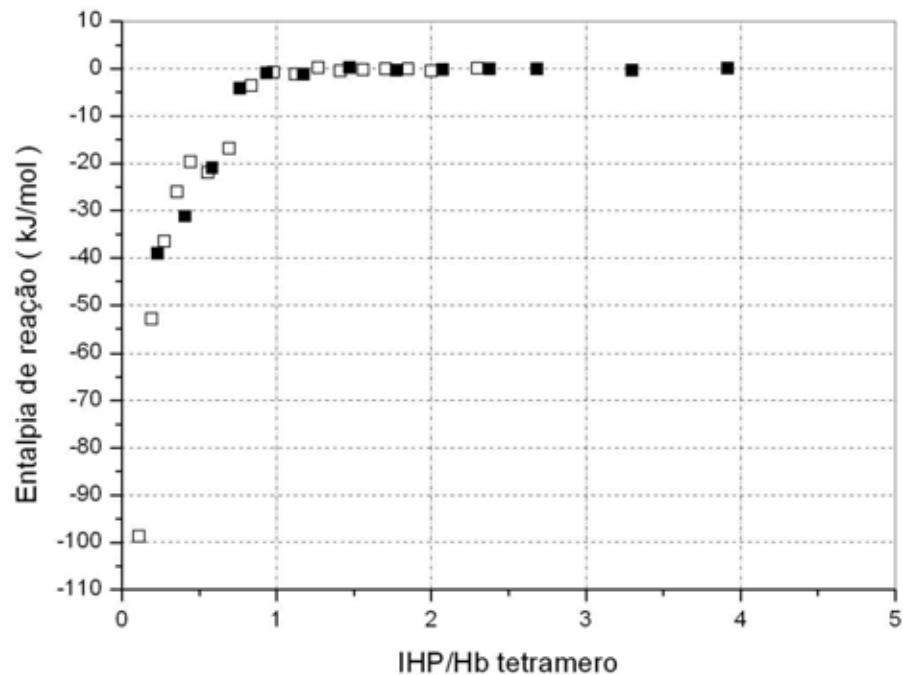


Figura23: Determinação entálpica da ligação de IHP a Hb desArg na presença e ausência de NaCl, $T=10^{\circ}\text{C}$. Solução de Hb desArg titulada com 1mM de IHP na ausência de 100mM de NaCl (□); solução de Hb desArg titulada com 2mM de IHP na presença de 100mM de NaCl (■).

Resultados similares são observados com a Hb desArg, isto é a variação da entalpia de ligação de IHP à proteína é menor na presença que na ausência de NaCl. Nota-se ainda que não há diferença entre as entalpias de ligação de IHP à HbAo e à Hb Chesapeake. Para a Hb desArg, os valores de entalpia parecem ser maiores, nas duas condições salinas, que os encontrados para as outras espécies de proteína. A relação entre as entalpias de reação com o número de prótons liberado por estas proteínas deverá ser melhor investigada. Os resultados também sugerem que as estruturas da HbAo e Hb Chesapeake sem e com IHP ligados são muito similares já que a entalpia de ligação de IHP à sua forma oxigenada são similares. A maior entalpia de ligação do IHP à Hb desArg pode estar relacionado com as mudanças estruturais quaternárias sugeridas pela ligação de IHP.

5-DISCUSSÃO

A ligação de oxigênio à Hemoglobina é apresentada nos livros texto como um exemplo do mecanismo molecular de reações bioquímicas cooperativas. Dois aspectos são destacados para explicar este mecanismo. O de que a Hb é uma proteína hetero-dimérica, que existe em duas estruturas quaternárias, T (tensa) e R (relaxada), e que a ligação de O_2 induz a mudança da estrutura quaternária T, de baixa afinidade por O_2 , para R, de alta afinidade. Esta visão leva ao conceito predominante de que a cooperatividade está necessariamente associada à mudanças quaternárias em estruturas oligoméricas.

Outro aspecto relativo ao mecanismo molecular da cooperatividade da Hb é o efeito Bohr. Este efeito é explicado considerando mudanças terciárias, disparadas pela ligação do primeiro oxigênio, e mudanças quaternárias que levam à quebra de pontes salinas entre dímeros e a consequente liberação de prótons. Além disto, o efeito Bohr sofre ação de efetores alostéricos. Esses efetores podem ser ativadores como inibidores da ligação de O_2 à Hb.

Os resultados de oxigenação da hemoglobina A_0 mostram que os efetores alostéricos, IHP e Cloreto, são inibidores da ligação de oxigênio à proteína. A ligação desses efetores deve ocorrer na estrutura quaternária T, diminuindo a afinidade da Hb pelo O_2 , porém essa ação não interfere na cooperatividade de ligação.

Com os resultados de Efeito Bohr da Hb A_0 , mostrados no presente trabalho, ficou estabelecido que tanto a ligação de IHP quanto de NaCl à molécula de Hb, altera o número de prótons liberados durante a oxigenação. A diferença de protonação entre os estados desoxi-T e oxi-R da proteína advém da mudança de pKs dos resíduos protonáveis causada pela mudança estrutural. Assim, a liberação e/ou absorção de prótons pela Hb que estão associadas com a ligação de ligantes homotrópicos (O_2) e / ou heterotrópicos (IHP, Cl, etc.) reflete as mudanças nas estruturas terciária e/ou quaternária da proteína.

Esses resultados reforçam o preceito de que efeito Bohr da Hb A_0 está constituído em duas partes, uma dependente e a outra não dependente de cloreto.

Na presença de concentrações fisiológicas de NaCl há a liberação de dois prótons na oxigenação. Na ausência destes íons, a HbA₀ em condições “stripped”, o número de prótons liberado cai para 1 (CASTRO, 1999). Colombo e Seixas em 1999 mostraram que a ligação de um próton extra induzida pela ligação de Cl⁻ à HbA₀ está também associado com o aumento de hidratação da conformação T da proteína em cerca de 50 moléculas de água (SALVAY, *et al* 2003). A comparação entre as estruturas cristalográficas da HbA₀ cristalizada em meio isoônico mostrou que a mudança de hidratação induzida pela ligação do cloreto à HbA₀ é de ordem terciária, e sugeriram que a Arg-92α poderia ser um outro sitio de ligação do íon Cl, além daquele localizado na Arg-141α. A proposição de que a Arg-141α seria um sítio de ligação específico de cloreto tem sido alvo de discussão a mais de 30 anos na literatura (CHIANCONE *et al.*, 1972, 1975; KILMARTIN *et al.*, 1980). Equivalentemente, a proposta de que a Arg-141α seria responsável pelo efeito Bohr dependente de cloreto também é uma questão aberta.

A comparação entre os resultados de Efeito Bohr na Hb A₀ e Hb desArg mostra que a deleção do resíduo Arg-α141 tem por conseqüência a diminuição de um próton liberado na oxigenação na presença de cloreto. Dessa forma, a Arg-141α está diretamente associada ao efeito Bohr dependente de cloreto, uma vez que ao contrario do que ocorre na oxigenação da HbA₀, um único próton é liberado na oxigenação da Hb desArg tanto na presença quanto na ausência de cloreto. Os estudos realizados sobre o papel do cloreto na variação de hidratação associadas à oxigenação da HbA₀ e Hb desArg mostraram que em ambos os casos a ligação de ~2 íons cloreto/tetrâmero promove mudanças terciárias na estrutura T. Em termos de variação de hidratação, a ligação do cloreto à HbA₀ e à HbdesArg é acompanhada pela ligação de cerca de 45-50 moléculas de água à superfície proteína. Isto indica que, em havendo um sítio específico para a ligação do Cl, este sítio não é a Arg-141α. Mas a Arg-141α é fundamental para o efeito Bohr dependente de cloreto.

Uma diferença marcante nas características funcionais da HbA₀ e da Hb desArg é que esta última tem maior afinidade pelo oxigênio e ausência de cooperatividade. Na ausência de ânions, a ligação de O₂ à Hb desArg é não cooperativa, na presença de NaCl o coeficiente de Hill fica entre 1 (caso não cooperativo) e 1,2 (de muito baixa cooperatividade). Entretanto, a oxigenação da Hb

desArg, à semelhança da HbA₀, ocorre com a mudança quaternária da proteína, do estado T para o estado R. Isto é mostrado comparando-se as diferenças entre os espectros, na região de UV, da oxi-Hb e desoxi-Hb, para as duas espécies e em diferentes condições de solução. Portanto, pode-se concluir que a ocorrência de mudanças na estrutura quaternária de uma proteína, induzidas pelo ligante, não é suficiente para expressão da cooperatividade, e que a cooperatividade de ligação não é fator necessário para Hb apresentar Efeito Bohr, visto o que ocorre com a Hb desArg. Ainda, os experimentos de oxigenação da Hb desArg na presença de IHP e de IHP e NaCl demonstraram que nestas condições a proteína re-adquire a capacidade de ligar oxigênio cooperativamente. Na presença de IHP o coeficiente de Hill para a ligação de O₂ à Hb desArg é da ordem de 2, ligeiramente menor que aquele observado para a HbA₀, que é aproximadamente 2,3. Estes resultados suportam a conclusão de que só as diferenças entre as estruturas quaternárias dos estados ligados e desligados da proteína pode ser insuficiente para determinar diferenças de afinidade do ligante entre estes estados.

Foi demonstrado ainda neste trabalho que o efeito Bohr da HbA₀ é dependente da concentração e tipos de ânions presentes na solução. Além disto, a ligação de oxigênio à HbA₀ é sempre cooperativa, com coeficiente de Hill em torno de 2,3 na ausência e presença de NaCl, e aumentando até próximo de 3 na presença de IHP. Como demonstrado pela região UV do espectro de oxigenação da HbA₀ com concentrações saturantes de IHP (figura 15) a ligação do IHP na Hb totalmente oxigenada trava a proteína no estado quaternário T, ocorrendo oxigenação sem mudança estrutural quaternária. Pode-se sugerir então que a liberação de prótons associado à ligação de O₂ ao complexo Hb-IHP, formado na ausência de outros ânions, ocorra sem a mudança da conformação quaternária da proteína. Portanto, tanto a cooperatividade da ligação de O₂ à Hb-IHP quanto a regulação da afinidade de ligação do oxigênio à Hb-IHP por pH (efeito Bohr) pode ocorrer só através de mudanças na estrutura terciária desta proteína.

Estudos Calorimétricos da titulação de IHP a forma oxigenada da HbA₀ e Chesapeake, mostraram que a ligação deste fosfato na presença de NaCl possui uma variação de entalpia muito menor de reação do que na ausência deste íon. E que a troca do resíduo arginina 92 da cadeia alfa não interferiu na ligação de ânion à proteína, principalmente na interação do Cl com a hemoglobina, dados da

hemoglobina Chesapeake. Na hemoglobina desArg, a variação de entalpia foi muito maior nas duas condições. Esta maior variação de entalpia pode estar associada a mudanças estruturais quaternárias. Através destes resultados podemos inferir que o IHP se liga à forma oxigenada da Hb Chesapeake, e similarmente ao que ocorre com a HbAo, estabilizando a conformação quaternária T, de menor afinidade por O₂.

Portanto, os resultados apresentados neste trabalho demonstram o quão complexo pode ser os mecanismos de interação alostérica, e que algumas interações são cruciais para a manifestação deste fenômeno. Em relação à Hb os conceitos dos mecanismos de cooperatividade e de interações alostéricas devem ser aplicados para acomodar cooperatividade sem mudança quaternária e mudança quaternária sem cooperatividade.

6-CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados da Hb A₀ e Hb desArg apresentados neste trabalho, podemos concluir que a ligação de O₂ à Hb pode ser:

- cooperativa com mudanças quaternárias;
- cooperativa sem mudanças quaternárias;
- não cooperativa com mudanças quaternárias.

O Efeito Bohr pode ser explicado por mudanças de origem terciárias e quaternárias, e ele ocorre:

- com cooperatividade e mudanças quaternárias;
- com cooperatividade sem mudanças quaternárias;
- sem cooperatividade com mudanças quaternárias.

- A Arg 141 da cadeia alfa está envolvida no Efeito Bohr dependente de cloreto.

Os íons cloreto interferem na afinidade de IHP pela Hb, porém o resíduo 92 da cadeia alfa não interfere na Entalpia de ligação de IHP à Hb tanto na presença quanto na ausência de cloreto. Já a retirada do resíduo Arg 141 da cadeia alfa aumenta a variação da Entalpia de ligação de IHP à Hb.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERS, G.K.; JOHNSON, M.L.; MILLS, F.C. Oxygenation-linked subunit interactions in human hemoglobin: experimental studies on the concentration dependence of oxygenation curves. **Biochemistry**, v.14, p.5350-5362, 1976.

ADAIR, G. The Hemoglobin System.VI. The Oxygen Dissociation Curve Of Hemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 63, p. 529-545, 1925.

ARNONE, A. X-ray diffraction study of binding of 2,3-diphosphoglycerate to human deoxyhaemoglobin. **Nature**, v. 237, p. 146-149, 1972.

BALDWIN, J. M., CHOTHIA, C. Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. **J. Mol. Biol**, v. 129, p. 158-174, 1979.

BENESCH, R. E., *et al.* Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. **Anal Biochem.**, v.55, n.1, p.245-248, 1973.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. W. H. Freeman and Company, 2002.

BONAVENTURA, J., *et al.* Partial restoration of normal functional properties in carboxypeptidase A-digested hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.69, n.8, p.2174-2178, 1972.

BRUNO, S. *et. al.* High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin. **Protein Sci.**, v. 10, n.11, p.2401-2407, 2001.

BUCCI, E.; FRONTICELLI, C. **Anion** Bohr effect of human hemoglobin. **Biochemistry**, v.24, n.2, p.371-376, 1985.

BUSCH, M. R., MACE, J.; HO, N.T.; HO, C. Roles of the β 146 histidyl residue in the molecular basis of the Bohr effect of hemoglobin: a proton nuclear magnetic resonance study. **Biochemistry**, v.30, n.7, p.1865-1877, 1991.

CASTRO, A. C. A influencia da concentração do íon cloreto no efeito Bohr da hemoglobina humana A₀. **Tese (Mestrado em Física) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto**. 1999.

CHIANCONE, E.; NORNE, J.E.; FORSÉN, S.;ANTONINI, E.;WYMAN, J. Nuclear magnetic resonance quadrupole relaxation studies of chloride binding to human oxy- and deoxyhaemoglobin. **J. Mol. Biol**, v. 70, n.3, p.675-688, 1972.

CHIANCONE, E. ; NORNE, J. E. ; FORSÉN, S. ; BONAVENTURA, J. ; BRUNORI, M. ; ANTONINI, E. ; WYMAN, J. Identification of chloride-binding sites in hemoglobin by nuclear-magnetic-resonance quadrupole-relaxation studies of hemoglobin digests. **Eur J Biochem**, v.55, n.2, p. 385-390, 1975.

CHIANCONE, E.; VECCHINI, P.; VERZILI, D.; ASCOLI, F.; ANTONINI, E. Dimeric and tetrameric hemoglobins from the mollusc *Scapharca inaequalvis*. Structural and functional properties. **J.Mol.Biol.** v.3, p. 577-592, 1981.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. The water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 4895-4899, 1996.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSEGIAN, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. **Science**, v. 256, p.655-659, 1992.

COLOMBO, M. F.; RAU, D. C.; PARSEGIAN, V. A. Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allosterism. **P.N.A.S.**, v. 91, p.10517-10520, 1994.

COLOMBO, M.F.;SANCHES, R. H Hydration-dependent conformational states of hemoglobin. Equilibrium and kinetic behavior. **Biophys Chem**, v.1, n.36, p.33-39, 1990.

COLOMBO, M.F.; SEIXAS, F.V.A novel allosteric conformation oh human Hb revealed by the hydration and anion effects on O2 binding. **Biochemistry**, v. 38, p. 11741-8, 1999.

CUI, G.; KARPLUS,M. Allostery and cooperativity revisited. **Protein Science**, v.17, p.1295-1307, 2007.

FOLK, J. E. *et al.* Carboxy-peptidase B. 4. Purification and characterization of the porcine enzyme. **J Biol Chem**, v.235, p. 2272-2277, 1960

FRONTICELLI, C.; BUCCI, E. Conformational and functional characteristics of bovine hemoglobin. **Methods Enzymol**, v.231, p. 150-163, 1994.

GARRETT, R. H.; GRISHLAM, C. M. **Biochemistry**: Enzyme specificity and allosteric regulation. Orland: Saunders College Publishing, 1995. p. 387-423.

GRAY, R. D.; GIBSON, Q. H. Binding of carbon monoxide to alpha and beta chains in tetrameric mammalian hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 246, p. 5176, 1971

Hill, A. V.The combination of hemoglobin with oxigem and with carbon monoxide. **J.Biochem**, v. 7, p. 471-480, 1913.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human Hemoglobin Genetics**. Springer-Verlag Wien New York. 1986.

HUI, H. L; KAVANAUGH, J. S; DOYLE, M. L; WIERZBA, A; ROGERS, P. H; ARNONE, A; HOLT, J. M; ACKERS, G. K; NOBLE, R. W. Structural and functional properties of human hemoglobins reassembled after synthesis in Escherichia coli. **Biochemistry**, v. 19, n. 38, p.1040-1049, 1999.

IKEDA-SAITO, M. Studies on cobalt myoglobins and hemoglobins. The effect of removal of the alpha 141 arginine residue on the functional and electronic properties of iron-cobalt hybrid hemoglobins. **J Biol Chem.** v. 18, p. 8497-8502, 1980.

IRZHAK, L.I., Christian Bohr (on the occasion of the 150th anniversary of his birth). **Human Physiology**, v. 31, p. 139-141, 2005.

KILMARTIN, J.V. ; FOGG, J.H. ; PERUTZ, M.F. Role of C-terminal histidine in the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. **Biochemistry**, v.19, n.14, p.3183-3189, 1980.

KILMARTIN, J. V. Removal of specific C-terminal residues from human hemoglobin using carboxypeptidases A and B. **Methods in Enzymology**. L. R. B. Eraldo Antonini, Emilia Chiancone, Academic PRESS. v. 76, p.167-171, 1981.

KISTER, J.; POYART, C.; EDESTEIN, S.J. Oxygen-organophosphate linkage in hemoglobin A. The double-hump effect. **Biophys. J**, v. 52, p.527-535, 1987.

KOSLAND, D.E.; NEMETHY, G.; FIMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. **Biochemistry**, v.5, p. 365-385, 1966.

KWISTKOWSKI, L.D; NOBLE, R. W. Contribution of Arginine (HC3)141 alpha to the Bohr Effect of the Fourth Binding step in the reaction of ligand with human hemoglobin. **Proteins**. v. 2, p. 72-77, 1987.

LABERGE, M.; KOVESI, I.; YONETANI, T.; FIDY, J. R-state hemoglobin bound to heterotropic effectors: models of the DPG, IHP and RSR13 binding sites. **FEBS Letter**, v.579, p.627-632, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p. 680-685, 1970.

LEVINE, L. R.; FEDERICI, M. Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy. **Biochemistry**, v.11, p. 2600-2606, 1982.

LOUIE, G.; ENGLANDER, J.J., ENGLANDER, S.W. Salt, phosphate and the Bohr effect at the Hemoglobin Beta chain C terminus Studied by Hydrogen exchange. **Mol Biol**, v.201, p765-772, 1988.

MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J. P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. **J. Mol. Biol**, v.12, p.88-118, 1965.

PERUTZ, M. F.; FERMI, G.; POYART, C.; PANIER, J.; KISTER, J. A novel allosteric mechanism in haemoglobin. **J. Mol. Biol.**, n. 233, p. 536-545, 1993.

PERUTZ, M. F.; FERSHT, A. R.; SIMON, S. R.; ROBERTS, G. C.; Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transitions in methemoglobin, **Biochemistry**, n.10, v.13, p. 2174-86, 1974.

PERUTZ, M.F.; GRONENBORN, A. M.; CLORE, G.M.; FOGG, J.H.;SHIH, D.T. The pka values of two histidine residues in human haemoglobin, the Bohr effect, and the dipole moments of α -helices. **J. Mol.Biol**, n.3, v.183, p.491-498, 1985.

PERUTZ, M. F.; IMAI, K. Regulation of oxygen affinity of mammalian haemoglobins. **J. Mol. Biol.**, n. 136, p.183-191, 1980.

PERUTZ, M. F.; KILMARTIN, J. V.; NISHIKURA, K.; ROLLEMA, H. S. Identification of residues contributing to the bohr effect of human haemoglobin. **J. Mol. Biol.**, v. 138, p. 649-670, 1980.

PERUTZ, M.F.; MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; GOAMAN, L.C.; Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. **Nature**, v,13, p.131-139, 1968.

PERUTZ, M. F.; SHIH, D. T. B.; WILLIAMSON, D. The chloride effect in human haemoglobin: a new kind of allosteric mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 239, p. 555-560, 1994.

PERUTZ, M. F. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. **Nature**, n. 228, p. 726-739, 1970.

PERUTZ, M. F.; WILKINSON, A. J.; PAOLI, M.; DODSON, G. G. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited., **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct**, v. 27, p. 1-34, 1998.

RIGGS, A. Preparation of blood hemoglobins of vertebrates. **Methods Enzymol**, v.76, p.5-29, 1981.

RUSSU, I. M.; HO, C. Assessment of role of beta 146-histidyl and other histidyl residues in the Bohr effect of human normal adult hemoglobin. **Biochemistry**, v.25, n.7, p.1706-1716, 1986.

SALVAY, A. G. et al. The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin. **Biophys. J.** v.1, p. 564-570, 2003.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal**, 5^a ed. Santos editor, 2002.

SEIXAS, F. A., DE AZEVEDO, W. F., COLOMBO, M. F. Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A(O) fully stripped of any anions. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 55, p.1914-1916, 1999.

SEIXAS, F. A. V. Influência de Cloreto, 2,3 dpg, Atp e Ihp Na Estrutura E Função Das Hbs Humana E Bovina. Estudos Termodinâmicos E Cristalográficos. **Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.** 2002.

SHIBAYAMA, N.; SAIGO, S. Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels. **J. Mol. Biol.**, v. 251, p. 203-209, 1995.

SHIH, D. T-b.; LUISI, B.F.; MIYAZAKI, G. PERUTZ, M.F.; NAGAI, K. A Mutagenic Study of the Allosteric Linkage of His (HC3) 146 β in haemoglobin. **J. Mol. Biol.**, v.230, p.1291-1296, 1993.

SILVA, M. M.; ROGERS, P. H.; ARNONE, A. A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-angstroms resolution. **J. Biol. Chem**, v. 267, p. 17248, 1992.

STRYER, L. **Bioquímica**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.

SUN, D. P., ZOU, M., HO, N. T., HO, C. Contribution of surface histidyl residues in the α -chain to the effect of human normal adult hemoglobin: roles of global electrostatic effects. **Biochemistry**, v.36, n.22, p.6663-6673, 1997.

TOSQUI, P. O papel do cloreto na estabilização de um novo estado alostérico das hemoglobinas S e desArg humanas e hemoglobina bovina. 101p.Dissertação(Mestrado em Biofísica Molecular)- **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.**

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Bioquímica**. Porto Alegre. Artmed editora, 2000, 931 p.

WYMAN, J. Jr. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: A second look. **Adv Protein Chem**, v.19, p.223-86, 1964.

YONETANI, T., PARK, Q.S., TSUNESHIGE, A., IMAI, K., KANAORI, K. Global allostery model of hemoglobin: modulation of O₂-affinity cooperativity and Bohr effect by heterotropic allosteric effectors. **J. Biol Chem**. v. 277, p. 34508-34520, 2002.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura