

## ESTUDO DO EFEITO BOHR NA COOPERATIVIDADE DA HB

**DESARG.** Vanessa de Cássia Teixeira da Silva, Márcio Francisco Colombo, Priscilla Tosqui. – Biofísica - Ciências Biológicas - Departamento de Física – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto.

A hemoglobina (Hb) é uma proteína alostérica responsável pelo transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos órgãos respiratórios para os tecidos. Nos vertebrados ela é encontrada na circulação sanguínea dentro de células chamadas eritrócitos. A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias globulares (globinas) ( $\alpha_2\beta_2$ ), cada qual complexada a um grupo prostético heme formada pelo complexo de protoporfirina IX que possui um átomo de ferro no centro (Lehninger et al., 1993). Na hemoglobina humana (HbA) a cadeia  $\alpha$  contém 141 resíduos aminoácidos, e a cadeia  $\beta$  146 resíduos.

A ligação do  $O_2$  à Hb é um processo regulado por interações alostéricas tanto homotrópicas quanto heterotrópicas. Quando a afinidade da ligação de um ligante X é alterada pela ligação de outro ligante X, este fenômeno é chamado de efeito alostérico homotrópico. Porém se a ligação deste ligante X exercer influência na afinidade da ligação de um ligante Y, este efeito é chamado de efeito alostérico heterotrópico. Para a Hb a ligação das quatro moléculas de oxigênio é um processo cooperativo, regulado pelo próprio  $O_2$  (regulação homotrópica) e também pelos efetores heterotrópicos da Hb como: íons cloreto, fosfatos orgânicos, prótons e água que, dependendo da atividade, interferem na afinidade da Hb por  $O_2$ .

O modelo de Monod, Wyman e Changeaux em 1965 (Monod, J. et al. 1965) é o modelo mais popular para a descrição do mecanismo de ligação cooperativa de ligantes à proteínas e enzimas. O modelo considera que proteínas cooperativas são compostas por um arranjo de subunidades que alternam entre si dois estados oligoméricos com estruturas quaternárias diferentes, reguladas pela saturação do ligante. Um estado tenso (T) e um relaxado (R) que diferem pelo arranjo das subunidades, e portanto no número e intensidade de interações intermoleculares. O número e intensidade de interações terciárias e quaternárias no estado T dificultam, relativamente ao estado relaxado (R), a ligação do substrato. Portanto, o estado T representa o estado de baixa afinidade, e o R o de alta afinidade pelo ligante.

Outros estudos realizados em nosso laboratório (Colombo, M. F. e Seixas, F. A., 1999) mostraram que a desoxi-Hb existe em dois estados alostéricos,  $T_0$  e  $T_x$ . O novo estado chamado de  $T_0$  (desoxi-Hb livre de ânions) possui uma afinidade por oxigênio e hidratação intermediária aos extremos  $T_x$ , desoxiHb complexada com ânions, e R(oxi-Hb). Dessa forma os autores propuseram um novo modelo de oxigenação da Hb que concilia os dois estados clássicos da proteína (R e T) com o novo estado intermediário  $T_0$  (Colombo, M. F. e Seixas, F. A., 1999).

Em 1978, Kilmartin e colaboradores propuseram que os íons cloreto ligavam-se a sítios específicos da HbA, no N-terminal do grupamento amino da Val 1 da cadeia  $\alpha_2$  e ao grupo guanidina da Arg 141 da cadeia  $\alpha_1$  no C-terminal. Alternativamente, Perutz e colaboradores em 1993 e 1994 postularam que a regulação da afinidade por  $O_2$  na presença de  $Cl^-$  ocorre através de interações eletrostáticas não específicas. Neste caso a ação do íon cloreto consiste em neutralizar o excesso de cargas positivas na cavidade central da Hb, através de condensação iônica das cargas positivas dos resíduos com os íons  $Cl^-$  (Perutz *et al.*, 1993). Estudos cristalográficos em 1999 de Hui e colaboradores mostraram que o íon cloreto poderia se ligar a HbA pelos resíduos arg141 $\alpha_1$  e arg141 $\alpha_2$ . Nosso grupo de pesquisas Seixas, F. A. et al., (1999) cristalizou a desoxi-Hb humana na total ausência de ânions ( $T_0$ ) e determinou por difração de Raios-X sua estrutura no cristal com resolução de 1.8 Angstroms. Estes dados cristalográficos confirmaram que a ligação de ânions à desoxi-Hb diminui a área de superfície protéica acessível ao solvente, e também sugeriu a localização dos sítios de ligação de cloreto à desoxi-Hb as Args 141 e 92  $\alpha$  (Seixas, F. A., 2002).

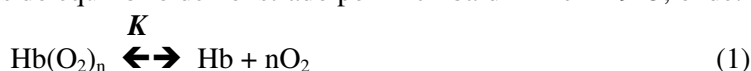
Outro efector alostérico, íons ( $H^+$ ) também influenciam na captação e liberação de oxigênio pela hemoglobina. Observa-se que a afinidade da Hb pelo oxigênio aumenta com o aumento do pH (ou diminuição da concentração de  $H^+$  livres em solução), fenômeno conhecido como efeito Bohr alcalino. Este efeito revela que prótons ligados ao estado T da Hb são

liberados para a solução no transcurso da ligação sequencial de oxigênio à proteína, e devido às mudanças conformacionais induzidas pela ligação deste ligante.

A hemoglobina objeto de estudo deste projeto é a Hb desArg. Esta Hb teve seu resíduo C-terminal a Arginina 141 da cadeia  $\alpha$  removido especificamente pela ação da enzima carboxipeptidase B. Esta Arginina C-terminal esta supostamente associada com efeito Bohr (Bonaventura et al, 1974), e com o efeito do íon cloreto em suas propriedades funcionais. A Hb desArg possui o equilíbrio deslocado para o estado R, já que a perda da Arg 141  $\alpha$  desfaz importantes pontes salinas desta ARG com outros resíduos, que mantêm a estabilidade do estado tenso. Consequência deste fato é o deslocamento do equilíbrio para o estado relaxado (R), refletindo uma mudança nos valores de  $p_{50}$ ,  $n_{50}$  e constantes de associação/dissociação.

A amostra de sangue para a obtenção da HbA ( $A_0 + A_2$ ), fração  $A_0$  e preparação da Hb desArg foi coletada de um indivíduo adulto, saudável e não fumante, e purificada segundo Colombo e Bonilla, 1996. A fração  $A_0$  obtida sofreu a ação da enzima Carboxipeptidase B(CPB), para a remoção do resíduo arginina carboxi-terminal das cadeias  $\alpha$ . A enzima foi utilizada em uma proporção de 1 parte de CPB para 1000 Hbs, após este processo a amostra foi purificada e deionizada.

Para os experimentos foram realizados com curvas de oxigenação obtidas pelo método Tonométrico-espectrofotométrico. O tonômetro é formado por um corpo principal de vidro, uma válvula que controla entrada e saída dos gases, uma saída conectora por onde são feitas as injeções de oxigênio, e uma cubeta acoplada, onde fica a amostra com volume de 3 ml. O espectro de absorção da Hb totalmente oxigenada na região visível apresenta picos em 540nm e 576nm e o espectro absorção da Hb totalmente desoxigenada apresenta pico em 550nm. Pela diferença nos espectros é possível obter os parâmetros funcionais  $p_{50}$  e  $n_{50}$  calculados a partir das equações derivadas do equilíbrio demonstrado por Archibald Hill em 1913, onde:



onde: K é a constante de dissociação:

$$K = \frac{[\text{Hb} \cdot (\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}][\text{O}_2]^n} \quad (2)$$

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

$$\bar{Y} = \frac{n[\text{Hb} \cdot (\text{O}_2)_n]}{n([\text{Hb}] + [\text{Hb} \cdot (\text{O}_2)_n])} \quad (3)$$

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

$$\bar{Y} = \frac{[\text{pO}_2]^n}{K + [\text{pO}_2]^n} \quad (4)$$

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

$$\log\left(\frac{\bar{Y}}{1 - \bar{Y}}\right) = n_H \log(\text{pO}_2) - \log K \quad (5)$$

O gráfico de  $\log [\bar{Y} / (1 - \bar{Y})]$  contra  $\log \text{pO}_2$ , é chamado de “gráfico de Hill”,. Sua inclinação  $n_H$  no ponto médio de ligação ( $\bar{Y} = 0,5$ ) é chamado de coeficiente de Hill e o valor da afinidade da Hb por  $\text{O}_2$ , ( $p_{50}$ ), é dado pelo valor de  $\text{pO}_2$

Os valores de  $n_{50}$  (cooperatividade aparente) para Hb desArg em pH 6,8, 7,3 e 8,0 tampão Hepes 10mM na ausência e presença de 100mM NaCl e pH 8,5 e 9,0 tampão CHES 10mM na presença e ausência de 100mM NaCl são apresentados na tabela 1.

**Tabela1:valores de  $n_{50}$  para HbdesArg em diferentes condições:**

pH/ stripped	$n_{50}$	pH/NaCl 100mM	$n_{50}$
6,8	1,2 $\pm$ 0,1	6,8	1,50 $\pm$ 0,05
7,3	1,2 $\pm$ 0,1	7,3	1,2 $\pm$ 0,03
8,0	1,11 $\pm$ 0,05	8,0	1,00 $\pm$ 0,05
8,5	1,17 $\pm$ 0,1	8,5	1,2 $\pm$ 0,1
9,0	0,98 $\pm$ 0,03	9,0	1,3 $\pm$ 0,1

Os valores de  $n_{50}$  refletem o grau de cooperatividade da ligação, que é um número menor que a quantidade total de sítios de ligação do oxigênio. Como mostra a tabela 1, os valores de  $n_{50}$  encontrados, nas diferentes condições de pH e sal citadas acima, permanecem em torno de 1. Na hemoglobina humana, este numero fica em torno de 2,5 nessas mesmas condições. A Hb desArg, apresenta um deslocamento do estado T  $\rightarrow$  R ( desoxi-oxi) muito mais rápido que a HbA, consequencia deste fato é uma afinidade pelo oxigênio aumentada, demonstrada pelos valores de  $p_{50}$  menores que os da HbA e uma cooperatividade muito alta. Os valores de  $n_{50} \sim 1$  que caracterizam ausência de cooperatividade, ou cooperatividade de cadeias globinicas aparecem nas medidas com Hb desArg provavelmente devido a mudanças terciárias que já ocorrem com a oxigenação. Este fato é confirmado por experimentos com IHP, que por ser um fosfato organico forte estabiliza a estrutura T e, consequentemente, diminui a velocidade da transição T-R aumentando os valores de  $n_{50}$  (Tosqui, 2003).

Em nossos experimentos de efeito Bohr, no entanto, o  $n_{50}$  continua em torno de 1 sugerindo que a influência de prótons na oxigenação não altera a cooperatividade da proteína.

### Referências Bibliográficas:

BONAVENTURA, J., *et al.* Functional properties of carboxipeptidase-digested hemoglobins. **J. Mol. Biol.** v.82, n.4, p.499-511, 1974.

COLOMBO, M. F.; BONILLA-RODRIGUES, G. O. The Water effect on allosteric regulation of hemoglobin probed in water/glucose and water/glycine solutions. **J. Biol Chem.** V. 271, p. 4895-9, 1996.

COLOMBO, M. F.; SEIXAS, F. A. V. Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on O(2) binding. **Biochemistry.** v.38, n.36, p.11741-11748, 1999.

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

HUI, H. L., *et al.* Structural and functional properties of human hemoglobins reassembled after synthesis in *Escherichia coli*. **Biochemistry.** v. 38, p. 1040-49, 1999.

LEHNINGER, R. H. *et al.* **Principles of Biochemistry.** 2. ed. New York: Worth, Sarvier.1993.  
BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry.** 5. ed. W. H. Freeman and Company, 2002.

KILMATHIRN, J. V., IMAI, K., JONES, R. T., FARUQUI, A. R., BALDUWIN, J. M. Role of Bohr group salt bridges in cooperativity in hemoglobin. **Biochim Biophys. Acta**, v.534,p.15-25, 1978.

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. *et al.* A Novel allosteric mechanism in hemoglobin: structure of bovine deoxyhemoglobin absence of specific chloride-binding sites and origin of the chloride-linked Bohr effect in bovine and human hemoglobin. **J. Mol. Biol.**, v.233, p.536-545, 1993.

PERUTZ, M. F., *et al.* The chloride effect in human hemoglobin: a new kind of allosteric mechanism. **J. Mol Biol.**, v.239, p.555-560, 1994.

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.

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 Física)- **Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto**, 2003.

**Bolsa:FAPESP**