

Resumo de Tese / Thesis

## O papel das Argininas alfa-92 e alfa-141 na regulação das propriedades funcionais de hemoglobinas por íons cloreto

*The role of alpha-92 and alpha-141 arginines in the hemoglobin functional properties regulated by chloride ions*

Priscilla Tosqui

Orientador: Marcio Francisco Colombo

### Resumo

A oxigenação da Hb humana (HbA) requer um modelo de três estados: dois estados desoxi To e Tx, livre e complexado com anions, respectivamente e um estado R oxigênio. A regulação entre esses estados é modulada pela presença de anions, tais como cloreto, que se ligam ao estado T. A ligação de cloreto, entretanto, permanece controversa. O objetivo deste trabalho foi o estudo das argininas 92 $\alpha$  (interface  $\alpha 1\beta 2$ ) e 141 $\alpha$  (C-terminal) como sítios de ligação de cloreto. Para isso, estudamos Hbs com mutações sítio dirigidas: mutantes naturais Hb J Cape Town (R92Q), desArg (R141 $\Delta$ ), Chesapeake (R92L) e a construída Chesapeake desArg (R92L,141 $\Delta$ ). As Hbs foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas. Através de curvas de oxigenação, medimos afinidade e cooperatividade, variando a atividade de água e efeito Bohr na presença e ausência de cloreto. Características estruturais foram obtidas por espectroscopia 1H RMN. Parâmetros de oxigenação e Efeito Bohr medidos indicaram uma afinidade maior e cooperatividade menor na ausência e presença de cloreto para todos os mutantes. Modificações estruturais representaram aspectos funcionais das Hbs modificadas, como aumento significativo na afinidade e mudanças na cooperatividade. Estudos da atividade de água em função da concentração de cloreto revelaram que a Hb desArg foi a única Hb modificada que seguiu o modelo de três estados. As demais não apresentaram o estado Tx, fato confirmado pelo número de moléculas de água ligadas durante a transição desoxi-oxi. Este comportamento sugere que a Arginina 92 poderia ser responsável pela ligação de cloreto, uma vez que a oxigenação das Hbs sem esse resíduo não pode ser ajustada pelo modelo de

três estados. Contudo, o efeito Bohr mostrou que todas as Hbs modificadas liberaram ~ 1 próton na presença de cloreto, diferente da HbA que libera ~ 2, sugerindo um papel para arginina 141 no efeito Bohr terciário e quaternário.

**Descritores:** Eritrócitos; Regulação alostérica; Sítios de ligação; Oxigenação.

### Abstract

The oxygenation of human Hb (HbA) demands a three state model: two deoxy states To and Tx, free and complexed with anions respectively, and an oxy R state. The regulation between these states is modulated by the presence of anions, such as chloride, that binds to T state. The binding of chloride, however, remains controversial. The aim of this work is the study of arginines 92a ( $\alpha 1\beta 2$  interface) and 141a (C-terminal) as chloride binding sites. To investigate that, we have studied 92 and 141 site directed mutant species: natural mutants Hb J-Cape-Town (R92Q), desArg (R141 $\Delta$ ), Chesapeake (R92L), and the constructed Chesapeake desArg (R92L,141 $\Delta$ ). We expressed Hbs in *Escherichia coli* and purified. Through oxygen binding curves we measured affinity and cooperativity, in function of water effect and Bohr effect in presence and absence of chloride. Structural features were obtained through 1H NMR spectroscopy. Oxygen binding properties and Bohr effect measured indicated a higher affinity and lower cooperativity in absence and presence of chloride for all mutants. Structural changes represent functional aspects of mutant Hbs,

Resumo de tese de doutorado apresentado ao Departamento de Física, área Biofísica Molecular, na Unesp-Ibilce, São José do Rio Preto (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Correspondência:** Priscilla Tosqui  
Laboratório de Espectroscopia – Depto de Física – Unesp/Ibilce  
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jd Nazareth  
15054-000 – São José do Rio Preto (SP), Brasil  
Tel.: (55 17) 3221-2200 ramal 2705  
E-mail: pritosqui@gmail.com

such as a significant rise in affinity or a change in cooperativity. Water activity studies conducted as a function of chloride concentration showed that the only Hb desArg follows the three state model. The other mutant Hbs do not exhibit the T<sub>x</sub> state, a fact confirmed by the number of water molecules bound to each Hb during the deoxy-oxy transition. This behavior suggests that the Arginine 92 site could be responsible for chloride binding to Hb, since oxygenation of 92 mutant Hbs cannot be adjusted by the three state model. However, Bohr effect showed that all mutant Hbs released ~1 proton in chloride presence, different from HbA that releases ~2, suggesting a role for 141 arginine in the tertiary and quaternary Bohr effect.

**Keywords:** Erythrocytes; Allosteric regulation; Binding sites; Oxygenation

---

Avaliação: A RBHH publica os resumos e abstracts de teses da área apresentados em entidades que tenham programas de pós-graduação reconhecidos pelo MEC/Capes e considera a obtenção do título suficiente para sua publicação na forma como se propõe a seção.

Recebido: 16/9/2010

Aceito: 24/9/2010