UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Construção e análise de mutantes fluorescentes da troponina I

Deodoro Camargo Silva Gonçalves de Oliveira

Tese de doutorado submetida ao Departamento de Bioquímica do Instituto de
Química da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Castro Reinach

São Paulo

2001

Para a minha irmã Carolina (em memória).

AGRADECIMENTOS

Ao Fernando Reinach pela orientação.

Ao Chuck Farah que me guiou nos primeiros passos.

Ao colega Fernando Fortes (DF) que muito colaborou no meu desenvolvimento científico.

Aos muitos amigos do Instituto de Química que me acompanharam nestes anos.

À Maria Isabel (Bezinha) pela correção ortográfica.

Ao CNPq e a FAPESP pelas bolsas concedidas.

Ao CNPq, a FAPESP e a Howard Hughes Medical Institute pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	2
ÍNDICE	3
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMO	10
SUMMARY	11
INTRODUÇÃO	12
<i>O mecanismo da contração muscular</i>	12
<i>A regulação da contração muscular</i>	15
<i>A organização do complexo troponina</i>	20
<i>Propriedades de ligação do cálcio</i>	21
<i>Proteínas recombinantes e mutação sítio-dirigida</i>	23
<i>As propriedades fluorescentes dos aminoácidos</i>	24
<i>Troponinas I recombinantes contendo 5-hidroxitriptofano</i>	26
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	30
<i>Técnicas básicas de biologia molecular</i>	30
<i>Construção dos mutantes de Tnl usando o fago M13</i>	31
<i>Construção dos mutantes de Tnl por PCR</i>	33

<i>Indução de proteínas recombinantes</i>	35
<i>Indução de proteínas recombinantes contendo 5-hidroxitriptofano</i>	35
<i>Purificação de TnI recombinante</i>	36
<i>Purificação de TnC recombinante</i>	37
<i>Purificação de TnT recombinante</i>	38
<i>Reconstituição do complexo troponina</i>	39
<i>Eletroforese em géis de uréia-poliacrilamida (uréia / PAGE)</i>	39
<i>Experimentos de fluorescência</i>	40
RESULTADOS	42
<i>Novos mutantes de TnI</i>	42
<i>Regiões da TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} na TnC</i>	46
<i>Identificação do domínio da TnC que promove a mudança conformacional percebida pelas sondas na TnI</i>	55
DISCUSSÃO	60
<i>O mecanismo induzido por cálcio</i>	61
<i>O efeito modulador da TnI na afinidade da TnC por Ca^{2+}</i>	64
<i>Hipótese dos sítios de maior afinidade no complexo troponina serem os sítios regulatórios I e II no N-domínio da TnC</i>	66
ANEXO 1	70
<i>Caracterização dos sítios de alta e baixa afinidade no complexo troponina por diálise de fluxo</i>	70
<i>Reconstituição do complexo troponina para diálise de fluxo</i>	71

<i>Diálise de fluxo</i>	72
<i>Resultados das diálises de fluxo</i>	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
CURRICULUM VITAE	86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<u>Figura 1</u> : O sarcômero e a teoria do deslizamento dos filamentos.	13
<u>Figura 2</u> : Modelo da molécula de miosina e esquema do ciclo da ATPase da actomiosina.	14
<u>Figura 3</u> : O filamento fino do músculo esquelético.	17
<u>Figura 4</u> : Estruturas da troponina C.	19
<u>Figura 5</u> : Modelo de uma EF-hand.	22
<u>Figura 6</u> : Fluorescência dos aminoácidos.	25
<u>Figura 7</u> : Modelo esquemático da TnC e TnI.	27
<u>Figura 8</u> : Esquema das mutações por PCR.	34
<u>Figura 9</u> : Complexos troponina reconstituídos.	43
<u>Figura 10</u> : Espectros de excitação.	44
<u>Figura 11</u> : Formação do complexo TnC-TnI em uréia / PAGE.	45
<u>Figura 12</u> : Complexos troponina binários reconstituídos com mutantes fluorescentes de TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} .	46
<u>Figura 13</u> : Complexos troponina ternários reconstituídos com mutantes fluorescentes de TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} .	48
<u>Figura 14</u> : Titulação com cálcio dos complexos troponina fluorescentes.	51
<u>Figura 15</u> : Complexo troponina ternário reconstituído com a TnCF29HW.	52
<u>Figura 16</u> : Titulação com cálcio dos complexos troponina ternários contendo as TnIs fluorescentes e TnCwt, TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A ou TnCD142A.	56

<u>Figura 17</u> : Titulação com cálcio dos complexos troponina binários contendo a TnIF106W e TnCwt, TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A ou TnCD142A.	58
<u>Figura 18</u> : Estrutura modelo da interação regulatória TnC / TnI.	61
<u>Figura 19</u> : Modelo da mudança da estrutura da interação TnC / TnI promovido por Ca^{2+} .	63
<u>Figura 20</u> : Experimentos de diálise de fluxo.	74
 <u>Tabela 1</u> : Variações na intensidade da fluorescência dos complexos troponina reconstituídos com as TnIs mutantes provocadas pela ligação de Ca^{2+} .	 47
<u>Tabela 2</u> : Parâmetros das curvas de emissão de fluorescência das titulações com Ca^{2+} .	54
<u>Tabela 3</u> : Parâmetros das curvas de diálise de fluxo.	73

ABREVIATURAS

ADP - adenosina bifosfato

ATP - adenosina trifosfato

BSA - albumina de soro bovino

cDNA - DNA complementar

CM - carboxi-metil

DEAE - dietilaminoetil

DO - densidade óptica

DTT - ditionitrito

EDTA - ácido etileno-diamino-tetraacético

EGTA - ácido etileno-glicol-bis(β-aminoetil-éter)-n,n',n'-tetraacético

IPTG - isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

kDa - quilodalton

K_d - constante de dissociação

MOPS - ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

n - constante de Hill

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PEG - polietilenoglicol

pCa - -log [Ca²⁺]

Pi - fosfato inorgânico

PCR - reação em cadeia da polimerase

SDS - dodecil sulfato de sódio

TCA - ácido tricloroacético

Tn - complexo troponina

TnC - troponina C

TnI - troponina I

TnT - troponina T

Tris - tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

A troponina (Tn) regula a contração do músculo estriado esquelético de vertebrados. Ela é composta de três subunidades: troponina I (TnI), troponina C (TnC) e troponina T (TnT). A TnI tem a função inibitória que é neutralizada pela ligação de Ca^{2+} nos sítios regulatórios do N-domínio da TnC, e a TnT posiciona o complexo no filamento fino.

Para monitorar o sinal do Ca^{2+} sendo transmitido da TnC para a TnI as propriedades espectrais únicas do 5-hidroxitriptofano (5HW) foram utilizadas. O 5HW foi incorporado em mutantes pontuais de TnI com um único códon para triptofano. Foram identificadas duas sondas espectrais intrínsecas na TnI capazes de detectar a ligação de Ca^{2+} na Tn: as TnIs com 5HW nas posições 100 e 121. Complexos troponina reconstituídos com estes mutantes fluorescentes de TnI, Tn-TnIF100HW e Tn-TnIM121HW, apresentaram respectivamente 12 e 70 % de aumento na intensidade do espectro de emissão devido à ligação de Ca^{2+} na TnC. Nos complexos binários (TnC-TnI) as TnIs com 5HW nas posições 106 e 121 também captam a ligação do Ca^{2+} na TnC.

A análise da fluorescência destas sondas demonstrou que: 1) as regiões da TnI que respondem ao N-domínio regulatório da TnC ocupado com Ca^{2+} são a região inibitória da TnI, resíduos 96 até 116, e a região vizinha que inclui a posição 121 da TnI; 2) mutações pontuais e a incorporação de 5HW na TnI podem afetar tanto a afinidade como a cooperatividade da ligação de Ca^{2+} na TnC, confirmando o papel da TnI em modular a afinidade da TnC por Ca^{2+} ; 3) as constantes de dissociação de Ca^{2+} surpreendentemente altas, $K_d \sim 10^{-8}$ M, calculadas a partir dos sinais das sondas na região inibitória da TnI, sugerem a possibilidade de que os sítios do domínio N-terminal da TnC sejam os sítios de ligação de Ca^{2+} de maior afinidade no complexo troponina.

SUMMARY

Vertebrate striated muscle contraction is regulated by troponin (Tn). Tn is composed of three subunits: troponin I (TnI), troponin C (TnC) and troponin T (TnT). TnI has an inhibitory role that is neutralized by calcium binding to the regulatory sites in the N-domain of TnC, and TnT positions the troponin complex on the thin filament.

In order to follow the Ca^{2+} induced conformational change that is transmitted from TnC to TnI, the unique spectral properties of 5-hydroxytryptophan (5HW) incorporated as point-mutants of TnI were used. It was possible to identify two new TnI intrinsic spectral probes sensitive to Ca^{2+} binding to Tn: TnI with single 5HW at positions 100 and 121. Trimeric troponin complexes reconstituted with two fluorescent mutants of TnI, Tn-TnIF100HW and Tn-TnIM121HW, showed respectively 12 and 70 % increase in the emission spectra when Ca^{2+} bound to TnC. In the binary complexes (TnC-TnI) two TnIs with 5HW at positions 106 and 121 were also sensitive to Ca^{2+} binding to TnC.

Fluorescence analysis of these probes showed: 1) the regions in TnI that respond to Ca^{2+} binding to the regulatory N-domain of TnC are the inhibitory region of TnI (residues 96 to 116), and a neighbor region that includes position 121; 2) point mutations and incorporation of 5HW in TnI can affect both the affinity and the cooperativity of Ca^{2+} binding to TnC, confirming the role of TnI as a modulator of the Ca^{2+} affinity of TnC; 3) the high dissociation constant for sites in the N-terminal domain of TnC ($K_d \sim 10^{-8}$ M), derived from data using probes in the inhibitory region of TnI suggested the possibility that these sites are the high affinity Ca^{2+} binding sites in the troponin complex.

INTRODUÇÃO

Esta tese descreve a construção e análise de mutantes fluorescentes de troponina I (TnI). A TnI é uma das três subunidades polipeptídicas que compõe o complexo troponina. O complexo troponina está envolvido na regulação da contração muscular. Nesta introdução apresentamos uma breve revisão sobre o músculo estriado de vertebrados e sobre as proteínas envolvidas. Também incluímos os fundamentos da estratégia empregada para investigar o papel regulatório da TnI, a mutação sítio-dirigida em proteínas recombinantes e as propriedades fluorescentes dos aminoácidos.

O mecanismo da contração muscular

Existem dois tipos de músculos em vertebrados, lisos e estriados. Os músculos lisos estão sob controle involuntário do sistema nervoso central. Eles estão presentes em órgãos internos e vasos sanguíneos. Os músculos estriados, cardíaco ou esquelético, apresentam uma aparência estriada em microscópio óptico. Os músculos estriados esqueléticos estão sob controle nervoso voluntário, conectados aos ossos e estão envolvidos em postura corporal e movimento (para introdução na área ver Squire, 1981 e Bagshaw, 1993, para revisões recentes ver Squire e Morris, 1998 e Gordon et al, 2000).

A contração do músculo estriado esquelético de vertebrados se deve a interação entre os miofilamentos que estão organizados paralelamente no sarcômero (fig. 1a). A aparência estriada é dada pela repetição de sarcômeros adjacentes na célula muscular, alternando bandas claras (banda I) e escuras (banda A). Os miofilamentos são de dois tipos, o filamento grosso e o filamento fino, ambos são polímeros formados respectivamente de monômeros de miosina e actina. O modelo mais aceito estabelece que a contração ocorre pelo deslizamento entre o filamento fino e o grosso (fig. 1b). O comprimento dos

filamentos de miosina e de actina não se altera quando o músculo contrai ou relaxa, o que varia é a sobreposição entre os filamentos. A sobreposição é maior na contração diminuindo o tamanho do sarcômero. A interação entre a miosina e a actina gera a força que promove a contração muscular às custas de ATP.

Figura 1: O sarcômero e a teoria do deslizamento dos filamentos (adaptado de Squire, 1981). (A) Micrografia eletrônica de uma secção longitudinal de músculo estriado esquelético mostrando um sarcômero, uma representação esquemática pode ser vista abaixo. (B) Modelo do deslizamento dos filamentos. O diagrama mostra que variações na sobreposição entre o filamento fino e o grosso modificam o comprimento do sarcômero.

As moléculas de miosina possuem uma porção globular, a "cabeça", e uma porção filamentosa em α -hélice, a "cauda". Uma molécula de miosina de músculo estriado é composta de duas cadeias pesadas idênticas e dois pares de cadeias leves de dois tipos diferentes, chamadas cadeia leve essencial e regulatória. As caudas de duas cadeias pesadas interagem uma com a outra, formando um bastão de onde saem duas cabeças (fig. 2a). A associação entre as caudas de diversas moléculas de miosina leva à formação do filamento grosso.

Figura 2: Modelo da molécula de miosina e esquema do ciclo da ATPase da actomiosina (adaptado de Squire, 1981). (A) Diagrama esquemático de uma molécula de miosina. A cauda e a cabeça, em azul, fazem parte da cadeia pesada; os dois tipos de cadeias leves são representados como círculos amarelos e vermelhos. (B) Esquema do ciclo da ATPase correlacionando as etapas químicas e mecânicas. Etapa 1: a molécula de miosina liga ATP e rompe a ligação com a actina. Etapa 2: ATP é hidrolisado em ADP + Pi, mas os produtos de hidrólise permanecem ligados. Etapa 3: miosina liga novamente na actina - este é o passo dependente de Ca^{2+} . Etapa 4: a cabeça da miosina sofre uma mudança conformacional que puxa o filamento de actina - ADP e Pi são liberados neste processo. No final desta etapa a miosina e a actina estão fortemente ligadas em um estado conhecido como rigor. Nova ligação de ATP dá início a outro ciclo.

A molécula de miosina pode ser clivada por digestão pela protease papaína. A miosina é dividida em cauda e cabeça. A cabeça da miosina isolada é chamada S1 e retém a habilidade de ligar actina, hidrolisar o ATP e mantém as duas cadeias leves ligadas. O fragmento S1 de músculo esquelético de galinha foi cristalizado (Rayment et al., 1993). O sítio de ligação do ATP está na cabeça da miosina, a miosina é portanto uma ATPase. As cabeças da molécula de miosina se projetam do filamento grosso para interagir com o filamento de actina de uma maneira cíclica. O filamento de actina ativa a ATPase. A energia liberada pela hidrólise do ATP em ADP e fosfato inorgânico é de alguma forma convertida em trabalho e promove a contração. A figura 2b apresenta uma representação esquemática do ciclo mecanoquímico da ATPase da actomiosina.

A actina é uma proteína globular presente em células musculares e não musculares. Todas as células eucarióticas contêm actina em associação com diversas proteínas ligantes de actina, formando o esqueleto celular. Todas as isoformas de actina são bastante conservadas, apresentam propriedades semelhantes e peso molecular ao redor de 42 kDa. A actina monomérica é chamada G-actina e polimeriza formando filamentos de F-actina. A F-actina possui uma estrutura de dupla hélice quando observada em microscópio eletrônico. A estrutura do monômero de actina foi resolvida por cristalografia de raios-X formando um complexo com a DNase I (fig. 3a, Kabsch et al., 1990). Assumindo que a conformação do monômero seria a mesma no filamento de actina Holmes et al. (1990) propuseram um modelo estrutural para o filamento (fig 3b).

A regulação da contração muscular

No músculo estriado esquelético o impulso nervoso resulta na liberação de acetilcolina na sinapse neuromuscular, o que por sua vez provoca a despolarização da membrana plasmática da célula muscular. A despolarização é propagada pela superfície da célula e penetra nos túbulos T, invaginações da

membrana plasmática. Como consequência o Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático é liberado no interior da célula muscular. Isso provoca um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} de 0,1 μM para 10 μM . Em baixa concentração intracelular de Ca^{2+} o músculo está em repouso, o sinal nervoso promove um aumento da concentração de Ca^{2+} e a ativação da contração muscular. Bombas de cálcio na membrana do retículo sarcoplasmático retiram o Ca^{2+} e o músculo relaxa. A importância dos íons Ca^{2+} como mensageiros químicos intracelulares fica evidenciada no músculo (Squire, 1981 e Bagshaw, 1993).

A regulação da contração dos músculos estriados de vertebrados é efetuada por uma proteína associada com a actina no filamento fino, a troponina (Tn) (Ebashi et al., 1969). A Tn funciona como um sensor da concentração intracelular de cálcio (Farah e Reinach, 1995). A Tn regula a interação entre a actina e a miosina. A ligação de cálcio na troponina é transmitida para sete monômeros de actina via tropomiosina (Smillie, 1979). Ou seja, a unidade do sistema regulatório é formada por uma troponina, uma tropomiosina e sete actinas (fig. 3d).

O modelo do bloqueamento estérico propõe que na presença de Ca^{2+} a tropomiosina muda de posição desbloqueando o sítio de interação da actina com a miosina o que conseqüentemente possibilita a contração muscular (Huxley, 1972). Neste modelo a interação entre actina e miosina é fisicamente impedida pela tropomiosina em baixas concentrações de cálcio.

A tropomiosina é um dímero "coiled coil" (fig. 3c). Cada tropomiosina é uma proteína alongada que se conecta com a tropomiosina seguinte, em uma interação conhecida como "cabeça-cauda", e com isso forma uma fita contínua ao longo do filamento de actina (fig. 3d). As suas principais funções parecem ser a de posicionar a Tn e amplificar a informação proveniente de um complexo troponina, permitindo regular sete monômeros de actina.

Figura 3: O filamento fino do músculo esquelético. (A) Diagrama em fita da estrutura do monômero de actina (Kabsch et al., 1990). (B) Diagrama em fita do modelo da estrutura do filamento de actina construído por Holmes et al. (1990). (C) Diagrama em fita da estrutura das duas cadeias em α -hélice da tropomiosina. (D) Modelo do filamento fino mostrando o polímero de actina, a tropomiosina e o complexo troponina (adaptado de Gordon et al., 2000).

A Tn é um complexo composto por três subunidades polipeptídicas: troponina C (TnC), troponina I (TnI) e troponina T (TnT) (Greaser e Gergely, 1971). Ainda não foi resolvida a estrutura de alta resolução do complexo troponina. Estruturas de baixa resolução indicam que a Tn possui uma porção

globular e uma cauda (Ohtsuki, 1974). A região globular seria formada pela TnC, TnI e região C-terminal da TnT (região conhecida como T2, Ohtsuki, 1979, Heeley et al., 1987). A região N-terminal da TnT formaria a cauda (T1). A troponina se posiciona no terço mais C-terminal da molécula de tropomiosina (fig. 3d).

A troponina T é o componente que se liga a actina-tropomiosina e ancora o complexo no filamento fino (Ebashi et al., 1972). A regulação sensível ao cálcio assim como a ativação da ATPase não são verificadas na ausência da TnT (Farah et al., 1994). A região T1 (aminoácidos 1 até 158) interage com a tropomiosina e a região globular T2 (aminoácidos 159 até 258) com a tropomiosina, a TnC e a TnI (Heeley et al., 1987). Malnic et al. (1998) demonstraram que a porção N-terminal da TnT possui as propriedades ativatórias da ATPase da actomiosina. Recentemente Oliveira et al., (2000) demonstraram que um fragmento da região dos resíduos 77 até 191 continha as propriedades ativatórias da TnT.

A troponina C tem os sítios de ligação do Ca^{2+} , o cálcio ligando na TnC remove a inibição promovida pela TnI para a contração do músculo. A estrutura da TnC foi resolvida (Herzberg e James, 1985). A TnC possui dois domínios globulares conectados por uma α -hélice (fig 4a). Cada domínio possui duas EF-hands, um motivo estrutural que é um sítio responsável pela ligação de metais divalentes. As EF-hands da TnC são numeradas de I a IV pela ordem que aparecem na seqüência primária (fig. 7). Os sítios I e II localizados na extremidade amino, N-domínio, ligam Ca^{2+} e tem a função regulatória. Na extremidade carboxi, C-domínio, os sítios III e IV também ligam Ca^{2+} , porém parecem ter uma função principalmente estrutural.

A subunidade capaz de inibir a atividade ATPásica da actomiosina é a troponina I. A TnI esquelética possui aproximadamente 180 aminoácidos e peso molecular de 21 kDa. A TnI é capaz de ligar actina, tropomiosina, TnC e TnT. Syska et al. (1976) identificaram um fragmento obtido pela digestão com brometo cianogênico (resíduos 96 até 116) que é capaz de inibir a atividade

ATPásica da actomiosina. Esta região passou a ser conhecida como região inibitória. Foi demonstrado posteriormente que a região entre os resíduos 104 até 115 era a seqüência mínima capaz de manter a característica inibitória da TnI (Talbot e Hodges, 1981). A TnI forma complexo com a TnC de maneira Ca^{2+} independente, mas o cálcio aumenta a afinidade dessa interação (Head e Perry, 1974). A região N-terminal da TnI se liga estruturalmente com o C-domínio da TnC e com a porção mais C-terminal da TnT, estabilizando o complexo (Hitchcock-DeGregory, 1982, Farah et al., 1994, Malnic et al., 1998).

Figura 4: Estruturas da troponina C. (A) Na esquerda a representação em fita da estrutura cristalina da TnC com 2 Ca^{2+} ligados no C-domínio (Herzberg e James, 1985). Na direita a representação em fita da TnC com 4 Ca^{2+} ligados (Houdusse et al., 1997). O íon Ca^{2+} é representado como uma esfera preta. Cada uma das hélices está identificada. Note o movimento relativo das hélices B e C no N-domínio provocado pela ligação de Ca^{2+} (adaptado de Gordon et al., 2000). (B) Diagrama em fita da estrutura da TnC / TnI₁₋₄₇ (adaptado de Vassilyev et al., 1998). O peptídeo TnI₁₋₄₇ que forma uma única α -hélice ligada no bolso hidrofóbico do C-domínio da TnC está em azul claro. A hélice central está dobrada, em azul, sugerindo que a TnC pode assumir uma conformação mais compacta no complexo troponina.

Apesar da TnC possuir os sítios de ligação do cálcio, ela não interage diretamente com o filamento de actina, portanto, a informação tem que

necessariamente ser transmitida através dos demais componentes do complexo troponina, TnI e TnT. Ou seja, a ligação de cálcio na TnC inicia uma série de eventos moleculares que resultam na contração do músculo esquelético. As mudanças conformacionais provocadas pelo cálcio são transmitidas via TnI e TnT para a actina-tropomiosina.

A organização do complexo troponina

Até agora apenas estruturas de alta resolução da TnC isolada são conhecidas (fig 4, Herzberg e James, 1985, Gagné et al., 1995, Houdusse et al., 1997). Como as estruturas dos complexos binários (TnC-TnI) e ternários (TnC-TnI-TnT) não foram resolvidas, ainda não sabemos precisamente como essas proteínas interagem. E principalmente como o sinal da ligação do Ca^{2+} na TnC é transmitido via TnI e TnT possibilitando a regulação da ATPase da actomiosina.

Uma série de investigações bioquímicas tem procurado desvendar as interações entre as subunidades do complexo troponina e deste com a tropomiosina e a actina. Como resultado, dois tipos de interação têm sido propostos: as estruturais ou Ca^{2+} insensíveis, e as regulatórias ou Ca^{2+} sensíveis. Acredita-se que parte das interações seriam apenas estruturais, e ocorrem para manter a integridade e a organização do complexo troponina e do filamento fino. Este tipo de interação seria Ca^{2+} independente. O outro tipo corresponde às interações que são formadas ou rompidas em resposta às variações na concentração do cálcio, ou Ca^{2+} dependentes. São estas transições conformacionais sofridas pelo complexo troponina que possibilitam a regulação da contração muscular.

Utilizando mutantes de deleção Farah et al., 1994 demonstraram que a associação entre as cadeias polipeptídicas da TnI e da TnC é antiparalela. As interações estruturais envolvem a ligação do domínio C-terminal da TnC com a região N-terminal da TnI (Farah et al., 1994); a ligação da região N-terminal da TnI, resíduos 40 a 96, com a região C-terminal da TnT (Hitchcock-De Gregori,

1982); e a ancoragem do complexo troponina no filamento fino dada pela porção N-terminal da TnT (fragmento tríptico conhecido como T1 que tem grande afinidade por actina-tropomiosina - Ohtsuki, 1979). Vassilyev et al. (1998) obtiveram a estrutura da TnC ligada a um fragmento N-terminal de TnI, TnI₁₋₄₇, demonstrando a interação estrutural TnC / TnI (fig. 4b). Nesta estrutura a TnC tem uma dobra na hélice central o que possibilitaria a interação entre os domínios da TnC.

A ligação de Ca^{2+} no N-domínio dispara os rearranjos conformacionais Ca^{2+} dependentes. O N-domínio com Ca^{2+} ligado tem uma conformação aberta que expõe uma área hidrofóbica que é supostamente um sítio de ligação com a TnI (fig. 4a). A abertura do N-domínio foi inicialmente proposta como um modelo por Herzberg et al., (1986). Posteriormente estruturas da TnC com Ca^{2+} ligado no N-domínio confirmaram a hipótese (Gagné et al., 1995, Houdusse et al., 1997). Ainda não está claro qual região da TnI está diretamente envolvida na interação com o domínio regulatório da TnC. Mas é evidente que com a ligação de cálcio a região inibitória da TnI se afasta da actina, possibilitando que a actina e a miosina interajam produzindo a força muscular (Syska et al., 1976). Este sinal é espalhado para sete monômeros de actina através do deslocamento da tropomiosina da posição "off" para a posição "on" possibilitando a interação da cabeça da miosina com a actina.

Propriedades de ligação do cálcio

As propriedades de ligação de Ca^{2+} da TnC isolada são bem conhecidas (Potter e Gergely, 1975, Leavis et al., 1978). Os sítios do C-domínio ligam Ca^{2+} com maior afinidade, constante de dissociação (Kd) $\sim 10^{-7}$ M. Os sítios regulatórios do N-domínio ligam Ca^{2+} com menor afinidade, Kd $\sim 10^{-5}$ M. Os sítios C-terminais também ligam magnésio em concentrações fisiológicas. Por isso considera-se que estejam sempre ocupados por Mg^{2+} no músculo. Nos complexos binários e ternários duas classes de sítios foram caracterizadas pelos

seus Kds, $\sim 10^{-8}$ M e $\sim 10^{-6}$ M (Potter e Gergely, 1975). Porém até agora não existem dados que permitam associar inequivocamente cada uma destas classes de sítio a um domínio estrutural da TnC. Claramente a TnI influencia a afinidade da TnC por Ca^{2+} . A maneira como isto ocorre é um fenômeno pouco compreendido.

No N-domínio da TnC existem cinco hélices, N, A, B, C e D. No C-domínio existem mais quatro hélices, E, F, G, H. Cada um dos quatro sítios de ligação do Ca^{2+} é formado por um par destas hélices separadas por uma alça com doze resíduos. Por exemplo, o sítio I é formado pela hélice A - alça - hélice B (fig. 4, fig. 5 e fig. 6).

Figura 5: Modelo de uma EF-hand (adaptado de Kendrick-Jones et al., 1991). A cadeia principal da proteína é representada por uma fita. Apenas as cadeias laterais dos resíduos envolvidos na coordenação do íon estão representadas. As seis posições de coordenação da alça de doze resíduos estão indicadas.

O motivo estrutural EF-hand está envolvido na coordenação de metais divalentes e é comum em várias proteínas que ligam Ca^{2+} (Moncrief et al., 1990). Eles participam em mudanças conformacionais importantes e possuem grande diversidade de afinidade e especificidade por íons divalentes. Cada EF-hand possui uma estrutura secundária característica em forma de hélice-alça-hélice (fig. 5). A primeira posição (posição X) de coordenação do Ca^{2+} é sempre um aspartato (Asp). Tem sido demonstrado que a substituição do Asp por alanina (Ala) reduz fortemente a capacidade da ligação do cálcio (Reinach et al., 1986, Farah et al., 1994, Sorenson et al., 1995).

Proteínas recombinantes e mutação sítio-dirigida

Nosso laboratório clonou e padronizou o processo de purificação de todas as proteínas regulatórias: TnC, TnI, TnT e tropomiosina (Quaggio et al., 1993, Farah et al., 1994, Monteiro et al., 1994). O cDNA para todas estas proteínas foram clonados no vetor de expressão pET 3a (Studier et al., 1990).

O sistema pET emprega a cepa de Escherichia coli BL21 (DE3) pLys S ou pLys E. A BL21 é uma linhagem deficiente nas proteases lon e ompT o que facilita o processo de purificação da proteína recombinante. O cDNA da proteína está clonado em pET sob controle de um promotor específico para T7 RNA polimerase (RNA polimerase do fago T7) - um promotor forte e que não ocorre em Escherichia coli. A T7 RNA polimerase é fornecida pelo fago lambda DE3. O gene para T7 RNA polimerase está clonado neste fago sobre controle do promotor lacUVC. Desta maneira o sistema pET permite que a expressão da proteína seja induzida em bactéria transformada com o vetor desejado pela adição de IPTG. A bactéria transformada com pET pode ser selecionada pela resistência para ampicilina / carbenicilina. Quando o produto do DNA clonado é tóxico mesmo um nível de indução basal pode impedir a manutenção do vetor nas células. A T7 lisozima é um inibidor natural da T7 RNA polimerase. Os plasmídeos pLys S e pLys E possuem o gene da T7 lisozima clonado,

respectivamente sob controle de um promotor mais fraco e mais forte. Estes plasmídeos são mantidos na BL21 (DE3) por seleção para resistência a cloranfenicol e inibem a produção basal, não induzida, da proteína recombinante.

O uso de mutagênese sítio-dirigida tem sido empregado com sucesso no estudo de estrutura e função de proteínas. A proteína recombinante pode ser redesenhada de várias formas: produção de fragmentos da proteína por inserção de códons de iniciação ou terminação (ex. Farah et al., 1994); construção de proteínas quiméricas com a união de partes de duas ou mais proteínas diferentes (ex. da Silva et al., 1992) e substituições pontuais de aminoácidos com base nas propriedades específicas das cadeias laterais (ex. Pearlstone et al., 1992). Uma estratégia muito empregada é a introdução de códons para cisteína (Cys). A Cys é muito reativa e possibilita que moléculas sejam ligadas covalentemente. Resíduos de Cys portanto permitem que se acople alguma sonda extrínseca fluorescente ou capaz de fazer "cross-link" com resíduos próximos por foto-ativação, permitindo assim mapear regiões de interação proteína-proteína (ex. Luo et al., 1999). Mutações para aminoácidos fluorescentes são uma possibilidade muito interessante já que funcionam como uma sonda intrínseca e permitem monitorar o comportamento da proteína.

As propriedades fluorescentes dos aminoácidos

Os aminoácidos com cadeias aromáticas apresentam propriedades fluorescentes, a fenilalanina (Phe), a tirosina (Try) e principalmente o triptofano (Trp) (para introdução a fluorescência ver Lakowicz, 1983).

Fluorescência é um processo de decaimento radiativo no qual a molécula descarta a energia de excitação na forma de um fóton. A absorção da luz leva a molécula para um estado eletronicamente excitado. A molécula excitada perde energia de forma não radiativa por colisão com as moléculas vizinhas (ou seja, calor). Isso ocorre até atingir o nível vibracional mais baixo do estado

eletronicamente excitado. O excesso de energia é então emitido como radiação. Como parte da energia é perdida a emissão de luz ocorre numa frequência mais baixa (comprimento de onda maior do que da absorção).

Figura 6: Fluorescência dos aminoácidos. (A) Comparação entre os espectros de absorção e emissão do triptofano (Trp), em preto, e do 5-hidroxitriptofano (5HW), em azul. (B) Comparação da estrutura molecular do Trp e do 5HW. Nosso sistema de expressão de proteínas recombinantes incorpora 5HW em posições com códons para Trp.

Mudanças no espectro de fluorescência de um aminoácido são causadas por alterações no ambiente em que ele se encontra, assim, podem ser

correlacionadas com modificações na conformação das proteínas. Quando uma proteína sofre uma alteração estrutural, um aminoácido pode ter a área de exposição ao solvente alterada, ou pode ter a interação com outros aminoácidos modificada. Estas mudanças podem ser refletidas no espectro de fluorescência.

Vários estudos utilizam variações nas propriedades de fluorescência do Trp ou da Tyr para monitorar alterações conformacionais na proteína. Um bom exemplo é um mutante de TnC onde a Phe da posição 29 foi mutada para Trp, TnCF29W (Pearlstone et al., 1992). A posição 29 é vizinha ao sítio I do N-domínio da TnC. Este mutante possibilita acompanhar a ligação de Ca^{2+} no domínio regulatório da TnC e o aumento de três vezes na intensidade da fluorescência está correlacionado com as mudanças conformacionais provocadas pela ligação de Ca^{2+} .

A fluorescência de vários Trp se somam e são observadas como um único espectro. Quando uma proteína ou complexo protéico possui diversos Trp a análise se torna complicada. O 5-hidroxitriptofano (5HW), um análogo do Trp pode ser incorporado em proteínas recombinantes com uma cepa de Escherichia coli auxotrófica para Trp (Hogue et al., 1992, Farah e Reinach, 1999). A vantagem do 5HW é que o único 5HW pode ser seletivamente excitado na presença de vários Trp, entre 310 e 320 nm. Como cada proteína recombinante mutante pode ter um único 5HW em uma posição de interesse, isso permite que suas propriedades fluorescentes funcionem como uma sonda sítio específica para rearranjos conformacionais (fig. 6).

Troponinas I recombinantes contendo 5-hidroxitriptofano

Esta tese descreve a construção por mutagênese sítio-dirigida de um grupo de mutantes fluorescentes de TnI. Utilizamos mutantes pontuais de TnI nos quais foi introduzido um códon para Trp. Como descrito acima, as propriedades fluorescentes do 5HW e do Trp possibilitam que estes aminoácidos sejam utilizados como sondas intrínsecas na molécula de proteína (fig. 6).

Figura 7: Modelo esquemático da TnC e TnI. Os sítios de ligação de Ca^{2+} estruturais III e IV estão representados como bolas azuis escuras. Os sítios de ligação do Ca^{2+} regulatórios I e II estão representados como bolas azuis claras. A região inibitória da TnI está destacada em azul escuro. A região modulatória da TnI está destacada em azul claro. Tanto o resíduo de aminoácido original para cada posição mutada, quanto sua posição na TnI estão indicados. Em cada mutante apenas uma única posição foi mutada para Trp representada como uma barra amarela. O Trp natural, substituído por Phe (160) em todos os mutantes duplos, está representado como uma barra cheia. A interação antiparalela da TnI e TnC está ilustrada.

Foi construído um mutante inicial de TnI, TnIW160F (TnI^{Trp-less}), que possui o único Trp da TnI substituído por Phe. Este mutante serviu de molde para a construção de cinco duplos mutantes onde foram introduzidos códons para Trp em posições de interesse: TnIY79W, TnIF100W, TnIF106W, TnIM121W e TnIF177W. Foi possível, então, produzir seis diferentes TnIs recombinantes com um único 5HW incorporado: a TnI selvagem, TnI160HW, e as mutantes, TnIY79HW, TnIF100HW, TnIF106HW, TnIM121HW e TnIF177HW (fig. 7).

Estes mutantes de TnI foram reunidos com TnC e TnT recombinantes para reconstituir complexos troponina binários (TnC-TnI) e ternários (TnC-TnI-TnT). Dois destes mutantes, TnIF106HW e TnIM121HW, apresentaram uma variação na emissão de fluorescência significativa devido à ligação do Ca^{2+} na

TnC, nos complexos binários TnC-TnI. Quando a Tn completa foi reconstituída, TnC-TnI-TnT, os mutantes de TnI, TnIF100HW e TnIM121HW, demonstraram sensibilidade ao mecanismo induzido por Ca^{2+} .

A conclusão é que as regiões da TnI que sofrem mudanças conformacionais disparadas pelo Ca^{2+} são a região inibitória e uma região adjacente que inclui a posição 121 da TnI. Esta última região é provavelmente o sítio de ligação para o bolso hidrofóbico no N-domínio da TnC (Herzberg et al., 1986, Vassilyev et al., 1998). Também foi investigado o papel da TnI em modular a afinidade da TnC por Ca^{2+} . A determinação de uma afinidade por cálcio relacionada com os sítios I e II da TnC surpreendentemente alta, levou à proposição de uma hipótese onde a TnI inverteria a afinidade por Ca^{2+} dos domínios da TnC no complexo troponina. Neste modelo quando a TnC está ligada na TnI o N-domínio conteria os sítios da maior afinidade pelo Ca^{2+} e o C-domínio conteria os sítios de menor afinidade pelo Ca^{2+} .

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Construir mutantes fluorescentes de troponina I sensíveis às interações com os demais componentes do filamento fino.
- Utilizar estes mutantes de troponina I para melhor compreender algumas das interações estruturais e regulatórias da troponina I. Entre elas investigar a transmissão do sinal do Ca^{2+} através do complexo troponina e como a troponina I influencia a afinidade dos domínios C-terminal e N-terminal da troponina C por cálcio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Técnicas básicas de biologia molecular

As técnicas básicas de biologia molecular utilizadas tais como preparação e purificação de plasmídeos ou eletroforese em géis de agarose estão descritas em Sambrook et al. (1989).

As enzimas de restrição, a T4 DNA ligase, a polinucleotídeo quinase e seus respectivos tampões foram adquiridos da New England Biolabs e utilizados como recomendado pelo fabricante.

As reações de PCR foram realizadas com a enzima Platinum Taq DNA Polimerase, Gibco BRL, de acordo com as recomendações do fabricante.

O seqüenciamento de DNA foi feito usando “Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit” e de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante (Amershan Life Science). Parte do seqüenciamento de DNA utilizou o kit para seqüenciador automático "DNA sequencing kit: BigDyetm terminator cycle sequencing ready reaction", Applied Biosystems, como recomendado.

As bactérias foram transformadas de acordo com o método de alta eficiência de Hanahan (1985). As características das cepas de Escherichia coli utilizadas podem ser encontradas em Sambrook et al. (1989).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS / PAGE, foi feita de acordo com Laemmli (1970).

A concentração das proteínas foi determinada com a técnica descrita por Hartree (1972) usando como padrão 1 mg / mL BSA.

Construção dos mutantes de Tnl usando o fago M13

O mutante TnlW160F (TnlTrp-less) foi construído através da substituição do único códon para Trp no cDNA de músculo esquelético rápido de galinha (clone M13R-75, Quaggio et al., 1993) por Phe, criando o fago M13-TnlW160F. Dois duplos mutantes foram construídos usando o fago M13-TnlW160F como molde. Eles tiveram os códons para Phe-106, TnlF106W, ou a Phe-177, TnlF177W, mutados para Trp (fig. 7).

As mutagêneses sítio-dirigidas mediadas por oligonucleotídeo foram realizadas pelo método descrito por Carter et al. (1985) com as modificações sugeridas por Kunkel et al. (1987). Como se segue:

Uma placa isolada do fago M13 contendo o cDNA da Tnl foi crescido na cepa de Escherichia coli CJ236 em 50 mL meio 2xTY com 200 µg / mL cloranfenicol succinato acrescido de 25 µg / mL uridina por 6 horas. A cultura foi centrifugada 1.800 xg, 4 °C, por 30 min. O fago simples fita contendo o DNA uridinilado foi transferido, 30 mL de sobrenadante, para um tubo de centrifuga (para o ciclo de vida do bacteriófago M13 ver Sambrook et al, 1989).

2xTY: 16 g / L triptona; 10 g / L extrato de levedura; 5 g / L NaCl; pH 7,4.

Para isolar o DNA do capsídeo protéico do vírus M13 foi adicionado 7,5 mL de NaCl / PEG 15 % (1 / 4 do volume) ao sobrenadante. A solução foi agitada levemente e deixada 1 hora no gelo. Depois, foi centrifugada 1.800 xg, 4 °C, por 20 min. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 4 mL de TE e transferido para tubo de vidro. O precipitado foi lavado com mais 2 mL de TE. O volume reunido foi agitado vigorosamente por 30 seg; deixado no gelo por 1 hora e novamente agitado vigorosamente por mais 30 seg. A solução foi centrifugada 1.800 xg, 4 °C, por 20 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de polipropileno. Para purificar o DNA, os contaminantes foram extraídos duas vezes com igual volume de fenol equilibrado, e uma vez com igual volume de clorofórmio. A fase aquosa foi

transferida para novo tubo onde se acrescentou 1 / 10 volume de 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto a 0 °C para precipitar o DNA. A mistura foi deixada no gelo por 30 min. O DNA foi recuperado por centrifugação 1.800 xg, 4 °C, por 20 min. Cuidadosamente o sobrenadante foi removido. O DNA foi lavado com 10 mL de etanol 70 % a temperatura ambiente e centrifugado 1.800 xg, 4 °C, por 20 min. O tubo foi seco e o DNA foi ressuspensionado em 200 µL de TE.

NaCl / PEG 15 %: 15 % (p / v) PEG; 2,5 M NaCl.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA.

A reação de mutagênese consistiu em reunir o oligonucleotídeo mutagênico fosforilado pela polinucleotídeo quinase com o DNA do bacteriófago M13 simples fita uridinilado: 5 µL de DNA M13 simples fita uridinilado (0,5 pmol ou 1 µg), 2 µL de oligonucleotídeo mutagênico fosforilado (10 pmol), 1 µL 10 x PE₁, 2 µL de H₂O. A mistura foi aquecida por 5 min 20 °C acima da T_M, e depois foi deixada esfriar até a temperatura ambiente para o oligonucleotídeo anelar na posição desejada. A seguir foi adicionada a solução de extensão / ligação: 10 µL de 10 x PE₃ gelado. A mistura de extensão / ligação foi incubada por 5 min no gelo, 5 min na temperatura ambiente, 2 horas à 37 °C. O produto foi utilizado para transformar a cepa de Escherichia coli JM101. O seqüenciamento parcial das placas de vírus isoladas permitiu selecionar os clones mutantes. O inserto de TnI pode ser liberado da forma replicativa do M13 (DNA dupla fita) pela digestão com Nde I / Bam HI. O inserto contendo o cDNA da TnI mutado foi subclonado em pET 3a (Studier et al., 1990) digerido com as mesmas enzimas e foram obtidos assim os vetores de expressão.

PE₁: 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 500 mM NaCl; 10 mM DTT.

PE₂: 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM MgCl₂.

PE₃: 1 µl 10x PE₂, 1 µL 10 mM rATP, 2 µL 5 mM dNTPs, 1 µL 100 mM DTT, 2 µL H₂O, 2 µL seqüenase diluída 1:8 em “Enzyme Dilution Buffer”, 1 µL T4 DNA ligase.

Os primers mutagênicos foram:

W160F	5'-TGGGTGACT <u>TT</u> CAGGAAGAACA-3'
F106W	5'-GGGCAAGT <u>GGA</u> AGAGGCCA-3'
F177W	5'-GAAGAAGATGT <u>G</u> GGAGGCCGG-3'

Os códons modificados estão sublinhados.

Construção dos mutantes de Tnl por PCR

Os duplos mutantes TnIY79W, TnIF100W e TnIM121W foram produzidos por PCR. Eles tiveram respectivamente a Tyr-79, Phe-100 e Met-121 substituídos por Trp (fig. 7a).

A técnica de mutagênese por PCR foi descrita por Higuchi (1990). As mutações foram feitas usando como molde o vetor pET-TnIW160F (TnI^{Trp}-less). Os oligonucleotídeos mutagênicos foram:

Y79W	5'-GGATGAGGAAAGGT <u>TGG</u> GACACAGAG-3'
Y79W (rev)	5'-TCACCTCTGTGTCC <u>CA</u> CCTTTCCTC-3'
F100W	5'-GAGCCAGAAGCTGT <u>G</u> GGACCTGAG-3'
F100W (rev)	5'-GCCCCTCAGGTCC <u>CA</u> CAGCTTCTG-3'
M121W	5'-GTCTGCTGATGCC <u>TGG</u> CTGCGTG-3'
M121W (rev)	5'-CAGGGCACGCAGCC <u>AG</u> GCATCAG-3'

Os códons para Trp estão sublinhados.

T7 promoter e T7 terminator são oligonucleotídeos complementares com a sequência do pET 3a e externos aos sítios de restrição Nde I e Bam HI:

T7 promoter 5'-TACGACTCACTATAGGGAGACCAC-3'

T7 terminator 5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGC-3'

Duas reações iniciais de PCR, uma combinando os oligonucleotídeos T7 promoter e um mutagênico (rev) e outra um mutagênico e o T7 terminator, geram os produtos primários que são complementares na região da mutação (fig. 8). Os produtos são reunidos e amplificados em uma segunda reação de PCR com os primers T7 promoter e T7 terminator produzindo um fragmento de DNA que contém a sequência de TnI mutada. A digestão com Nde I / Bam HI libera o cDNA completo da TnI possibilitando a subclonagem em pET 3a digerido com as mesmas enzimas (Studier et al., 1990). Todas as mutações foram confirmadas através de seqüenciamento do DNA (Sanger et al., 1977).

Figura 8: Esquema das mutações por PCR (Higuchi, 1989). Duas reações de PCR primárias utilizando a combinação dos oligonucleotídeos T7 promoter e mutagênico (rev) ou dos oligonucleotídeos mutagênico e T7 terminator geram os produtos primários que são complementares na região da mutação. Os dois produtos primários foram reunidos em uma nova reação de PCR e amplificados com os oligonucleotídeos externos T7 promoter e T7 terminator gerando um fragmento de DNA como acima, contendo a mutação. A digestão com Nde I / Bam HI libera o cDNA completo da TnI.

Indução de proteínas recombinantes

Todas as proteínas recombinantes (mutantes ou não) possuem o respectivo cDNA clonado em pET-3a (Studier et al., 1990). Elas foram produzidas em larga escala.

A expressão das proteínas foi induzida em Escherichia Coli BL21 (DE3) Plys S. Colônias isoladas da bactéria transformada com o vetor desejado foram selecionadas em placa TYE contendo 200 µg / L carbenicilina e 200 µg / L cloranfenicol succinato. A cultura da placa foi utilizada para inocular 50 mL de 2xTY contendo 200 µg / L carbenicilina e 200 µg / L cloranfenicol succinato e crescida por 3 h, 37 °C. Este pré-inóculo foi utilizado para inocular 4 L do mesmo meio. A cultura foi crescida até DO₆₀₀ ~ 0,8 quando IPTG foi adicionado para 0,4 mM. A cultura foi incubada por mais 3 horas e as bactérias coletadas por centrifugação. A purificação continuou como descrito para TnC, TnI ou TnT recombinante (vide abaixo).

TYE: 10 g / L triptona; 5 g / L extrato de levedura; 8 g / L NaCl; 15 g / L agar.

Indução de proteínas recombinantes contendo 5-hidroxitriptofano

Foi desenvolvida uma linhagem para a incorporação de 5HW em proteínas recombinantes (Quaggio, 1994, Farah e Reinach, 1999), a partir de uma cepa de Escherichia coli auxotrófica para Trp (Drapeau et al., 1968). Esta linhagem, CY (DE3) Plys S, permite a utilização do sistema pET (Studier et al., 1990).

Uma colônia transformada com o vetor desejado foi selecionada em TYE contendo 200 µg / L carbenicilina e 200 µg / L cloranfenicol succinato e foi crescida em 50 mL de meio mínimo acrescido de 50 µg / L L-triptofano, 200 µg / L carbenicilina e 200 µg / L cloranfenicol succinato, 37 °C. Esta cultura

foi usada para inocular 4 L do mesmo meio. Quando a DO_{600} da cultura atingiu 0,8 - 1,0 as bactérias foram recuperadas por centrifugação 3.000 xg, 4 °C, 15 min e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas no mesmo meio sem L-triptofano. A cultura foi posta para crescer novamente e IPTG foi adicionado para 0,4 mM. Após 15 min 100 µg / L L-5-hidroxitriptofano foi adicionado. A cultura de bactéria foi incubada por 3 h e coletada por centrifugação. A purificação continuou como descrito para TnC, TnI ou TnT recombinante (vide abaixo).

meio mínimo: 17 g / L $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$; 3 g / L KH_2PO_4 ; 0,5 g / L NaCl; 1 g / L NH_4Cl ; 0,5 g / L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,05 g / L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 4 g / L glicose; 1 mg / L vitamina B1 (tiamina).

Purificação de TnI recombinante

A TnI recombinante, TnITrp-less, TnIF106W, assim como TnIY79HW, TnIF100HW, TnIF106HW, TnIM121HW, TnI160HW e TnIF177HW foram purificadas como descrito (Quaggio et al. 1993 e Farah et al. 1994).

A cultura de bactéria (4 L, vide acima) foi ressuspensa em 100 mL de Tampão - A. A cultura de bactéria foi lisada com três passagens na "French Press", 16.000 psi. A mistura foi ultracentrifugada, 100.000 xg, 1 hora, 4 °C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensa em 80 mL de Tampão - B e homogeneizado manualmente. A preparação ressuspensa foi aplicada em uma coluna CM Sepharose F. F. equilibrada com Tampão - B. A amostra foi fracionada com um gradiente de 0 até 250 mM NaCl em Tampão - B. As frações contendo a TnI purificada foram reunidas e dialisadas contra o Tampão - C. A TnI pura foi armazenada a -20 °C.

Tampão - A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 14 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - B: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 8 M uréia; 1 mM EDTA; 14 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - C: 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 M KCl; 1 mM EDTA; 0,01 % NaN₃; 14 mM 2-mercaptoetanol.

Purificação de TnC recombinante

O vetor para expressão de TnC recombinante (Quaggio et al., 1993) e a construção dos mutantes TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A e TnCD142A (Farah et al., 1994) já foram descritos. O mutante TnCF29W também foi previamente descrito (Pearlstone et al., 1992).

Os mutantes de TnC foram preparados pelo mesmo método utilizado para TnC recombinante (Fujimori et al., 1990).

A cultura de bactéria (4 L, vide acima) foi ressuspensa em 120 mL de Tampão - A. A cultura de bactéria foi lisada com três passagens na "French Press", 16.000 psi. A mistura foi ultracentrifugada 50.000 xg, 30 min, 4 °C, e o sobrenadante descartado. O volume da solução foi aumentado para 200 mL usando Tampão - A. Na solução foi adicionado TCA para 5 %, em um banho de gelo com agitação constante. A solução foi deixada no gelo por 20 min. A mistura foi centrifugada 5.000 xg, 30 min, 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensa em 200 mL de Tampão - B. O TCA foi removido por diálise contra o Tampão - B. Após a diálise o material insolúvel foi removido por centrifugação 25.000 xg, 30 min 4 °C. Foi adicionada uréia ao sobrenadante para 8 M. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna DEAE Sepharose F. F. equilibrada com Tampão - C. A amostra foi fracionada com um gradiente de 0 até 400 mM NaCl em Tampão - C. As frações contendo TnC foram agrupadas e dialisadas contra Tampão - D. A TnC pura foi armazenada a -20 °C.

Tampão - A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 % Sacarose; 1 mM EDTA.

Tampão - B: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM MgCl₂; 1,4 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - C: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 8 M uréia; 1 mM MgCl₂; 1,4 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - D: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT.

Purificação de TnT recombinante

A preparação da TnT recombinante seguiu o procedimento descrito por Malnic et al. (1998).

A cultura de bactéria (4 L, vide acima) foi ressuspensa em 100 mL de Tampão - A. A cultura de bactéria foi lisada com três passagens na "French Press", 16.000 psi. A mistura foi ultracentrifugada 50.000 xg, 40 min, 4 °C, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna DEAE Sepharose F. F. equilibrada com Tampão - A. A amostra foi fracionada com um gradiente de 0 até 600 mM NaCl em Tampão - A. As frações contendo TnT foram agrupadas e dialisadas contra Tampão - B. O dialisado foi aplicado numa coluna CM Sepharose F. F. equilibrada com Tampão - B. A amostra foi fracionada com um gradiente de 0 até 600 mM NaCl em Tampão - B. As frações contendo a TnT purificada foram reunidas e dialisadas contra o Tampão - C. A TnT pura foi armazenada a -20 °C.

Tampão - A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 6 M uréia; 1 mM EDTA; 1,4 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - B: 50 mM NaAc pH 5,0; 6 M uréia; 1 mM EDTA; 1,4 mM 2-mercaptoetanol.

Tampão - C: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 M KCl; 1 mM EDTA; 0,01 % NaN₃; 1 mM DTT.

Reconstituição do complexo troponina

Os complexos binários (TnC-TnI) e ternários (TnC-TnI-TnT, fig. 9c) foram reconstituídos como descrito em Farah et al. (1994) com algumas modificações. Quantidades equimolares de proteína foram reunidas e dialisadas uma vez contra os seguintes tampões:

a) 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 4,6 M uréia; 1 M KCl; 50 μ M CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

b) 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 M uréia; 1 M KCl; 50 μ M CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

c) 50 mM MOPS pH 7,0; 1 M KCl; 5 μ M CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

E finalmente três vezes contra o tampão de fluorescência:

d) 50 mM MOPS pH 7,0; 100 mM KCl; 1 mM EGTA; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

Após a diálise os complexos troponina foram centrifugados 10.000 xg, 15 min, 4 °C para remover as proteínas precipitadas.

Eletroforese em géis de uréia-poliacrilamida (uréia / PAGE)

A habilidade da TnC em formar complexos estáveis com cada mutante de TnI foi visualizada por uréia / PAGE (ver Farah et al., 1994, Head e Perry, 1974):

gel: 6 M uréia; 8 % poliacrilamida; 25 mM Tris; 80 mM glicina; pH 8,6; na presença de 0,5 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 / 1 mM EGTA ou 0,5 mM CaCl_2 .

O tampão de corrida foi o mesmo do gel, sem uréia e poliacrilamida.

As amostras foram diluídas para uma concentração final de tampão: 6 M uréia; 25 mM Tris; 80 mM glicina; pH 8,6; mais 0,5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ / 1 mM EGTA ou 0,5 mM CaCl₂. A concentração das proteínas na alíquota (20 µL) aplicada no gel era de 5 µM.

Experimentos de fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram realizados em espectrofluorímetro F-4500 Hitachi, em cubeta de quartzo Hellma 101-QS.

As amostras foram diluídas em tampão de fluorescência (50 mM MOPS pH 7,0; 100 mM KCl; 1 mM EGTA; 0,01 % NaN₃; 10 mM 2-mercaptoetanol) para concentração de 2 µM, volume final 1,5 mL. As proteínas equilibraram por 20 min a 25 °C antes do início dos experimentos. Para os espectros de excitação a emissão foi registrada em 340 nm. Para os espectros de emissão a excitação foi a 315 nm para proteínas com 5HW e 295 nm para proteínas com Trp. As fendas de emissão e excitação foram sempre de 5 nm. O branco foi subtraído e os espectros corrigidos para a diluição. Tampões de fluorescência mais 5 mM ou 50 mM CaCl₂ foram usados nos experimentos de titulação. A área total do espectro de emissão entre 325 e 345 nm retirado para cada adição de Ca²⁺ foi usada em cada ponto da curva de titulação.

A concentração de Ca²⁺ livre foi calculada com o programa "Sliders" de Chris Patton (www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html).

Os dados da emissão de fluorescência nas titulações com Ca²⁺ foram ajustados para a equação:

$$\Delta F = (\Delta F_{\max} \times [\text{Ca}^{2+}]^n) / (K_d^n + [\text{Ca}^{2+}]^n)$$

Onde ΔF é a variação na fluorescência; $\Delta F_{\max}$ é a variação máxima da fluorescência; K_d é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e n é o coeficiente de Hill.

Apenas para TnC-TnIF106HW (e TnC-TnIF106W) foi utilizada uma equação que descreve uma curva bifásica:

$$\Delta F = (\Delta F_{\max 1} \times [\text{Ca}^{2+}]^{n_1}) / (K_{d_1}^{n_1} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_1}) + (\Delta F_{\max 2} \times [\text{Ca}^{2+}]^{n_2}) / (K_{d_2}^{n_2} + [\text{Ca}^{2+}]^{n_2})$$

Onde ΔF é a variação na fluorescência; $\Delta F_{\max 1}$ é a variação máxima na fluorescência; K_{d_1} é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e n_1 é o coeficiente para a primeira parte da curva; $\Delta F_{\max 2}$ é a variação máxima na fluorescência; K_{d_2} é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e n_2 é o coeficiente de Hill para a segunda parte da curva.

RESULTADOS

Novos mutantes de Tnl

O objetivo inicial foi identificar mutantes de Tnl que se comportassem como sondas fluorescentes sensíveis às interações com os outros componentes do filamento fino. Pretendeu-se usar as propriedades espectrais únicas do 5HW. Proteínas recombinantes puderam ser produzidas em um sistema que permitiu a incorporação do 5HW em posições que codificam para Trp (Hogue et al., 1992, Farah e Reinach, 1999). O 5HW difere do Trp apenas devido à presença de uma hidroxila na posição 5 do anel indólico (fig. 6b). Um único 5HW pode ser seletivamente excitado entre 310 - 320 nm na presença de diversos Trp. A fluorescência do 5HW depende do ambiente ao redor do resíduo. O intuito era que o 5HW funcionasse como um sonda sítio-específica para rearranjos conformacionais na molécula de Tnl em experimentos de fluorescência.

Cinco mutantes duplos de Tnl foram construídos. A Tnl de músculo esquelético rápido de galinha tem um único Trp na posição 160 (Quaggio et al., 1993). O Trp natural foi substituído por Phe (TnlTrp-less) e este mutante foi utilizado como molde para adicionar códons para Trp em posições que se pretendia investigar. O 5HW foi incorporado em seis posições da Tnl: na tipo-selvagem Tnl160HW e nos mutantes duplos TnlY79HW, TnlF100HW, TnlF106HW, TnlM121HW e TnlF177HW (fig. 7). Os mutantes de Tnl purificados demonstraram que a incorporação do 5HW foi bem sucedida (ver *Materiais e Métodos* e fig. 10).

Todas as Tnls mutantes se comportaram como a Tnlwt nas etapas de purificação (dados não apresentados) e apresentaram a mesma mobilidade em eletroforese em géis de poliacrilamida (fig. 9). A quantidade de Tnl contendo 5HW purificada foi entre 5 a 10 mg / L de cultura. A taxa de incorporação de

5HW para este método foi estimada ser maior do que 90 % (Farah e Reinach, 1999).

A reconstituição dos complexos binários (TnC-TnI) e ternários (TnC-TnI-TnT) foi feita através de sucessivas diálises contra concentrações decrescentes de uréia e KCl (fig. 9). TnI e TnT são bastante insolúveis em baixa concentração de sal quando não estão ligadas na TnC.

Figura 9: Complexos troponina reconstituídos. (A) SDS / PAGE dos complexos binários reconstituídos com as TnIs mutantes e a TnC recombinante. (B) SDS / PAGE dos complexos ternários reconstituídos com as TnIs mutantes e a TnC e a TnT recombinantes.

A TnC de músculo esquelético de galinha não tem Trp (Reinach e Karlsson, 1988), mas a isoforma TnT-3 de músculo esquelético de galinha tem três (Smillie et al., 1988). Na figura 10b os espectros de excitação da Tn e Tn-TnI160HW estão comparados. A fluorescência do único 5HW na TnI160HW pode ser seletivamente monitorada na presença dos três Trp da TnT. Como TnI160HW tem a sequência tipo-selvagem, neste caso específico os dois complexos eram diferentes apenas devido à presença da hidroxila do 5HW (fig. 6b).

Figura 10: Espectros de excitação. (A) Comparação entre o espectro de excitação da TnC-TnI, em preto, e da TnC-TnI160HW, em azul. A TnC não possui Trp. A incorporação do 5HW na TnI160HW fica evidente pelo espectro de excitação característico, compare com a figura 6. (B) Comparação entre o espectro de excitação da Tn, em preto, e da Tn-TnI160HW, em azul. A linha pontilhada mostra que o único 5HW da TnI160HW pode ser seletivamente excitado na presença dos três Trp da TnT.

Em uréia / PAGE apenas as proteínas carregadas negativamente entram no gel. A TnC é carregada negativamente nas condições do ensaio e ela entra no gel, mas a TnI livre não entra. Quando cálcio está presente, a interação entre TnC e TnI é tão forte que a TnC carrega a TnI para dentro do gel (Head e Perry, 1974, Farah et al., 1994). Todos os mutantes de TnI exibiram o mesmo comportamento que a TnIwt (fig. 11). Na ausência de cálcio a TnC entra sozinha no gel (fig. 11a), na presença de 10 mM $MgCl_2$ / 1 mM EGTA também entra sozinha (dado não apresentado). Em 0,5 mM $CaCl_2$ todos os mutantes de TnI foram levados para dentro do gel (fig. 11b), carregados pela TnC saturada de cálcio. Este experimento mostrou que as mutações e a incorporação de 5HW na TnI não afetaram fortemente as interações Ca^{2+} dependentes com a TnC.

Figura 11: Formação do complexo TnC-TnI em uréia / PAGE. A habilidade de cada TnI mutante de ligar TnC foi verificada por uréia / PAGE na presença de (A) 0,5 mM EDTA e (B) 0,5 mM Ca^{2+} . Na ausência da Ca^{2+} apenas a banda da TnC livre aparece no gel. Quando Ca^{2+} está presente existe uma segunda banda correspondente à formação do complexo binário

Figura 12: Complexos troponina binários reconstituídos com mutantes fluorescentes de TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} . TnC-TnIF106HW (A) e TnC-TnIM121HW (B) apresentaram uma variação significativa no espectro de emissão de fluorescência com Ca^{2+} saturante, pCa 4, em azul, em comparação com o estado Apo, em preto. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μM . As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas nos *Materiais e Métodos*.

Regiões da TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} na TnC

No experimento de fluorescência básico foram comparados os espectros de emissão antes e depois da adição de cálcio (pCa 4). Os complexos binários TnC-TnIF106HW, TnC-TnIM121HW (fig. 12) e os complexos ternários

Tn-TnIF100HW e Tn-TnIM121HW (fig. 13) apresentaram variação significativa na emissão de fluorescência no estado Ca^{2+} saturado em comparação com o estado Apo. Todos os outros complexos não foram sensíveis ao Ca^{2+} ligado (as variações na intensidade da fluorescência foram menores que 3 %, tabela 1).

Tabela 1: Variações nas intensidades da fluorescência dos complexos troponina reconstituídos com as TnIs mutantes provocadas pela ligação de Ca^{2+} .

	complexos binários (TnC-TnI)	complexos ternários TnC-TnI-TnT
TnIY79 <u>HW</u>	NV	NV
TnIF100 <u>HW</u>	NV	+ 12 %
TnIF106 <u>HW</u>	- 4 %*	NV
TnIM121 <u>HW</u>	+ 10 %	+ 70 %
TnI160 <u>HW</u>	NV	NV
TnIF177 <u>HW</u>	NV	NV
TnCF29 <u>HW</u>	+ 500 %	+ 450 %

A tabela resume a variação relativa na intensidade da fluorescência para cada um dos mutantes de TnI reconstituindo os complexos troponina. Os valores descrevem a diferença na intensidade do espectro de emissão no estado Ca^{2+} saturado, pCa 4, em comparação com o estado Apo. * Na realidade uma curva bifásica, vide tabela 2 e figura 14. Os valores para TnCF29HW também são apresentados. NV significa que a variação na intensidade da fluorescência foi inferior a 3 %.

Para todos os complexos, o comprimento de onda máximo de emissão foi ao redor de 335 nm e nenhum deslocamento significativo foi observado após a adição de Ca^{2+} .

Figura 13: Complexos troponina ternários reconstituídos com mutantes fluorescentes de TnI sensíveis à ligação de Ca^{2+} . Tn-TnIF100HW (A) e Tn-TnIM121HW (B) apresentaram uma variação significativa no espectro de emissão de fluorescência com Ca^{2+} saturante, pCa 4, em azul, em comparação com o estado Apo, em preto. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μM . As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas nos *Materiais e Métodos*.

A posição 79 está na região N-terminal da TnI e parece ser insensível a modificações alostéricas promovidas por cálcio ao ocupar os sítios na TnC. Ambos os complexos binário e ternário contendo TnIY79HW não apresentaram variação na fluorescência. Esta é uma possível região de interação com a TnT (Hitchcock-De Gregory, 1982), e poderia estar envolvida na transmissão do sinal

de Ca^{2+} para a TnT. Mutantes de deleção da TnI que não têm a região N-terminal inteira demonstraram propriedades regulatórias da ATPase da actomiosina similares a TnI completa (Farah et al., 1994, Tripet et al., 1997, Van Eyk et al., 1997, Ramos, 1999). A região N-terminal da TnI interage com a porção globular C-terminal da TnT de uma forma Ca^{2+} independente para manter a estrutura do complexo troponina (Farah et al., 1994, Malnic et al., 1998).

O complexo Tn-TnIF100HW apresentou um aumento de 12 % no espectro de emissão (fig. 13b). Nos experimentos de titulação com Ca^{2+} ficou evidente que o aumento na fluorescência era causado pelo preenchimento dos sítios de alta afinidade na TnC, $K_d = 3,1 \times 10^{-8}$ M (fig. 14a). Nenhuma cooperatividade foi observada, $n = 1,0$. A TnIF100HW no complexo binário se mostrou praticamente insensível à presença de cálcio. A Phe na posição 100 é parte da região inibitória, resíduos 96 até 116 (Syska et al., 1976), e pode estar interagindo com o C-domínio da TnC (Vassilyev et al., 1998). Uma análise mais detalhada desta região concluiu que a posição 100 não faz parte da seqüência inibitória mínima, resíduos 104 até 114 (Talbot e Hodges, 1981). Mutantes de deleção N-terminais que não possuem esta posição, TnI₁₀₃₋₁₈₂ (Farah et al., 1994) ou TnI₁₀₃₋₁₅₆ (Ramos, 1999), continuaram capazes de regular a ATPase da actomiosina. Isto significa que a Phe-100 não é um aminoácido central no mecanismo regulatório e que o 5HW nesta posição pode funcionar bem como um sonda pouco invasiva para a transmissão do sinal de Ca^{2+} na Tn.

Os dados para o complexo binário TnC-TnIF106HW apresentaram uma pequena e complicada variação na intensidade da emissão de fluorescência. No experimento de titulação com cálcio uma curva de duas fases foi obtida: primeiro houve uma queda na fluorescência (-6 %), $K_{d1} = 4,5 \times 10^{-8}$ M e em seguida houve um aumento (3 %), $K_{d2} = 2,8 \times 10^{-6}$ M (fig. 14b). A posição 106 está no meio da região inibitória (Syska et al., 1976). Não está claro com qual domínio da TnC a região inibitória interage. Tem sido investigado se ela interage com o C-domínio estrutural, com o N-domínio regulatório ou com os dois (Swenson e Fredricksen, 1992, Farah et al., 1994, Chandra et al., 1994a, Pearlstone e

Smillie, 1995). Se a segunda parte da curva for considerada consistente, a TnIF106HW seria uma sonda para ligação de cálcio em ambos os domínios da TnC. A presença da TnT aboliu o sinal de fluorescência.

A maior variação encontrada foi um aumento de 70 % na fluorescência de Tn-TnIM121HW promovida pela adição de cálcio (fig. 13b). TnC-TnIM121HW exibiu um espectro de emissão 10 % mais alto quando Ca^{2+} estava ligado em comparação com o espectro na ausência de Ca^{2+} (fig. 12b). Apesar de ter sido analisado como uma curva de uma fase, este complexo binário apresentou uma queda na curva de titulação em pCa baixos (fig. 14b). Esta queda poderia ser também uma indicação de Ca^{2+} ligando em uma diferente classe de sítios. Novamente a presença de TnT afetou de alguma maneira o fenômeno; ela não alterou significativamente o K_d nem o n , mas aumentou a variação na fluorescência (tabela 2). A alta cooperatividade, $n \sim 2$, significa que os dois sítios ligam Ca^{2+} simultaneamente. A Met na posição 121 da TnI tem sido considerada um resíduo chave no mecanismo regulatório (Tripet et al., 1997, Vassilyev et al., 1998), e foi incluída na região da TnI que tem um papel em modular a afinidade por Ca^{2+} do N-domínio da TnC (Ramos, 1999).

A TnI160HW apresentou pouca sensibilidade a modificações estruturais induzidas por ligação de Ca^{2+} na TnC. Também a posição 177 da TnI não tem sensibilidade ao Ca^{2+} ligando na TnC. Estas posições C-terminais parecem estar envolvidas principalmente em estabilizar a interação da TnI com o filamento de actina-tropomiosina (Ramos, 1999). Além do mais, vários autores têm demonstrado com fragmentos de TnI truncados que apenas a primeira metade da porção C-terminal da molécula de TnI é necessária para a regulação *in vitro* da ATPase (Farah et al., 1994, Tripet et al., 1997, Van Eyk et al., 1997, Ramos, 1999).

Figura 14: Titulação com cálcio dos complexos troponina fluorescentes. (A) Complexos ternários Tn-TnIF100_{HW} e Tn-TnIM121_{HW}; (B) Complexos binários TnC-TnIF106_{HW} e TnC-TnIM121_{HW}; (C) TnCF29_{HW}, TnCF29_{HW}-TnI e Tn-TnCF29_{HW}. Os pontos são a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o respectivo desvio padrão. As linhas são as melhores curvas de ajuste para a equação apresentada em *Materiais e Métodos*. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μ M. As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas nos *Materiais e Métodos*.

Juntos, os dados dos mutantes fluorescentes de TnI apontam que as partes da TnI que respondem a ligação de Ca^{2+} na TnC são a região inibitória mais uma região vizinha que inclui a posição 121 (fig. 7). Sugerimos que a região da TnI do resíduo 117 até o resíduo 127 seja chamada região modulatória. O segmento regulatório da TnI, resíduos 96 até 127, cobriria as regiões inibitória e modulatória (ver *Discussão*).

Figura 15: Complexo troponina ternário reconstituído com a TnCF29HW. A TnCF29HW apresenta um grande aumento no espectro de emissão de fluorescência com Ca^{2+} saturante, pCa 4, em azul, em comparação com o estado Apo, em preto. Aqui apresentamos apenas Tn-TnCF29HW, mas o complexo binário TnCF29HW-TnI e a TnCF29HW sozinha se comportam de maneira semelhante. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μM . As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas em *Materiais e Métodos*.

A TnCF29HW, um mutante de TnC onde a Phe-29 foi mutada para Trp e o 5HW incorporado (Pearlstone et al., 1992, Ramos, 1999), é uma sonda para Ca^{2+} ocupando os sítios do N-domínio. Este mutante foi usado em complexo com TnI e com TnI-TnT para comparação com os dados obtidos para os mutantes fluorescentes de TnI. Em todos os casos ocorreu um grande aumento na fluorescência (próximo de seis vezes) provocado pela ligação de Ca^{2+} nos

sítios regulatórios (fig. 15). A presença de TnI aumentou o K_d uma ordem de magnitude. A TnT praticamente não afetou as propriedades de ligação de cálcio (fig. 14c e Tabela 2, Potter e Gergely, 1975). Titulações com TnCF29HW e TnCF29HW-TnI foram apresentadas anteriormente e os dados estão em boa concordância (Ramos, 1999). As pequenas diferenças nos valores de K_d ocorreram, provavelmente, por causa da força iônica diferente no tampão de fluorescência, 100 mM KCl ao invés dos 6,5 mM KCl usado por ele. Aqui a titulação deste mutante de TnC reconstituindo a troponina inteira, Tn-TnCF29HW, é apresentada pela primeira vez.

A presença da TnT teve um efeito mínimo nos parâmetros de ligação de Ca^{2+} , K_d e n , para os respectivos complexos binários TnC-TnI (Potter e Gergely, 1975). Por outro lado, a TnT alterou a intensidade de emissão de fluorescência para todas as sondas na TnI, como explicado acima. Apesar de TnC-TnI ligar Ca^{2+} da mesma maneira que a troponina inteira, o complexo binário não regula a ATPase da actomiosina na ausência de TnT (Farah et al., 1994, Malnic et al., 1998). Os resultados aqui apresentados mostram que a TnT provoca alterações no ambiente ao redor das regiões da TnI envolvidas no processo regulatório.

A tabela 2 resume os dados de fluorescência obtidos. Os parâmetros para Tn-TnIF100HW estão em concordância com a primeira parte da curva de TnC-TnIF106HW, para ambos K_d e n (fig. 14a e 14b). Posições 100 e 106 fazem parte da região inibitória e responderam ao mesmo evento: Ca^{2+} ligando na classe de sítios de alta afinidade da TnC. A sonda na posição 121 da TnI nos complexos binário e ternário apresentou um K_d que poderia ser consistente com a ocupação dos sítios de ligação ao Ca^{2+} de baixa afinidade da TnC com uma cooperatividade muito alta. Os valores de K_d para os complexos TnCF29HW-TnI e Tn-TnCF29HW são apenas um pouco diferentes dos respectivos complexos com TnIM121HW e poderiam ser considerados compatíveis. Porém, a alta cooperatividade não foi observada nas titulações com TnCF29HW. Conclui-se que há três diferentes grupos de dados: um para as sondas na região inibitória

da TnI, outro para a sonda na posição 121 da TnI e um terceiro para a sonda no N-domínio da TnC.

Tabela 2: Parâmetros das curvas de emissão de fluorescência das titulações com Ca^{2+} .

Complexo	ΔF_{max}	Kd	<i>n</i>
TnC-TnIF106HW *	-6 %	$4,5 \pm 0,3 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1,2 \pm 0,2$
	(+3 %)	$(2,8 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{ M})$	$(1,0 \pm 0,3)$
Tn-TnIF100HW	+ 12 %	$3,1 \pm 0,7 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1,0 \pm 0,1$
TnC-TnIM121HW	+ 10 %	$4,7 \pm 1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$2,0 \pm 0,4$
Tn-TnIM121HW	+ 70 %	$3,3 \pm 0,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,9 \pm 0,1$
TnCF29HW	+ 500 %	$7,6 \pm 1,6 \times 10^{-6} \text{ M}$	$1,0 \pm 0,1$
TnCF29HW-TnI	+ 500 %	$6,4 \pm 0,4 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,1 \pm 0,1$
Tn-TnCF29HW	+ 450 %	$5,8 \pm 0,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,0 \pm 0,1$

Os dados da emissão de fluorescência nas titulações com Ca^{2+} foram ajustados para as equações descritas em *Materiais e Métodos*. ΔF_{max} é a variação máxima da fluorescência; Kd é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e *n* é o coeficiente de Hill. *Para TnC-TnIF106HW: $\Delta F_{\text{max}1}$ é a variação máxima na fluorescência; Kd₁ é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e *n*₁ é o coeficiente para a primeira parte da curva (vide figura 14b) $\Delta F_{\text{max}2}$ é a variação máxima na fluorescência; Kd₂ é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e *n*₂ é o coeficiente de Hill para a segunda parte da curva, entre parênteses. Os valores apresentados são a média e o desvio padrão para três titulações independentes.

Identificação do domínio da TnC que promove a mudança conformacional percebida pelas sondas na TnI.

O modelo regulatório mais aceito sugere que quando o N-domínio é preenchido por cálcio ele expõe uma superfície hidrofóbica. Esta superfície seria um novo sítio de interação com a TnI. A região inibitória da TnI, resíduos 96 até 116, e a região vizinha C-terminal, que inclui a posição 121 e deve estar diretamente envolvida na interação, seriam atraídas em direção à TnC. Como resultado, a região inibitória se desligaria da actina permitindo a contração (Syska et al., 1976, Herzberg et al., 1986, Tripet et al., 1997, Vassilyev et al., 1998). Isto significa que seria esperado que as sondas nas posições 29 da TnC e posições 100, 106 e 121 da TnI respondessem ao mesmo evento: Ca^{2+} ligando nos sítios I e II no N-domínio regulatório da TnC (fig. 7).

Anteriormente foi descrita a construção de quatro mutantes de TnC que tinham cada um dos sítios de ligação de Ca^{2+} alterado por uma substituição de um Asp por uma Ala (Farah et al., 1994, Sorenson et al., 1995): TnCD30A (sítio I), TnCD66A (sítio II), TnCD106A (sítio III), TnCD142A (sítio IV). Com o objetivo de verificar se as variações em K_d e n eram um efeito das mutações ou fenômenos diferentes, foram reconstituídos complexos com estes mutantes de TnC e os mutantes fluorescentes de TnI, TnIF100HW e TnIM121HW.

Ambos os complexos ternários com o sítio IV da TnC destruído, TnCD142A, apresentaram a mesma curva de titulação que os respectivos complexos com TnCwt. De maneira similar, a mutação que bloqueia a ligação de Ca^{2+} no sítio III da TnC, TnCD106A, não teve efeito na curva de titulação da TnIF100HW e apenas uma pequena diminuição na intensidade da variação para TnIM121HW. Nem a afinidade por Ca^{2+} nem a cooperatividade apresentada pela TnC com os quatro sítios funcionais no complexo ternário com estas TnIs fluorescentes foram afetadas pelas mutações nos sítios III e IV da TnC. Conclui-se que as sondas nas posições 100 e 121 da TnI não são sensíveis à ligação de Ca^{2+} nos sítios estruturais III e IV do C-domínio da TnC (fig. 16). A

idéia que o C-domínio da TnC está envolvido principalmente em interações estruturais independentes de Ca^{2+} com a TnI tem bom apoio nestes mutantes de TnC com os sítios III e IV modificados (Farah et al., 1994). Outro artigo mostrou que estes mutantes continuam capazes de regular a contração muscular, mas têm uma ligação mais fraca com a TnI (Sorenson et al., 1995).

Figura 16: Titulação com cálcio dos complexos troponina ternários contendo as TnIs fluorescentes e TnCwt, TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A, TnCD142A. (A) Complexos troponina ternários com TnIF100HW. (B) Complexos troponina ternários com TnIM121HW. Os pontos são a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o respectivo desvio padrão. Ver *Resultados* para a explicação. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μM . As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas em *Materiais e Métodos*.

O papel regulatório dos sítios I e II tem sido confirmado, porque distúrbios na ligação do Ca^{2+} promovidos por mutações no N-domínio afetam a habilidade regulatória da TnC (Sheng et al., 1990, Fujimori et al., 1990, Sorenson et al.,

1995). Em concordância com isto pode ser claramente visto nas figuras 16a e 16b que as curvas de titulação com Ca^{2+} da fluorescência dos complexos Tn foram fortemente perturbadas pela substituição do Asp-66 da TnC por Ala, TnCD66A. Dados recentes do nosso laboratório confirmam que esta mutação diminuiu severamente a afinidade por Ca^{2+} do domínio regulatório da TnC, afetando não apenas o sítio II, mas também o sítio I (Valencia e Reinach comunicação pessoal). Com os dados dos complexos Tn-TnCD66A-TnIF100HW e Tn-TnCD66A-TnIM121HW demonstrou-se que a região inibitória e a região modulatória da TnI são sensíveis ao sinal disparado por Ca^{2+} vindo do N-domínio da TnC.

Interessante notar que a TnC cardíaca não tem o sítio I funcional (Sia et al., 1997), então a TnCD30A pode ser considerada "tipo-cardíaca". Os complexos ternários com essas TnCs tiveram a amplitude da mudança da emissão de fluorescência diminuída, mas as constantes de afinidade não foram afetadas. Para todos os complexos com TnCs com os dois sítios do N-domínio funcionais na presença da TnIM121HW mostraram forte cooperatividade, perto de 2 (tabela 2, fig. 15 e fig. 16b). TnCD30A tem apenas um sítio funcional no domínio regulatório e a cooperatividade seria impossível. De fato, TnCD30A elegantemente derrubou o valor de n para 1 (fig. 16b). Isto implica que a presença de um 5HW na posição 121 da TnI de alguma maneira induziu cooperatividade entre os sítios regulatórios I e II da TnC.

Complexos binários com este grupo de TnCDAs e a TnIF106HW foram formados e submetidos a análises de fluorescência (dados não apresentados). A TnIF106W também foi investigada, o mesmo mutante de TnI com Trp ao invés de 5HW na posição 106, em experimentos similares. Como a TnC não tem Trp (Reinach e Karlsson, 1998), a fluorescência do único Trp da TnIF106W pode ser seletivamente excitado a 295 nm no complexo binário. A TnIF106W se comporta como a TnIF106HW, mas a variação no sinal da fluorescência foi um pouco maior, uma queda de 10 % na primeira parte da curva e de 4 % de aumento na segunda parte (fig. 17). A obstrução dos sítios I e II, principalmente sítio II,

afetaram a primeira parte do sinal de uma maneira similar à discutida acima. Isto implica que o sinal do Ca^{2+} de alta afinidade nestes complexos binários está relacionado com o N-domínio. Em concordância com esta conclusão, a obstrução dos sítios do C-domínio não afetaram a queda da fluorescência. Apesar da segunda parte do sinal ser modificada pelas mutações no C-domínio isto não ocorreu de uma maneira tão clara como para a primeira parte da curva. A variação na intensidade da segunda parte da curva foi muito pequena para não deixar dúvidas.

Figura 17: Titulação com cálcio dos complexos troponina binários contendo a TnIF106W e TnCwt, TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A, TnCD142A. Os pontos são a média de três experimentos independentes e as barras de erro mostram o respectivo desvio padrão. Ver *Resultados* para a explicação. A concentração das proteínas foi sempre de 2 μM . As condições dos experimentos de fluorescência estão descritas em *Materiais e Métodos*.

A conclusão é que os três grupos de dados monitoram a ligação de Ca^{2+} nos sítios I e II do N-domínio da TnC. As diferenças em K_d e n são devidas às mutações. Vários dados têm mostrado que mutações pontuais sítio-dirigidas na TnC podem alterar as propriedades da ligação de Ca^{2+} da TnC (Fujimori et al., 1990, Sheng et al., 1990, Pearlstone et al., 1992). Aqui estão apresentados resultados onde mutações pontuais na TnI alteraram a constante de dissociação

e a cooperatividade da ligação de Ca^{2+} na TnC, o que evidencia ainda mais o papel modulador da TnI na afinidade da TnC por Ca^{2+} . Os resultados com as TnCDAs associaram altos valores de constante de dissociação obtidos com Tn-TnIF100HW e TnC-TnIF106HW com a ligação de cálcio no N-domínio da TnC (tabela 2, fig. 16 e fig. 17). O que abriu uma possibilidade nunca antes considerada, de que de fato a TnI aumenta a afinidade do domínio regulatório da TnC por Ca^{2+} mais de cem vezes. Neste modelo os sítios I e II da TnC seriam os sítios de alta afinidade nos complexos troponina binário e ternário.

DISCUSSÃO

Um dos objetivos mais almejados na pesquisa bioquímica é a capacidade de monitorar rearranjos conformacionais nas proteínas. A troponina é um biosensor da concentração de Ca^{2+} e rearranjos alostéricos complicados são esperados para promover controle na interação geradora de força entre a actina e a miosina. Muitos estudos têm descrito o uso de aminoácidos fluorescentes que ocorrem naturalmente Tyr e Trp, ou proteínas marcadas com sondas extrínsecas fixadas covalentemente para analisar interações com ligantes, interações proteína-proteína e caminhos de enovelamento (Leavis et al., 1978, Rosenfeld e Taylor, 1985, Grebarek et al., 1986, Pearlstone et al., 1992, Swenson e Fredricksen, 1992, Chandra et al., 1994a, Pearlstone e Smillie, 1995, Pearlstone et al., 1997). Entretanto o uso de aminoácidos que ocorrem naturalmente é limitado porque se mais de um está presentes a interpretação dos dados fica difícil. O uso de sondas extrínsecas fixadas covalentemente pode ser prejudicial devido ao tamanho e ao potencial para formar ou romper interações, o que pode levar a alterações estruturais na proteína. A incorporação do 5HW e de outros análogos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente parece ser uma boa alternativa. Eles podem ser utilizados como sondas sítio-específicas, com um dano conformacional esperado menor (Hogue et al., 1992, Farah e Reinach, 1999, Ramos, 1999).

Esta tese demonstra a possibilidade de se construir mutantes fluorescentes de TnI que tiveram seus espectros de emissão afetados por Ca^{2+} ligando na TnC, uma cadeia polipeptídica diferente (fig. 12 e fig. 13). E que se pode utilizar a fluorescência destes mutantes de TnI para investigar o sinal da ligação do Ca^{2+} nos sítios regulatórios da TnC sendo transmitido para a região inibitória da TnI e analisar o efeito modulador da TnI nas propriedades de ligação de Ca^{2+} da TnC.

Figura 18: Estrutura modelo da interação regulatória TnC / TnI (adaptado de Vassylyev et al., 1998). (A) Diagrama em fita da interação TnC / TnI. Os dois domínios da TnC estão na conformação aberta, com Ca^{2+} ligado, o N-domínio em verde e o C-domínio em vermelho. Em azul claro a TnI₁₋₄₇ ligada no N-domínio. Em amarelo a estrutura modelo da região regulatória da TnI (TnI₉₆₋₁₂₇); a porção em azul escuro representa uma quebra na estrutura de α -hélice promovida por duas prolinas (Pro-109, Pro-110). (B) Visão do bolso hidrofóbico da interação regulatória modelo. A Met-121, cadeia lateral em vermelho, da região regulatória da TnI, fita amarela, está em íntima interação com os resíduos hidrofóbicos, cadeias laterais em azul claro, do N-domínio da TnC, fita azul escura (ver também *Discussão*).

O mecanismo induzido por cálcio

Herzberg et al. (1986) propuseram que o N-domínio ocupado com Ca^{2+} adotaria uma conformação similar ao C-domínio ocupado por Ca^{2+} e exporia uma região hidrofóbica que poderia ser um novo sítio de interação com TnI. Este rearranjo na estrutura da TnC iria atrair a TnI que se afastaria da actina-tropomiosina removendo a inibição. Esta transição conformacional foi confirmada pela estrutura resolvida do N-domínio com dois Ca^{2+} ligados (Gagné et al., 1995,

Houdusse et al., 1997). A região precisa da TnI envolvida nesta interação ainda é tentativa. Recentemente Vassilyev et al. (1998) obtiveram a estrutura da porção N-terminal da TnI ligada ao C-domínio estrutural da TnC. Eles usaram uma abordagem semelhante à de Herzberg e colegas para propor um modelo para a interação regulatória entre TnC-TnI (fig. 18). Neste modelo a região inibitória, 96-116, mais um prolongamento até o resíduo 127, chamado de TnI_{reg}, está ligado na superfície hidrofóbica do N-domínio. A Met-121 da TnI seria um resíduo fundamental nesta interação. Portanto Met-121 e os resíduos vizinhos seriam a região diretamente em contato com o bolso hidrofóbico, e não a região inibitória. As mudanças na fluorescência do 5HW na posição 121 da TnI promovidas por Ca²⁺ estão em concordância com esta idéia (fig. 16).

Muitos outros estudos têm apontado que a região da TnI que realmente interage com o bolso hidrofóbico do N-domínio é a região adjacente ao lado carboxi da região inibitória. Aplicando proteólise limitada na Tn, Takeda et al. (1997) demonstraram que a proteção do segmento 116 até 134 (ou 140) ocorre na presença de Ca²⁺ e não ocorre na ausência. A ligação do peptídeo da TnI, TnI₁₁₅₋₁₃₁, na superfície hidrofóbica do N-domínio saturado com Ca²⁺ foi monitorada por espectroscopia multidimensional de NMR (McKay et al., 1997). Um papel modulador na afinidade por Ca²⁺ do N-domínio da TnC foi associado à região entre os resíduos 96 até 129 por Ramos (1999). A interação preferencial dos resíduos 117 até 148 da TnI com o N-domínio da TnC também foi apontada por Pearlstone et al. (1997). Resíduos do N-domínio foram ligados por "photocrosslink" com a Met-121 da TnI (Luo et al., 1999). Tripet et al. (1997) propuseram que este segmento vai do aminoácido 116 até o 131 e chamaram de "segundo sítio de ligação na TnC". Conseqüentemente a região inibitória deve ligar-se em algum outro lugar que não diretamente no bolso hidrofóbico. Ainda não está claro se a região inibitória da TnI interage com o C, o N ou os dois domínios da TnC (Swenson e Fredricksen, 1992, Farah et al., 1994, Chandra et al., 1994a, Pearlstone e Smillie, 1995). Apesar dos dados aqui apresentados não resolverem esta questão, os complexos TnC-TnIF106HW e Tn-TnIF100QHW apresentaram sensibilidade à ligação de Ca²⁺ no domínio

regulatório da TnC (fig. 16 e fig. 17), o que demonstra que a ocupação com cálcio dos sítios no N-domínio promoveu rearranjos conformacionais que foram transmitidos para a região inibitória da TnI.

Figura 19: Modelo da mudança da estrutura da interação TnC / TnI promovido por Ca^{2+} (adaptado de Luo et al., 2000). (A) Na presença de Ca^{2+} os resíduos ao redor da posição 121 estão interagindo com o bolso do N-domínio. (B) Na ausência de Ca^{2+} os resíduos ao redor da posição 121 deixam de ocupar o bolso do N-domínio e conjuntamente a região 89-104 se afasta da TnC para interagir com a actina.

Um mapa das interações da TnI pode ser desenhado. A região N-terminal da TnI, posição 1 até 96, parece ter principalmente uma função estrutural de manter a organização da Tn (Farah et al., 1994, Malnic et al., 1998). A primeira metade, resíduos 1 até 47, se ligaria com o C-domínio (Vassilyev et al., 1998). A parte seguinte, aminoácidos 48 até 95, se ligaria à região C-terminal da TnT (Hitchcock-De Gregory, 1982). O meio da molécula da TnI, uma região que vai da posição 96 até 131, retém a maior parte da função regulatória. Os dados mostraram que ela responde ao sinal regulatório do Ca^{2+} . De acordo com estes dados sugerimos que ela deva ser chamada de "região regulatória". A região inibitória, aminoácidos 96 até 116, tem sido conhecida há bastante tempo e é

bem caracterizada (Syska et al., 1976). As posições seguintes na sequência primária até aproximadamente o resíduo 131 é provavelmente a região da TnI que é atraída para a TnC em resposta ao mecanismo regulatório promovido por Ca^{2+} (ver acima). Esta parte da molécula de TnI modula a afinidade da TnI por actina ou TnC e também parece modular a afinidade do domínio regulatório por Ca^{2+} (Ramos, 1999). Então sugerimos que ela passe a ser conhecida como "região modulatória". A função da parte C-terminal da TnI é menos compreendida. Um mapeamento das interações da TnI com as outras proteínas do filamento fino obtido por estudos de "photocrosslink", realizado por Luo et al. (2000), está em boa conformidade com este esquema (fig. 19).

O efeito modulador da TnI na afinidade da TnC por Ca^{2+}

Desde os experimentos originais da ligação de Ca^{2+} feitos por Potter e Gergely (1975) ficou claro que a TnI modula a afinidade da TnC por Ca^{2+} , enquanto a TnT não provocava um efeito maior. Tem sido considerado que a TnI aumenta a afinidade dos dois domínios uma ordem de magnitude - K_d para os dois sítios de alta afinidade de $\sim 10^{-7}$ M para $\sim 10^{-8}$ M e K_d para os dois sítios de baixa afinidade de $\sim 10^{-5}$ M para $\sim 10^{-6}$ M. Os sítios de alta afinidade por Ca^{2+} também ligariam Mg^{2+} , enquanto os sítios de baixa afinidade seriam específicos para o Ca^{2+} . No mesmo artigo foi concluído que os dois sítios de baixa afinidade seriam responsáveis pela regulação da ATPase da actina-miosina. Não havia a identificação de quais seriam os dois sítios de alta e os dois sítios de baixa afinidade, nem para TnC sozinha, nem para o complexo troponina. Naquela época a estrutura da TnC e a relativa independência do N e do C-domínios eram desconhecidas. Quando Leavis et al., 1978 usando fragmentos proteolíticos de TnC identificaram os sítios de alta afinidade, III e IV, e por exclusão os sítios de baixa afinidade, I e II, para TnC livre, foi assumido que também era o caso para TnC-TnI e TnC-TnI-TnT. Muitos dados têm dado suporte à conclusão para TnC isolada (Fujimori et al., 1990, Pearlstone et al., 1992, Chandra et al., 1994a, Fredricksen e Swenson, 1996, Pearlstone et al., 1997, Mercier et al., 2000). Não

conhecemos nenhum dado que ligue diretamente a afinidade com um domínio específico da TnC para proteína inteiras nos complexos binários e ternários, além dos dados com TnCF29HW formando estes complexos (esta tese e Ramos 1999). Dados de sondas extrínsecas fixadas geralmente na Cys-98 da TnC são sensíveis ao Ca^{2+} ligando nas duas classes de sítios. Apesar dos autores normalmente interpretarem que os sítios de alta afinidade estão no C-domínio e que os sítios de baixa afinidade no N-domínio da TnC uma associação sem dúvidas não poderia ser feita (Rosenfeld e Taylor, 1985. Grebarek et al., 1986 e referências citadas). A investigação mais compreensiva que vincula a afinidade por cálcio para cada um dos sítios de ligação na TnC nos complexo troponina foi apresentada aqui.

A Tn-TnCF29HW e a TnCF29HW-TnI apresentaram um aumento de uma ordem de magnitude na afinidade por cálcio dos sítios regulatórios em comparação com a TnCF29HW sozinha (tabela 2 e fig. 14c, Ramos, 1999). O que está em muito boa concordância com a literatura (ver acima). O grande aumento na emissão de fluorescência, ao redor de cinco vezes, nos convida a acreditar nisto. Isto implicaria que as mutações na região inibitória da TnI, substituição das Phe-100 e Phe 106 por 5HW, causaram um aumento extra na afinidade dos sítios I e II por Ca^{2+} , ou alguma outra justificativa mais intrincada. Os experimentos com as TnCDA's claramente assinalam que estes mutantes de TnI são sondas para o Ca^{2+} ligando no N-domínio da TnC (fig. 16). Uma explicação alternativa consideraria que os valores de K_d , $\sim 3 \times 10^{-8}$ M, obtidos com as sondas na região inibitória da TnI estão de fato corretos. Nunca valores de afinidade por Ca^{2+} tão altos tinham sido relacionados com os sítios I e II da TnC. O valor de K_d por ele mesmo poder não dar uma informação segura já que ele pode variar dependendo das condições experimentais. A comparação da afinidade por Ca^{2+} do N-domínio na TnC sozinha, TnCF29HW, e no complexo troponina, Tn-TnIF100HW, obtidos em condições experimentais idênticas, dá um aumento de aproximadamente 250 vezes da constante de dissociação (tabela 2 e fig. 14). Para assumir esta proposta é preciso argumentar que a incorporação

do 5HW na posição 29 da TnC e na posição 121 da TnI reduziram a afinidade dos sítios regulatórios por Ca^{2+} .

Hipótese dos sítios de maior afinidade no complexo troponina serem os sítios regulatórios I e II no N-domínio da TnC

Existe um bom suporte inicial pelo modelo estrutural proposto por Vassilyev et al. (1998). Eles modelaram a região ao redor da Met-121 da TnI em íntima interação com a superfície hidrofóbica do N-domínio da TnC. Phe-29 da TnC é parte desta superfície hidrofóbica. Esta seria a interação regulatória entre TnC e TnI (fig. 18). Se este modelo estiver correto não seria surpreendente que a substituição dos dois Met-121 da TnI ou a Phe-29 da TnC por 5HW poderia potencialmente afetar a interação TnC-TnI dependente de Ca^{2+} , diminuindo o efeito modulador da TnI na afinidade por Ca^{2+} do N-domínio regulatório da TnC. Tripet et al. (1997) descreveram que alterações na Met-121 ou na região ao redor reduziram a interação Ca^{2+} dependente com a TnC. Ramos (1999) indicou a importância dos resíduos 117 até 129 no aumento da afinidade por Ca^{2+} dos sítios do N-domínio, e pode-se esperar que alterações nesta região devam afetar o efeito modulador total. Apesar dos dados regulatórios para TnCF29H₂W não estarem disponíveis, sua contraparte TnCF29W é um dos mutantes de TnC mais estudados. TnCF29W é ainda capaz de regular a ATPase da actomiosina, porém não retém toda a propriedade reguladora (Chandra et al., 1994b). Uma análise comparativa entre a TnC e a TnCF29W mostrou que o Trp na posição 29 desestabiliza o N-domínio (Yu et al., 1999), portanto um efeito comparável pode ser predito para TnCF29H₂W. Valencia e Reinach, comunicação pessoal, compararam as propriedades de ligação de Ca^{2+} da TnCF29W e da TnCF29H₂W livres em solução. Eles demonstram que TnCF29W tem afinidade por Ca^{2+} mais alta que TnCF29H₂W, oito vezes mais, diretamente relacionado com os sítios do N-domínio. O que implica que 5HW ou Trp na posição 29 da TnC tem efeitos diferentes na capacidade de ligação Ca^{2+} .

Esta proposta implica que os sítios III e IV no C-domínio da TnC teriam menor afinidade por Ca^{2+} que os sítios I e II quando no complexo troponina. E também implica que o efeito da TnI nos sítios estruturais seria de reduzir a afinidade por Ca^{2+} , ou pelo menos não aumentar. Contra nossa hipótese estão dados de titulação com Ca^{2+} de mutantes de TnC com um único Trp no C-domínio, TnCF105W e TnCF154W (Chandra et al., 1994a, Pearlstone e Smillie, 1995). Estas duas proteínas apresentaram aumento, apesar de menor que dez vezes, na afinidade por Ca^{2+} quando na presença de um excesso molar do peptídeo inibitório. Swenson e Fredricksen (1992) reportaram resultados semelhantes. É importante notar que peptídeos com a seqüência inibitória podem ligar no C-domínio, mas esta deve ser uma interação não fisiológica. A principal região de ligação da TnI com este domínio deve ser a região dos primeiros 40 aminoácidos, TnI₁₋₄₀ (Mercier et al., 2000 e *Discussão* acima).

Quando livre em solução o C-domínio da TnC está desordenado enquanto o N-domínio está enovelado (Mercier et al., 2000). Então parece que para a TnC isolada o enovelamento do C-domínio só é conseguido com a ajuda de um metal divalente, e por isso a forma com Ca^{2+} ligado seria energeticamente favorável. Quando o complexo está montado o C-domínio está estruturalmente interagindo com a região N-terminal da TnI (Vassilyev et al., 1998). Nesta condição ele não está mais desordenado, e a superfície hidrofóbica também não está exposta. Pode não haver razão para a afinidade por Ca^{2+} aumentar, nesta situação a necessidade por um metal ligado pode até diminuir. Portanto pode ser razoável que o requerimento por Ca^{2+} ligado no C-domínio não aumente quando a TnI está presente. O N-domínio já está estruturado sozinho em solução, portanto ele não apresenta o mesmo requerimento por metal que o C-domínio na forma livre da TnC. A ligação de Ca^{2+} iria causar a abertura da superfície hidrofóbica, o que é energeticamente adverso na ausência da TnI. Quando o complexo troponina está montado na presença de Ca^{2+} o equilíbrio entre as formas aberta e fechada do N-domínio seria altamente favorável à forma aberta. Prevalecendo a forte interação TnC-TnI dependente de Ca^{2+} . Uma análise da

relação entre a afinidade por Ca^{2+} e estabilidade conformacional dos domínios da TnC foi feita por Fredricksen e Swenson (1996).

Como são eventos energeticamente acoplados, a TnI deve aumentar a afinidade da TnC por Ca^{2+} na mesma potência que o Ca^{2+} aumenta a afinidade da TnC por TnI. Isto pode ser uma importante questão regulatória, quando o Ca^{2+} ocupa o domínio regulatório da TnC a afinidade pela região modulatória da TnI aumenta, não apenas dez, mas mais de cem vezes. O que deve ser necessário para desfazer a interação TnI-actina. Nos experimentos de ATPase as condições do ensaio são diferentes comparadas com os nossos experimentos de fluorescência. A região inibitória da TnI está ligada na actina. Como a actina desfaz a interação regulatória TnC-TnI é provável que reduza a constante de dissociação aparente do domínio regulatório da TnC. Então o estado fechado, Ca^{2+} não ligado ($K_d \sim 10^{-5}$ M) e o estado aberto, Ca^{2+} ligado ($K_d \sim 10^{-8}$ M), do domínio regulatório da TnC deveriam ser vistos em experimentos de titulação com Ca^{2+} do filamento fino (Farah e Reinach, 1999) ou em experimentos de ATPase (Farah et al., 1994, Van Eyk et al., 1997) com uma constante de dissociação aparente entre 10^{-6} M e 10^{-7} M, o que de fato ocorre.

Neste trabalho não foram investigadas as propriedades de ligação de Mg^{2+} do complexo troponina. A possibilidade dos sítios I e II da TnC serem os sítios de alta afinidade teria que levar em consideração que eles também ligam magnésio (Potter e Gergelly, 1975). Normalmente existem quantidades milimolares de Mg^{2+} em experimentos de ATPase e isso também pode contribuir para a diminuição do ponto médio de transição do Ca^{2+} neste tipo de experimento. Um debate bem quente apareceu recentemente na literatura em razão da crença de que o Mg^{2+} está sempre ligado nos sítios estruturais do C-domínio da TnC na Tn no sarcômero (Finley et al., 2000, Harada et al., 2001). Parece que as propriedades de ligação de metais na troponina completa livre ou no filamento fino precisam de suporte experimental suplementar.

Acima foi apresentada uma hipótese baseada na possibilidade de que os sítios regulatórios I e II da TnC são os sítios de maior afinidade por Ca^{2+} no

complexo troponina. Apesar de nós não resistirmos a propor isto, estamos convencidos de que apenas dados experimentais muito bem planejados usando a troponina completa e uma assinatura direta para cada sítio de ligação de Ca^{2+} irá resolver a questão. Nossos dados mostraram que pequenas modificações na TnI como mutações pontuais e uma sonda pouco invasiva podem afetar a afinidade e a cooperatividade dos sítios de ligação de Ca^{2+} da TnC. Portanto é necessário cuidado ao considerar dados que venham de peptídeos, fragmentos proteolíticos, mutantes de deleção e de sondas extrínsecas fixadas. Além do mais deve-se ter consciência de que assim como as propriedades da TnC livre não são iguais as da TnC no complexo troponina, do mesmo jeito, conclusões tiradas da troponina sozinha podem não representar as condições no filamento fino onde a troponina é, provavelmente, fortemente afetada pela interação com actina-tropomiosina.

ANEXO 1

Caracterização dos sítios de alta e baixa afinidade no complexo troponina por diálise de fluxo

Os experimentos realizados utilizando-se os complexos com as TnIs fluorescentes e com os mutantes de TnC, com cada um dos sítios de ligação de cálcio destruídos, TnCD30A, TnCD66A, TnCD106A e TnCD142A (Farah et al., 1994 e Sorenson et al., 1995) indicaram que as mutações no N-domínio da TnC afetavam a curva relacionada com sítios de alta afinidade (ver *Resultados e Discussão*). Estes dados são surpreendentes, pois contrariam a literatura. Na TnC isolada está bem caracterizado que os sítios de alta e baixa afinidade estão localizados respectivamente nos domínios C e N-terminais. Sabia-se que a TnI influenciava a afinidade da TnC por Ca^{2+} . Porém o que se pensava era que a TnI aumentava a afinidade de ambos os domínios por Ca^{2+} uma ordem de magnitude - constante de dissociação dos sítios C-terminais $\sim 10^{-7}$ M para $\sim 10^{-8}$ M e constante de dissociação dos sítios N-terminais $\sim 10^{-5}$ M para $\sim 10^{-6}$ M (Potter e Gergely, 1975 e Leavis et al., 1978). Nossos dados indicam que a TnI na verdade inverteria a afinidade dos sítios.

Em nosso laboratório o mutante TnCF29HW isolado foi caracterizado com uma combinação das técnicas de diálise de fluxo (Womack e Colowick, 1973) e fluorescência (Valencia e Reinach, comunicação pessoal). A diálise de fluxo é um ensaio direto de ligação de Ca^{2+} na TnC, enquanto a fluorescência é um ensaio indireto que permite a análise de mudanças conformacionais em regiões específicas na proteína. O mutante TnCF29HW é uma excelente sonda de ligação de Ca^{2+} nos sítios N-terminais da TnC - ele apresenta um aumento ao redor de seis vezes na fluorescência devido à ligação de Ca^{2+} na TnC isolada (Valencia e Reinach, comunicação pessoal), e como contém 5HW pode ser analisado complexado com TnI, que contém um Trp e

com a TnT que possui três Trp (fig. 14, fig.15, Ramos, 1999). Quando a TnCF29HW é investigada claramente o aumento na fluorescência acompanha a ligação de Ca^{2+} nos sítios de menor afinidade (fig 20a). Pretendeu-se utilizar esta abordagem para verificar se a variação da fluorescência nos complexos TnCF29HW-TnIwt e Tn-TnCF29HW acompanhava a ligação de Ca^{2+} nos sítios de maior afinidade determinada por diálise de fluxo, o que daria suporte ao modelo de inversão da afinidade dos sítios. Estes experimentos foram iniciados por Anna Victoria Rotberg, que realizou um estágio de seis meses em nosso laboratório.

Reconstituição do complexo troponina para diálise de fluxo

Os complexos binários (TnC-TnI) e ternários (TnC-TnI-TnT, fig. 2c) foram reconstituídos como descrito em Farah et al. (1994) com algumas modificações. Quantidades equimolares de proteína foram reunidas e dialisadas uma vez contra os seguintes tampões:

a) 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 4,6 M uréia; 1 M KCl; 50 μM CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

b) 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 M uréia; 1 M KCl; 50 μM CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

c) 50 mM MOPS pH 7,0; 1 M KCl; 5 μM CaCl_2 ; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

d) 50 mM MOPS pH 7,0; 100 mM KCl; 1 mM EDTA; 0,01 % NaN_3 ; 10 mM 2-mercaptoetanol.

E de quatro até seis trocas contra o tampão de diálise de fluxo:

e) 50 mM MOPS pH 7,0; 100 mM KCl; 0,01 % NaN_3 ; 5 mM DTT.

Os complexos foram centrifugados 100.000 xg, 15 min, 4 °C para retirada das proteínas precipitadas.

Diálise de fluxo.

Os experimentos de diálise de fluxo foram realizados como descrito (da Silva et al., 1993), com algumas modificações: a concentração final das proteínas foi de 12,5 µM e o tampão de diálise de fluxo: 50 mM MOPS pH 7,0; 100 mM KCl; 0,01 % NaN₃; 5 mM DTT. A concentração do estoque de TnC (e TnCF29HW) para diálise de fluxo foi determinada por análise de aminoácidos. E a concentração dos complexos foi determinada através da técnica de Hartree (1972) utilizando como padrão uma TnC com concentração determinada por análise de aminoácidos.

O método de diálise de fluxo utiliza um aparato composto de duas câmaras separadas por uma membrana de diálise. A proteína foi colocada na câmara superior e pela câmara inferior passou um fluxo constante de tampão. O ligante marcado (no caso ⁴⁵Ca²⁺) foi adicionado na câmara superior. Adicionou-se posteriormente, em intervalos regulares, concentrações crescentes de ligante frio. Frações do tampão em fluxo foram coletadas e a contagem é proporcional à concentração de ligante livre (não ligado na proteína). Como as concentrações de proteína e ligante eram conhecidas foi possível calcular a quantidade ligada na proteína. Os valores obtidos foram analisados com a equação:

$$[\text{Ca}^{2+}_{\text{ligado}}] / [\text{TnC}] = ((2 * [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1}) / (\text{Kd1}^{n1} + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1})) + ((2 * [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n2}) / (\text{Kd2}^{n2} + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n2}))$$

onde Kd1, Kd2, *n*1 e *n*2 são respectivamente as constantes de dissociação aparente e o coeficiente de Hill para os sítios de alta e baixa afinidade.

Experimentos de fluorescência foram feitos de forma a reproduzir as condições dos ensaios de diálise de fluxo, de maneira que cada adição de Ca^{2+} simulasse a adição de Ca^{2+} na diálise de fluxo. Desta forma a emissão de fluorescência em cada ponto foi correlacionada com o valor da pCa obtido na diálise de fluxo.

Tabela 3: Parâmetros das curvas de diálise de fluxo.

proteína	Kd_1	$n1$	Kd_2	$n2$
TnC	$5,2 \pm 0,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,5 \pm 0,1$
diálise de fluxo				
TnCF29HW	$5,7 \pm 1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,3 \pm 0,1$
diálise de fluxo				
TnCF29HW	_____	_____	$2,5 \pm 0,1 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1,1 \pm 0,1$
fluorescência				

Os dados de diálise de fluxo foram ajustados para a equação descrita em *Diálise de Fluxo*. Os dados de fluorescência foram ajustados para a equação descrita em *Materiais e Métodos*. Kd_1 é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e $n1$ é o coeficiente para os sítios de maior afinidade (vide figura 20a) Kd_2 é a constante de dissociação aparente do Ca^{2+} e $n2$ é o coeficiente de Hill para os sítios de menor afinidade. Os valores apresentados são a média e o desvio padrão para três experimentos independentes.

Resultados das diálises de fluxo

Os experimentos de diálise de fluxo foram iniciados com a TnCwt e TnCF29HW isoladas. Os resultados obtidos (fig. 20) e os valores das constantes de dissociação obtidos por diálise de fluxo estão em acordo com o esperado (tabela 3). Os parâmetros para TnCF29HW são ligeiramente diferentes daqueles obtidos por fluorescência (tabela 2), esta discrepância foi notada anteriormente,

e os dados estão em excelente concordância com os obtidos por Valencia e Reinach, comunicação pessoal.

Figura 20: Experimentos de diálise de fluxo. A ligação de Ca^{2+} na TnC, círculo preto, ou TnCF29HW, triângulo vermelho foi determinada por diálise de fluxo. A fluorescência de TnCF29HW também está apresentada, triângulo amarelo. (A) TnCs isoladas, os pontos representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. (B) Complexos binários; os pontos representam um experimento típico. (C) Complexos ternários; os pontos representam um experimento típico.

Os complexos binários TnC-TnI e TnCF29HW-TnI e ternários Tn e Tn-TnCF29HW foram preparados para experimentos de diálise de fluxo. Entretanto a qualidade dos experimentos para os complexos ficou abaixo da desejada. Importante notar que TnC e TnCF29HW preparadas em paralelo apresentam a curva bifásica mostrando claramente a ligação de 2 Ca^{2+} nos sítios de alta afinidade e 2 Ca^{2+} nos sítios de baixa afinidade (fig. 20). No caso da TnCF29HW isolada, a curva obtida por fluorescência acompanha a ligação de Ca^{2+} nos sítios de baixa afinidade da TnC, N-terminais. O objetivo era demonstrar que nos complexos binário e ternário este fenômeno seria invertido, a curva de fluorescência acompanharia a ligação de Ca^{2+} nos sítios de alta afinidade. Nas diálises de fluxo para os complexos não foi possível caracterizar claramente a presença de duas classes de sítios. Porém, duas coisas suportam o modelo da inversão: a fluorescência de TnCF29HW-TnI e de Tn-TnCF29HW acompanhou o início da curva de ligação de Ca^{2+} na diálise de fluxo, e a ligação de Ca^{2+} nos complexos com TnCF29HW sempre começou em pCas mais baixos do que nos com TnC. Esta última indica que a presença de um 5HW na posição 29 diminui a afinidade dos sítios de maior afinidade, como discutido (ver *Discussão*).

Os experimentos de diálise de fluxo são muito sensíveis a erros na determinação das concentrações, tanto da proteína, como do Ca^{2+} . Uma das dificuldades para melhorar a qualidade dos dados para as diálises de fluxo dos complexos deve ser a imprecisão maior na determinação na concentração de proteína. Os complexos também foram submetidos a uma diálise bastante longa, chegando a seis dias. A TnC é muito mais solúvel que a TnI e a TnT. A TnI forma dímeros através de interligações dissulfeto por resíduos de cistina intercadeias. A TnT é comumente degradada por proteases contaminantes. Portanto, é provável que exista um excesso de TnC, e que parte dos complexos não esteja funcional, tudo isso leva a uma imprecisão na determinação da concentração dos complexos. Outra dificuldade é a retirada do Ca^{2+} das preparações dos complexos troponina. Como os complexos possuem uma afinidade por cálcio maior do que a TnC sozinha, nas mesmas condições é esperado que exista mais Ca^{2+} ligado nos complexos (vide equação em *Diálise*

de Fluxo). Isto implicaria em uma situação onde os sítios de alta afinidade dos complexos já estariam parcialmente ocupados por Ca^{2+} no início do experimento de diálise de fluxo. Dados preliminares de absorção atômica confirmam que os complexos binários e ternários possuem realmente mais do que um Ca^{2+} ligado por TnC (não apresentado), mesmo após diálise mais longa. O que eleva a concentração de Ca^{2+} contaminando a preparação para a mesma concentração do complexo - ao redor de 10^{-5} M contra 10^{-6} M das preparações de TnC isoladas. Isso quer dizer que para a realização das diálises de fluxo com TnC-TnI ou Tn seria necessário modificar o tampão utilizado no ensaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bagshaw, C. R. (1993). *Muscle contraction, second edition*. Chapman & Hall, London.
2. Chandra, M., McCubbin, W. D., Oikawa, K., Kay, C. M. e Smillie, L. B. (1994). Ca^{2+} , Mg^{2+} , and troponin I inhibitory peptide binding to a Phe-154 to Trp mutant of chicken muscle troponin C. *Biochemistry* **33**, 2961-2969
3. Chandra, M., da Silva, E. F., Sorenson, M. M., Ferro, J. A., Pearlstone, J. R., Nash, B. E., Borgford, T., Kay, C. M. e Smillie, L. B. (1994). The effects of N helix deletion and mutant F29W on the Ca^{2+} binding and functional properties of chicken skeletal muscle troponin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14988-14994
4. Carter, P., Bedouelle, H. e Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4431-4443
5. da Silva, A. C., Kendrick-Jones, J. e Reinach, F. C. (1992). Hybrid myosin light chains containing a calcium-specific site from troponin C. *Eur. J. Biochem.* **15**, 85-91
6. da Silva, A. C., de Araujo, A. H., Herzberg, O., Moul, J., Sorenson, M. e Reinach, F. C. (1993). Troponin-C mutants with increased calcium affinity. *Eur. J. Biochem.* **213**, 599-604
7. Drapeau, G. R., Brammar, W. J. e Yanofsky, C. (1968). Amino acid replacements of the glutamic acid residue at position 48 in tryptophan synthetase A of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **35**, 357-367
8. Ebashi, S., Endo, M. e Ohtsuki, I. (1969). Control of muscle contraction. *Quart. Rev. Biophys.* **2**, 351-384

9. Ebashi, S., Ohtsuki, I. e Mihashi, K. (1972). Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 215-223
10. Farah, C. S., Miyamoto, C. A., Ramos, C. H. I., Silva, A. C. R., Quaggio, R. B., Fujimori, K., Smillie, L. B. e Reinach, F. C. (1994). Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle Troponin I. *J. Biol. Chem.* **269**, 5230-5240
11. Farah, C. S. e Reinach, F. C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* **9**, 755-767
12. Farah, C. S. e Reinach, F. C. (1999). Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5-hydroxytryptophan: Ca²⁺-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. *Biochemistry* **38**, 10543-10551
13. Finley, N., Dvoretzky, A. e Rosevear, P. R. (2000). Magnesium-calcium exchange in cardiac troponin C bound to cardiac troponin I. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 1439-1446
14. Fredricksen, R. S. e Swenson, C. A. (1996). Relationship between stability and function for isolated domains of troponin C. *Biochemistry* **35**, 14012-14026
15. Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moulton, J. e Reinach, F. C. (1990). Probing the calcium-induced conformational transition of troponin C with site-directed mutants. *Nature* **345**, 182-184
16. Gagné, S. M., Tsuda, S., Li, M. X., Smillie, L. B. e Sykes, B. D. (1995). Structures of the troponin C regulatory domains in the apo and calcium-saturated states. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 784-789
17. Gordon, A. M., Homsher, E. e Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853-924

18. Greaser, M. L. e Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three proteins components. *J. Biol. Chem.* **246**, 4226-4233
19. Grebarek, Z., Leavis, P. C. e Gergely, J. (1986). Calcium binding to the low affinity sites in troponin C induces conformational changes in high affinity domain: A possible route of information transfer in activation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **261**, 608-613
20. Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. In: *DNA cloning: a practical approach*. Glover, D. M. IRL Press, Oxford.
21. Harada, K., Arana, C. e Potter, J. D. (2001). Magnesium-calcium exchange with the high affinity Ca^{2+} - Mg^{2+} binding sites of cardiac troponin. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 593-596
22. Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **4**, 422-427
23. Head, J. F. e Perry, S. V. (1974). The interaction of the calcium binding troponin (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). *Biochem. J.* **137**, 145-154
24. Heeley, D. H., Golosinska, K. e Smillie, L. B. (1987). The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* **263**, 9971-9978
25. Herzberg, O. e James, M. N. G. (1985). Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature* **313**, 653-659
26. Herzberg, O., Moulton, J. e James, M. N. G. (1986). A model for the Ca^{2+} -induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **261**, 2638-2644

27. Higuchi, R. (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, United Kingdom.
28. Hitchcock-De Gregori, S. E. (1982). Study of the structure of troponin I by measuring the relative reactivities of lysines with acetic anhydride. *J. Biol. Chem.* **257**, 7372-7380
29. Hogue, C. W. V., Rasquinha, I., Szabo, A. G. e MacManus, J. P. (1992). A new intrinsic fluorescent probe for proteins. *FEBS* **310**, 269-272
30. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. e Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49
31. Houdusse, A., Love, M. L., Dominguez, R., Grabarek, Z. e Cohen, C. (1997). Structures of four Ca^{2+} bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca^{2+} switch in the calmodulin superfamily. *Structure* **5**, 1695-1711
32. Huxley, H. E. (1972). Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 361-376
33. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. e Holmes K. C. (1990). Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44
34. Kendrick-Jones, J., Rasera da Silva, A. C., Reinach, F. C., Messer, N., Rowe, T. e McLaughlin, P. (1991). Recombinant DNA approaches to study the role of the regulatory light chains (RLC) using scallop myosin as a test system. *J. Cell. Sci. Suppl.* **14**, 55-58
35. Kunkel, T. A., Roberts, J. D. e Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods. Enzymol.* **154**, 367-382
36. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

37. Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press, New York.
38. Leavis, P. C., Rosenfeld, S. S., Gergely, J., Grabarek, Z. e Drabikowski, W. (1978). Proteolytic fragments of troponin C: Localization of high and low affinity Ca^{2+} binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J. Biol. Chem.* **253**, 5452-5459
39. Luo, Y., Wu, J. L., Li, B., Langsetmo, K., Gergely, J. e Tao, T. (2000). Photocrosslinking of benzophenone-labeled single cysteine troponin I mutants to other thin filament proteins. *J. Mol. Biol.* **296**, 899-910
40. Luo, Y., Leszyk, J., Qian, Y., Gergely, J. e Tao, T. (1999). Residues 48 and 82 at the N-terminal hydrophobic pocket of rabbit skeletal muscle troponin-C photo-cross-link to Met121 of troponin-I. *Biochemistry* **38**, 6678-6688
41. McKay, R. T., Tripet, B. P., Hodges, R. S. e Sykes, B. D. (1997). Interaction of the second binding region of troponin I with the regulatory domain of skeletal muscle troponin C as determined by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **272**, 28494-28500
42. Malnic, B., Farah, C. S. e Reinach, F. C. (1998). Regulatory properties of the NH_2 - and COOH -terminal domains of troponin T: ATPase activation and binding to troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* **273**, 10594-10601
43. Mercier, P., Li, M. X. e Sykes, B. D. (2000). Role of the structural domain of troponin C in muscle regulation: NMR studies of Ca^{2+} binding and subsequent interactions with regions 1-40 and 96-115 of troponin I. *Biochemistry* **39**, 2902-2911
44. Moncrief, N. D., Kretsinger, R. H. e Goodman, M. (1990). Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I - Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.* **30**, 522-562

45. Monteiro, P. B., Lataro, R. C., Ferro, J. A. e Reinach, F. C. (1994). Functional α -tropomyosin produced in *Escherichia coli*. A dipeptide extension can substitute the amino-terminal acetyl group. *J. Biol. Chem.* **269**, 10461-10466
46. Ohtsuki, I. (1974). Localization of troponin in the filament and tropomyosin paracrystal. *J. Biochem. (Tokyo)* **75**, 753-765
47. Ohtsuki, I. (1979). Molecular arrangement of troponin-T in the thin filament. *J. Biochem.* **86**, 491-497
48. Oliveira, D. M., Nakaie, C. R., Sousa, A. D., Farah, C. S. e Reinach, F. C. (2000). Mapping the domain of troponin T responsible for the activation of actomyosin ATPase activity. Identification of residues involved in binding to actin. *J. Biol. Chem.* **276**, 27513-27519
49. Pearlstone, J. R., Borgford, T., Chandra, M., Oikawa, K., Kay, C. M., Herzberg, O., Moul, J., Herklotz, A., Reinach, F. C. e Smillie, L. B. (1992). Construction and characterization of a spectral probe mutant of TnC: Applications to analyses of mutants with increased Ca^{2+} affinity. *Biochemistry* **31**, 6545-6553
50. Pearlstone, J. R. e Smillie, L. B. (1995). Evidence for two-site binding of troponin I inhibitory peptides to the N and C Domains of TnC. *Biochemistry* **34**, 6932-6940
51. Pearlstone, J. R., Sykes, B. D. e Smillie, L. B. (1997). Interactions of structural C and regulatory N domains of troponin C with repeated sequence motifs in troponin I. *Biochemistry* **36**, 7601-7606
52. Potter, J. D. e Gergely, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **250**, 4628-4633

53. Quaggio, R. B., Ferro, J. A., Monteiro, P. B. e Reinach, F. C. (1993). Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: The role of rare codons on the expression level. *Protein Sci.* **2**, 1053-1056
54. Quaggio, R. B. (1994). *Estudo da atividade inibitória da troponina I através de mutações sítio-dirigidas*. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP.
55. Ramos, C. H. I. (1999). Mapping subdomains in the C-terminal region of troponin I involved in its binding to troponin C and thin filament. *J. Biol. Chem.* **274**, 18189-18195
56. Reymont, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. e Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58
57. Reinach, F. C., Nagai, K. e Kendrick-Jones, J. (1986). Site-directed mutagenesis of the regulatory light-chain Ca^{2+} / Mg^{2+} binding site and its role in hybrid myosins. *Nature* **322**, 80-83
58. Reinach, F. C. e Karlsson, R. (1988). Cloning, expression and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* **263**, 2371-2376
59. Rosenfeld, S. S. e Taylor, E. W. (1985). Kinetic studies of calcium and magnesium binding to troponin C. *J. Biol. Chem.* **260**, 242-251
60. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual. Second ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
61. Sanger, F.; Nicklen, S. e Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467

62. Sia, S. K., Li, M. X., Spyrapoulos, L., Gagné, S. M., Liu, W., Putkey, J. A. e Sykes, B. D. (1997). Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J. Biol. Chem.* **272**, 18216-18221
63. Sheng, Z., Strauss, W. L., François, J. M. e Potter, J. D. (1990). Evidence that both Ca(2+)-specific sites of skeletal muscle TnC are required for full activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 21554-21660
64. Smillie, L. B. (1979). Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 151-155
65. Smillie, L. B., Golosinska, K. e Reinach, F. C. (1988). Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. *J. Biol. Chem.* **263**, 18816-18820
66. Sorenson, M. M., da Silva, A. C. R., Gouveia, C. S., Sousa, V. P., Oshima, W., Ferro, J. A. e Reinach, F. C. (1995). Concerted action of the high affinity calcium binding sites in skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* **270**, 9770-9777
67. Squire J. (1981). *The structural basis of muscular contraction*. Plenum Press. New York, NY.
68. Squire, J. M. e Morris, E. P. (1998). A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *FASEB J.* **12**, 761-771
69. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. e Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89
70. Syska, H., Wilkinson, J. M., Grand, R. J. A. e Perry, S. V. (1976). The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem. J.* **153**, 375-387

71. Swenson, C. A. e Fredricksen, R. S. (1992). Interaction of troponin C and troponin C fragments with troponin I and the troponin I inhibitory peptide. *Biochemistry* **31**, 3420-3429
72. Talbot, J. A. e Hodges, R. S. (1981). Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J. Biol. Chem.* **256**, 2798-2802
73. Tripet, B., Van Eyk, J. E. e Hodges, R. S. (1997). Mapping of a second actin-tropomyosin and a second troponin C binding sites within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca^{2+} -dependent regulation of muscle contraction. *J. Mol. Biol.* **271**, 728-750
74. Van Eyk, J. E., Thomas, L. T., Tripet, B., Wiesner, R. J., Pearlstone, J. R., Farah, C. S., Reinach, F. C. e Hodges, R. S. (1997). Distinct regions of troponin I regulate Ca^{2+} -dependent activation and Ca^{2+} sensitivity of the Acto-S1-TM ATPase activity of the thin filament. *J. Biol. Chem.* **272**, 10529-10537
75. Vassilyev, D. G., Takeda, S., Wakatsuki, S., Maeda, K. e Maeda, Y. (1998). Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 4847-4852
76. Womack, F. C. e Colowick, S. P. (1973). Rapid measurement of binding of ligands by rate dialysis. *Meth. Enzymol.* **25**, 464-471
77. Yu, A., Ballard, L., Smillie, L., Pearlstone, J., Foguel, D., Silva, J., Jonas, A. e Jonas, J. (1999). Effects of high pressure and temperature on the wild-type and F29W mutant forms of the N-domain of avian troponin C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**, 53-56

CURRICULUM VITAE

Deodoro Camargo Silva Gonçalves de Oliveira

Brasileiro, nascido em 3 de Agosto de 1969

Educação

2º grau no Logos Escola de 2º Grau, 1986.

Bacharel em Ciências Biológicas no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1992.

Licenciado em Ciências Biológicas no Instituto de Biociências / Faculdade de Educação, Universidade de São Paulo, 1994.

Doutorado em Biologia Molecular no Instituto de Química; Universidade de São Paulo, até o presente.

Bolsas

Bolsista de Mestrado do CNPq, de Março de 1996 até Julho de 1998.

Bolsista de Doutorado da FAPESP, de Agosto de 1998 até Fevereiro de 2001.

Publicações

Oliveira, D. C. S. G. e Reinach, F. C., "The Calcium Induced Switch in the Troponin Complex Probed by Fluorescent Mutants of Troponin I", in press.