UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

EXPRESSÃO DE TROPONINA I DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE GALINHA EM *E.coli*

Ronaldo Bento Quaggio

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica,
Instituto de Química,
Universidade de São Paulo
Orientador: Fernando C. Reinach

SÃO PAULO

1991

EXPRESSÃO DE TROPONINA I DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE GALINHA EM E. COLI

RONALDO BENTO QUAGGIO

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Quími-
ca da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos neces-
sários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Fernando de Castro Reinach, IQ-USP
(Orientador e Presidente)

Prof.ª Dra. Bianca S. Zingales Oller do Nascimento, IQ-USP

Prof. Dr. Roy Edward Larson, FFCLRP-USP

SÃO PAULO, SP

21 DE JUNHO DE 1991

À Marisa

Agradecimentos

Ao Fernando Reinach pela orientação, confiança e paciência.

Ao Jesus A. Ferro que clonou a troponina I e me guiou nos primeiros passos do trabalho.

Às colegas Ana Claudia e Kumie que muito colaboram no meu desenvolvimento.

À Patrícia Brant pela colaboração na realização e discussão dos experimentos de diálise de equilíbrio e por fornecer a TNC necessária.

Ao Martin pela revisão do summary e pelas muitas conversas.

Ao Cláudio que garantiu a infra-estrutura.

Ao Cláudio Ferreira pelos desenhos e disposição de ajudar.

Aos colegas Mário, André, Chuck e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

À FAPESP, FINEP e MDA pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema regulatório	1
1.1.1 Troponina I	2
1.1.2 Ação inibitória da Troponina I (TNI)	2
1.1.3 Interação da TNI com a Tropomisina	4
1.1.4 Interação da TNI com a Troponina C	5
1.1.5 Interação da TNI com a Troponina T	7
1.1.6 Conclusão	8
1.2 Clonagem da Troponina I e construção do primeiro vetor de expressão	9
1.3 Sistema pET	14
1.3.1 Vetor pET	15
1.3.2 Hospedeiros	16
1.3.3 Indução	16
1.3.3.1 pLySS e pLySE	18
1.3.3.2 Bacteriófago CE6	19

2	MATERIAIS	20
2.1	Reagentes radioativos	20
2.1.1	Nucleotídeos radioativos	20
2.1.2	Cálcio radioativo	20
2.2	Enzimas	20
2.2.1	New England Biolabs	20
2.2.2	Boehringer Mannheim	20
2.3	Meios de Cultura	21
2.3.1	SOB	21
2.3.2	2xTY	21
2.3.3	Meio Mínimo	21
2.3.4	Placas Lambda	21
2.3.5	Lambda Top	21
2.3.6	Placas TYE	21
2.3.7	Placas de Meio Mínimo	21
2.4	Antibióticos	22
2.4.1	Ampicilina	22
2.4.2	Cloranfenicol	22
2.5	Linhagem de Bactérias	22
2.5.1	<i>E.coli</i> K12 HMS174	22
2.5.2	<i>E.coli</i> B BL21(DE3)	22
2.5.3	<i>E.coli</i> B BL21(DE3) pLySS	22
2.5.4	<i>E.coli</i> B BL21(DE3) pLySE	22
2.5.5	<i>E.coli</i> JM101	22
2.5.6	<i>E.coli</i> BMH 71-18 MutL	22
2.6	Tampões e Soluções	23
2.6.1	TFB	23
2.6.2	DnD	23

2.6.3	SSC (1x)	23
2.6.4	TE	23
2.6.5	PEG	23
2.6.6	Solução de Denhardt (1x)	23
2.6.7	Solução A	23
2.6.8	Solução B	23
2.6.9	Solução C	24
2.6.10	Tampão de Digestão Bam HI/Eco RI . .	24
2.6.11	Tampão de Digestão Eco RV	24
2.6.12	Tampão de Digestão Bam HI	24
2.6.13	Tampão de Digestão Nde I/Bam HI . . .	24
2.6.14	Tampão de Digestão Nde I/Eco RI . . .	24
2.6.15	Tampão de Ligação	24
2.6.16	Tampão para fosfatase alcalina . . .	24
2.6.17	TBE (1x)	25
2.6.18	Tampão de amostra para DNA (6x) . . .	25
2.6.19	Tampão de amostra para SDS-PAGE (2x)	25
2.6.20	Tampão de amostra uréia-gel (6x) . .	25
3	MÉTODOS	26
3.1	Crescimento e manutenção das Bactérias	26
3.2	Digestão dos vetores	26
3.3	Reação de Ligação	26
3.4	Reação de Fosfatase	27
3.4.1	DNA 5' protuberante	27
3.4.2	DNA "blunt end"	27
3.5	Introdução do linker de Bam HI (dCGGATCCG) . .	27

3.6	Preparação das Amostras de DNA para eletroforese	27
3.7	Gel de Agarose	27
3.8	Transformação de Bactérias com RF M13 ou Plasmídeo	28
3.9	Mini-preparação de DNA	28
3.10	Preparação de DNA fita simples (ssDNA)	29
3.11	Mutação Sítio-Dirigida com Oligonucleotídeo	30
3.11.1	Fosforilação do Oligonucleotídeo	30
3.11.2	Hibridização	30
3.11.3	Extensão e Ligação	30
3.11.4	Seleção dos Mutantes	30
3.11.5	Seqüenciamento dos Mutantes	31
3.12	Preparação em Larga Escala de RF M13 e Plasmídeo	32
3.12.1	RF M13	32
3.12.2	Plasmídeo	32
3.12.3	Extração do DNA por Lise Alcalina	32
3.12.4	Purificação do DNA por gradiente de CsCl	33
3.13	Mini-indução de proteína	33
3.14	Gel de SDS-PAGE	34
3.14.1	Preparação de amostra para gel SDS-PAGE	34
3.15	Indução em larga escala de proteína	34
3.16	Purificação da proteína induzida em larga escala	35
3.16.1	S10FXTNI	35

3.16.2	TNI	36
3.17	Quantificação da concentração de proteína . . .	36
3.18	Formação do complexo TNI/TNC	36
3.18.1	Amostra para gel de Uréia	37
3.18.2	Gel de uréia	37
3.19	Diálise de Equilíbrio	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Obtenção de Troponina I como proteína de fusão	39
4.1.1	Vetor de Expressão sem terminador de transcrição	39
4.1.2	Vetor de Expressão com terminador de transcrição	40
4.1.3	Expressão de Troponina I como proteína de fusão	42
4.1.4	Indução em larga escala e purificação da proteína S10FXTNI	44
4.1.5	Ensaio de caracterização da proteína S10FXTNI	45
4.1.5.1	Formação do complexo TNC/S10FXTNI	45
4.1.5.2	Diálise de Equilíbrio	46
4.1.5.3	Seqüenciamento da Proteína . . .	47
4.2	Expressão de Troponina I sem Fusão	47
4.2.1	Construção do sítio de Nde I na metionina inicial da TNI	49
4.2.2	Seleção dos mutantes com sítio de Nde I	49

4.2.3	Seqüenciamento dos mutantes	50
4.2.4	Subclonagem do inserto TNI em pET . .	52
4.2.5	Primeira tentativa de expressão de TNI sem fusão	53
4.2.6	Substituição dos Codons AGG por CGT no cDNA da TNI	54
4.2.7	Seleção dos mutantes contendo CGT . .	55
4.2.8	Seqüenciamento dos mutantes contendo CGT	55
4.2.9	Subclonagem do inserto TNI modificado em pET	56
4.2.10	Segunda tentativa de expressão de TNI sem fusão	56
4.2.11	Mudança da cepa de expressão para <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS	57
4.2.12	Larga escala e purificação da TNI recombinante.	59
4.2.13	Ensaaios de caracterização da TNI recombinante	60
4.2.13.1	Formação do complexo TNC/TNI . .	60
4.2.13.2	Diálise de Equilíbrio	61
4.2.13.3	Seqüenciamento da TNI recombinante	61
5	DISCUSSÃO	62
5.1	Vetores de expressão	62
5.2	Caracterização das TNI recombinantes	67

BIBLIOGRAFIA	73
------------------------	----

CURRICULUM VITAE	81
----------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fragmentos da TNC e TNI obtidos com brometo cianogênio.	3
Figura 2: Sequência do fragmento CN4 da troponina I . . .	3
Figura 3: cDNA completo da troponina I de músculo esquelético de galinha.	10
Figura 4: Clonagem do cDNA de TNI e deleção da região 5' não traduzida.	11
Figura 5: Construção do vetor de expressão com pLCII . .	12
Figura 6: Subclonagem do fragmento CLM no vetor pLCIIFXTNI	14
Figura 7: Vetor pET-3a, b ou c	15
Figura 8: Fragmento -23 a +96 do fago T7.	17
Figura 9: Construção do vetor de expressão da proteína de fusão S10FXTNI sem terminador de transcrição	40
Figura 10: Criação de um sítio de Bam HI no vetor M13 501	41
Figura 11: Construção do vetor de expressão da proteína de fusão S10FXTNI com terminador de transcrição. . . .	42
Figura 12: Expressão da proteína de fusão S10FXTNI . . .	43
Figura 13: Purificação da proteína de fusão S10FXTNI . .	44
Figura 14: Formação do complexo TNC/S10FXTNI.	46
Figura 15: Ensaio comparativo de ligação de cálcio da TNC isolada e do complexo TNC/S10FXTNI.	47
Figura 16: Construção do sítio de Nde I.	48
Figura 17: Oligonucleotídeos usados para o sequenciamento dos clones M13 R1 e M13 R18 e sua localização ao longo do cDNA da TNI.	51

Figura 18: Construção dos vetores de expressão da TNI. .	52
Figura 19: Substituição dos codons AGG por codons CGT. .	54
Figura 20: Expressão da TNI.	57
Figura 21: Expressão comparativa de pET-R18.33 em <i>E.coli</i> BL21(DE3), <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysS e <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysE.	58
Figura 22: Purificação da TNI	59
Figura 23: Formação do complexo TNC/TNI.	60
Figura 24: Ensaio comparativo de ligação de cálcio da TNC isolada e do complexo TNC/TNI.	61

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
BPMal	4-maleimidobenzofenona
BSA	albumina bovina sérica
CM	carboxi-metil
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitol
EDC	1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil]carbodiámid
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil-eter) N,N,N',N' tetracético
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
O.D.	densidade óptica
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
psi	libras por polegada quadrada
SDS	laurilsulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametilenodiamino
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Da interação da actina com a miosina resulta a contração muscular. Esta interação é controlada pela concentração de íons cálcio, que atuam sobre um sistema regulatório associado ao filamento de actina. O sistema regulatório é composto de uma molécula de tropomiosina e um complexo protéico composto de três polipeptídeos chamado troponina. Uma das subunidades, troponina C, é o receptor de íons cálcio; outra, troponina T, liga-se à tropomiosina; e a terceira, troponina I, é a responsável pela inibição da atividade ATPásica da actomiosina.

Esta dissertação descreve o desenvolvimento do processo de expressão da troponina I em bactéria, sua purificação e caracterização.

Partindo de um cDNA de troponina I músculo esquelético de galinha, procedemos à construção de um vetor de expressão da proteína em *E.coli* com o sistema pET. Inicialmente construímos um vetor de expressão capaz de produzir a troponina I fundida a 18 aminoácidos. A proteína foi purificada e caracterizada, comportando-se de forma semelhante à troponina I selvagem. Numa segunda etapa, foram feitas mutações sítio-dirigidas para a construção de um novo sítio de restrição que possibilitou construir um vetor de expressão da troponina I a partir de sua metionina inicial. Entretanto não foi obtida expressão com esta construção. Para solucionar o problema, foram feitas novas mutações que alteraram os codons AGG presentes nos 25 primeiros codons do gene da proteína por codons

CGT, sem alterar o aminoácido codificado. Nesta construção final foi obtida a expressão da proteína sem fusão, que purificada e caracterizada, comporta-se de modo idêntico à troponina I selvagem.

SUMMARY

Muscle contraction results from the interaction of myosin with actin and this interaction is controlled by the calcium ion concentration which acts on the regulatory system associated with the actin filaments. This regulatory system comprises one tropomyosin molecule and a complex composed of three polypeptide subunits. One of this subunits, troponin C binds calcium ions; another, troponin T, binds to tropomyosin while the third, troponin I, inhibits the ATPase activity of actomyosin.

This dissertation describes the development of the methodology to express troponin I in bacteria and its subsequent purification and characterization.

Starting with a troponin I cDNA from chicken skeletal muscle, a pET expression vector was constructed. The initial vector resulted the expression of a troponin I fusion protein having an additional 18 amino acids. This protein was purified and characterized and found to behave like wild type troponin I. Subsequently, employing site-directed mutagenesis, a new vector was made which allowed the expression of the protein starting at its initial methionine codon and lacking the extra amino acids. However, no expression was

achieved using this vector and, to circumvent this, further mutations were introduced in the first 25 codons which substituted AGG for CGT without altering the amino acid sequence. This final construct permitted the expression of a non fusion troponin I which, after purification and characterization, was found to behave identically to the wild type protein.

1.1 Sistema regulatório

A contração muscular resulta da interação entre os filamentos de miosina e actina. Nos músculos estriados, esta interação é controlada pela concentração de íons cálcio presente no citoplasma. O cálcio atua através de um sistema regulatório associado ao filamento de actina. Este sistema é composto por uma molécula de tropomiosina e uma de troponina localizadas a cada sete actinas ao longo do filamento (Leavis e Gergely, 1982; Ohtsuki et al., 1986). A troponina é formada por três polipeptídeos. Um deles, o receptor de íons cálcio chamado troponina C (TNC), um segundo, responsável pela inibição da atividade ATPásica da actomiosina foi denominado troponina I (TNI) e o terceiro que se liga a tropomiosina foi denominado troponina T (TNT) (Leavis e Gergely, 1982; Ohtsuki et al., 1986).

O complexo troponina-tropomiosina é inibidor da interação actina-miosina em baixas concentrações de cálcio ($0,1 \mu\text{M}$). Nesta condição, a interação entre os filamentos de actina e miosina é impedida pela ação da TNI. Quando a concentração de cálcio aumenta ($1-10 \mu\text{M}$), este liga-se à TNC fazendo com que o complexo deixe de atuar como inibidor, permitindo a interação actina-miosina o que resulta na contração muscular (Leavis e Gergely, 1982; Ohtsuki et al., 1986).

1.1.1 Troponina I

A troponina I é um polipeptídeo com aproximadamente 180 aminoácidos e pI de 9,3 (Wilkinson, 1974; Wilkinson e Grand, 1975). Sua atividade biológica consiste em inibir a interação entre a actina e a miosina. Ela se liga à actina e à tropomiosina e interage com a TNC e TNT (Ebashi et al., 1973; Potter e Gergely, 1974; Hitchcock, 1975; Horwitz et al., 1979). Deste conjunto de interações resulta a regulação da contração muscular. As informações bioquímicas indicam as regiões de possível interação entre a TNI e os demais componentes do sistema regulatório, e constituem a base para o estudo da ação da proteína a nível molecular.

1.1.2 Ação inibitória da Troponina I (TNI)

A TNI isolada é capaz de inibir em 20% a atividade ATPásica da actomiosina, independente da concentração de cálcio (Perry et al., 1973; Syska et al., 1976). Esta ação inibitória atinge 80% na presença de tropomiosina. A adição de TNC em quantidade equimolar à TNI, a inibição é neutralizada independentemente da concentração de cálcio (Perry et al., 1973).

Syska et al. (1976) demonstraram que o fragmento CN4, produzido com brometo cianogênio (resíduos 96-116 da TNI, Figura 1), mantém 75% da ação inibitória da TNI. Esta inibição também é neutralizada pela TNC. Este resultado somado ao fato da sequência de aminoácidos de CN4 ser fortemente conservada (Wilkinson e Grand, 1978), indica que esta região é importante na interação com a actina uma vez que a atividade inibitória é causada pela ligação da TNI à actina. Estes dados levaram muitos pesquisadores a concluírem que

a ação inibitória da TNI é exercida em grande parte pela região CN4, Figura 2 (Talbot e Hodges, 1981; Grand et al., 1982).

Figura 1: Fragmentos da TNC e TNI obtidos com brometo cianogênio. (Syska et al., 1976; Leavis et al., 1978). Foi demonstrado que as regiões CB8 e CB9 da TNC formam "cross-link" com a região CN4 (peptídeo inibitório) da TNI (Leszyk et al., 1987; Leszyk et al., 1990), indicando que estas regiões da TNC devem estar envolvidas na interação da TNC com a TNI que resulta na supressão da ação inibitória da TNI.

CN4	Asn-Gln-Lys-Leu-Phe-Asp-Leu-Arg-Gly-Lys-Phe-Lys-Arg-Pro-Pro-Leu-Arg-Arg-Val-Arg-Met
	96 100 110 116

Figura 2: Sequência do fragmento CN4 da troponina I. Os resíduos sublinhados são perturbados pela troponina C na presença de cálcio e os resíduos em negrito são perturbados pela actina (Grand et al., 1982)

Utilizando peptídeos sintéticos, vários peptídeos análogos ao fragmento CN4 foram testados quanto a sua capacidade de inibir a atividade ATPásica da actomiosina (Talbot e Hodges, 1981). A deleção dos resíduos 115 e 116 não afeta a ação inibitória, mas a falta do resíduo 114 a reduz sensivelmente (Talbot e Hodges, 1981). Na porção N-terminal, os resíduos 96 a 104 mostraram-se

desnecessários, mas a perda do resíduo 105 também diminui sensivelmente a ação inibitória do peptídeo. Desta maneira foi demonstrado que um peptídeo contendo a região Lys 105-Val 114 apresentava 50% da ação inibitória da TNI. Estes resultados reforçam os resultados originais de Syska et al. (1976) que associam a região CN4 com a ação inibitória da TNI, além de caracterizar a importância dos resíduos Lys 105 e Val 114 nesta inibição.

Um outro resultado que confirmou o papel desempenhado pelos resíduos da região CN4 na ação inibitória da TNI, diz respeito a perturbação exercida pela actina nos resíduos de arginina de CN4 (Grand et al., 1982). Utilizando espectros de ressonância magnética de próton, foi demonstrado que os resíduos de Arg do peptídeo CN4 são afetados pela presença da actina, enquanto que os resíduos Lys 105 e Val 114, essenciais à ação inibitória, não são afetados (Grand et al., 1982). Este resultado não só confirma a interação de CN4 com a actina, mas também sugere que os resíduos Lys 105 e Val 114, essenciais à inibição, tenham uma interação com a tropomiosina, uma vez que estes resíduos não são perturbados pela presença da actina.

1.1.3 Interação da TNI com a Tropomiosina

Apesar da importância da interação TNI-tropomiosina para a ação inibitória da TNI, existe pouca informação disponível sobre as seqüências envolvidas. O trabalho de Ebashi et al. (1974) (ap. Ohtsuki et al., 1986) demonstra esta interação através de gel filtração. Katayama (1980) mostrou que a troponina é retida em uma coluna de troponina I-Sepharose 4B. Não existe nenhum resultado

que indique quais as regiões da troponina I e da tropomiosina que estão envolvidas nesta interação.

1.1.4 Interação da TNI com a Troponina C

A TNI liga-se à TNC independentemente da concentração de cálcio, apesar da presença de cálcio fortalecer esta interação (Head e Perry, 1974; Potter e Gergely, 1974; Ohnishi et al., 1975). Syska et al. (1976) demonstraram que duas regiões da TNI interagem com a TNC. Estas regiões foram definidas utilizando fragmentos da TNI: CN5 (resíduos 1-21) e CN4 (resíduos 96-116) obtidos com brometo cianogênio e CF2 (resíduos 1-48) obtido por clivagem nos resíduos de cisteína. Como os fragmentos CN5 e CF2 se sobrepõem, o fragmento que melhor define a região de interação é o CF2 que se liga mais fortemente à TNC na presença de cálcio. Tomando por base este fato e utilizando o trabalho de Wilkinson e Grand (1978), onde são comparadas quatro seqüências de TNIs, é possível concluir que a provável região de interação está entre os resíduos 10-26. Esta conclusão é confirmada pelo trabalho de Katayama e Nozaki (1982), que sintetizaram um peptídeo homólogo aos resíduos 10-25 da TNI e mostraram que este peptídeo interagiu com a TNC de forma dependente da concentração de cálcio. Estes resultados, juntamente com os obtidos por Moir et al. (1978), que descreveu a capacidade da TNC em diminuir a fosforilação dos resíduos Thr 11 e Ser 117 da TNI, indicam uma possível interação dependente da concentração de cálcio entre a TNC e TNI na região N-terminal da TNI. Esta interação, provavelmente ocorre entre a região N-terminal da TNI e a região da TNC que possui os sítios de baixa afinidade por cálcio (Grabarek et al., 1981).

Outra região de interação é o fragmento CN4 já descrito anteriormente, que concentra a ação inibitória da TNI. Esta ação inibitória é neutralizada pela TNC independente da concentração de cálcio (Syska et al., 1976). Grand et al. (1982) demonstraram que uma série de resíduos do fragmento CN4 são perturbados pela TNC na presença de cálcio (Figura 2) e que esta perturbação é diminuída com a retirada do cálcio.

Experimentos utilizando fragmentos de TNC obtidos por digestão com brometo cianogênio, mostraram que o fragmento CB9 (resíduos 87-134; Figura 1) da TNC é capaz de neutralizar a ação inibitória da TNI, impedir a fosforilação da Ser 117 e formar complexo com a TNI na presença de cálcio (Weeks e Perry, 1978; Grabarek et al., 1981). Leszyk et al., (1987), utilizando TNC contendo BPMal ligado à Cys 98 (BPMal é uma sonda capaz de fazer "cross-link" com resíduos próximos por foto-ativação) e TNI, produziu o complexo TNC/TNI. Após induzirem o "cross-link" e digerirem o complexo com brometo cianogênio, isolaram os fragmentos que sofreram "cross-linking" e demonstraram que os fragmentos CN4 da TNI e CB9 da TNC (que contém o sítio III de ligação de cálcio), estavam ligados covalentemente.

Em trabalho recente, Leszyk et al. (1990), combinaram outra técnica de produção de "cross-links" entre TNC e TNI (com EDC capaz de produzir "cross-link" de tamanho zero), com a clivagem do complexo com brometo cianogênio. Ao contrário do esperado não foi obtido "cross-link" entre os peptídeos CN4 da TNI e CB9 da TNC. Também não foi obtido "cross-link" entre o peptídeo CN5 da TNI e

algum fragmento da região dos sítios de baixa afinidade da TNC. Nestes experimentos Leszyk et al. (1990) obtiveram "cross-link" entre o peptídeo CN4 da TNI e CB8 (resíduos 46-78) da TNC. Apesar de inesperado, este resultado não é incompatível com o modelo de interação entre a TNC e TNI dependente da concentração de cálcio, já que o peptídeo CB8 contém o sítio II de ligação de cálcio. Estes resultados não invalidam os dados anteriormente obtidos com as regiões CN4 e CN5 da TNI, uma vez que os autores admitem algumas dificuldades com o método de produção de "cross-link". Além disso, admitem que a interação destas regiões com a TNC pode ocorrer de forma que não seja possível a formação do "cross-link" pelo método empregado, ou seja, a interação de CN4 com CB8 não exclui uma interação simultânea de CN4 com CB9, apenas define outra provável região de interação (Figura 1).

1.1.5 Interação da TNI com a Troponina T

Hitchcock (1975) demonstrou em experimento de "cross-link" entre as subunidades da troponina, que a TNI esta muito próxima da TNT (0,6 nm). Este resultado foi posteriormente confirmado por diversos autores em ensaios de caracterização da interação da TNT com a TNI (Horwitz et al., 1979; Katayama, 1979; Tanokura e Ohtsuki, 1982). A interação entre a TNI e a TNT só ocorre se a TNI está na forma reduzida. A consequência deste fato é que uma troponina em que a TNI está oxidada, é incapaz de conferir à atividade ATPásica da actomiosina sensibilidade à concentração de cálcio. A partir deste dado se conclui que a interação entre a TNI e a TNT é necessária para regulação por cálcio da contração muscular (Horwitz et al., 1979).

A TNI possui três resíduos de cisteína em sua sequência: Cys 48, Cys 64 e Cys 133. Chong e Hodges (1982) demonstraram que as Cys 48 e Cys 64 só reagem com iodoacetamida se a TNI estivesse isolada ou complexada com a TNC, e que estes resíduos eram protegidos quando a TNI estava complexada com a TNT. O resíduo Cys 133¹ reagia em qualquer condição, o que indica que a região onde estão os resíduos Cys 48 e Cys 64 da TNI interage com a TNT. Hitchcock-De Gregori (1982) confirmou a importância desta região com um ensaio onde media a reatividade das lisinas da TNI à acetilação. Demonstrou que as lisinas presentes entre os resíduos 40 e 98 da TNI, tinham sua reatividade modificada quando a TNI estava complexada com a TNT, resultado que é consistente como os dados obtidos para os resíduos de cisteína.

1.1.6 Conclusão

Como pode ser visto, apesar de existir um número razoável de trabalhos que investigam as interações entre os diversos componentes do sistema regulatório, a ausência de uma estrutura tridimensional que indique como estes componentes estão arranjos, dificulta bastante a compreensão das diversas interações, muitas cálcio dependente, que ocorrem entre estas subunidades.

Com a clonagem e expressão da troponina I em *E.coli* e a possibilidade de produzir mutantes sítio-dirigidos, uma nova abordagem para este problema torna-se possível.

¹A troponina I de músculo esquelético de galinha não possui a Cys 133.

1.2 Clonagem da Troponina I e construção do primeiro vetor de expressão

A partir de uma biblioteca de cDNA de músculo esquelético de galinha, construída no vetor lambda gt10 (Reinach e Fischman, 1985), Jesus A. Ferro, então em estágio de pós-doutoramento em nosso laboratório, isolou um cDNA completo da Troponina I (Figura 3). Este cDNA foi subclonado no sítio Eco RI do vetor M13K11RX (Waye et al., 1985), um derivado do vírus M13 que possui a sequência que codifica o sítio de clivagem do fator Xa (FX). A região 5' não traduzida do cDNA foi deletada, justapondo o último codon do sítio de fator Xa ao segundo codon da TNI. Para tanto foi usado o oligonucleotídeo (5'TCCATCGAGGGTAGGTCTGATGAAGAGAAA) que hibridiza com o sítio de reconhecimento do fator Xa e os cinco primeiros codons da região traduzida da TNI, como descrito em Reinach e Karlsson (1988), Figura 4. Também foram destruídos por mutação sítio-dirigida, os sítios de Bam HI e Hind III na região traduzida do cDNA (Figura 3), utilizando dois oligonucleotídeos (5'CCCTCCCAGGGTCCATGCAGG e 5'TGTGCAAAAACTTCATGCCA) sem mudar a sequência da proteína codificada. Com este procedimento foi obtido o vetor RF M13 501, que libera o inserto FXTNI com uma digestão Bam HI/Hind III.

```

                                M S D E E K K R R A
CGGACTCGGGTTCACAACCATCTAAAGCAAGATGTCTGATGAAGAGAAAAAGAGGAGGGC
  10      20      30      40      50      60

  A T A R R Q H L K S A M L Q L A V T E I
AGCCACCGCCCGGCCAGCACCTGAAGAGTGCTATGCTCCAGCTTGCTGTCACTGAAAT
  70      80      90     100     110     120

  E K E A A A K E V E K Q N Y L A E H C P
AGAAAAAGAAGCAGCTGCTAAAGAAGTGGAAAAGCAAACTACCTGGCAGAGCATTGCC
 130     140     150     160     170     180

  P L S L P G S M Q E L Q E L C K K L H A
TCCTCTGTCCCTCCCAGGATCCATGCAGGAACCTTCAGGAACCTGTGCAAAAAGCTTCATGC
 190      Bam HI    210      220      Hind III 240

  K I D S V D E E R Y D T E V K L Q K T N
CAAGATAGACTCAGTGGATGAGGAAAGGTATGACACAGAGGTGAAGCTACAGAAGACTAA
 250     260     270     280     290     300

  K E L E D L S Q K L F D L R G K F K R P
CAAGGAGCTGGAGGACCTGAGCCAGAAGCTGTTTGACCTGAGGGGCAAGTTCAAGAGGCC
 310     320     330     340     350     360

  P L R R V R M S A D A M L R A L L G S K
ACCTCTGCGCCGGGTGCGCATGTCTGCTGATGCCATGCTGCGTGCCCTGCTGGGCTCCAA
 370     380     390     400     410     420

  H K V N M D L R A N L K Q V K K E D T E
GCACAAGGTCAACATGGACCTCCGGGCCAACCTGAAGCAAGTCAAGAAGGAGGACACGGA
 430     440     450     460     470     480

  K E K D L R D V G D W R K N I E E K S G
GAAGGAGAAGGACCTCCGCGATGTGGGTGACTGGAGGAAGAACATTGAGGAGAAATCTGG
 490     500     510     520     530     540

  M E G R K K M F E A G E S *
CATGGAGGGCAGGAAGAAGATGTTTGAGGCCGGCGAGTCCTAAGCACTGGTCTCTCCACT
 550     560     570     580     590     600

CTTGCCATTACCACCCTCTTCCATCCCCTCCTGAGCATGGCCACAGCTGTGATCATGGCC
 610     620     630     640     650     660

ACCTCCCTGCCCTGAACCTCAACATGTCCTCACCATGCATTGAACCCACTGACTGGGTGC
 670     680     690     700     710     720

TGTTTCTCTGATTTTGTGAAGAGCTGCAGTCTGGAAGCAGCAGTGTAATAAAGCTTTCA
 730     740     750     760      Hind III

TGGGAGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 790     800     810     820     830     840

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 850     860

```

Figura 3: cDNA completo da troponina I de músculo esquelético de galinha.

Figura 4: Clonagem do cDNA de TNI e deleção da região 5' não traduzida.

A e B: O cDNA da TNI foi clonado no sítio único de **Eco RI** do vetor **M13 K11 RX** (Waye et al., 1985). C e D: Com um oligonucleotídeo foi deletado a região 5' não traduzida da TNI e o gene foi fundido à sequência de reconhecimento do fator Xa dando origem ao vetor **M13 501**.

Na construção de um primeiro vetor de expressão, foi usado o plasmídeo pLCII (Nagai e Thogersen, 1987), que possui o promotor esquerdo (pL) e os 31 primeiros aminoácidos da proteína CII do fago Lambda. A subclonagem do inserto FXTNI no plasmídeo deu origem ao vetor de expressão pLCIIFXTNI que produziria a proteína de fusão CIIFXTNI: com 31 aminoácidos de CII, 186 aa de FXTNI e 3 aa do sítio de Bam HI na ligação CII com FXTNI (Figura 5). A tentativa de expressão foi feita em um hospedeiro que produz constitutivamente CI857, mutante termossensível da proteína CI de Lambda, que inibe o promotor pL, *E.coli* QY13 (Nagai e Thogersen, 1987). Isto torna possível controlar a expressão dos genes sob o controle de pL, garantindo altos níveis de expressão. Entretanto não foi obtida expressão de CIIFXTNI com esta construção.

Figura 5: Construção do vetor de expressão com pLCII.

(A) o vetor RF M13 501 foi digerido com Bam HI/Hind III liberando o fragmento FXTNI. (B) o vetor pLCII foi digerido com Bam HI/Hind III. (C) o fragmento FXTNI foi subclonado em pLCII aberto, dando origem ao vetor de expressão pLCIIFXTNI.

Nova tentativa de expressão foi feita, usando o procedimento descrito por Nagai et al. (Nagai et al., 1988). Neste trabalho, o autor obteve altos níveis de expressão, quando introduziu um fragmento de Bam HI do cDNA da cadeia leve da miosina, MLC (Reinach e Fischman, 1985), entre CII e seu inserto. Foram construídos dois vetores de expressão pLCIICLMFXTNI e pLCIIMLCFXTNI (Figura 6), já que o fragmento usado de Bam HI apresenta fase de leitura aberta nas duas orientações. Os vetores foram capazes de produzir as proteínas de fusão CIICLMFXTNI e CIIMLCFXTNI, respectivamente, o que acrescenta 116 aminoácidos de CLM ou MLC aos 220 aa de CIIFXTNI.

Obtida expressão, passou-se à clivagem das proteínas de fusão com fator Xa para separação da TNI da porção N-terminal CIICLMFX ou CIIMLCFX. Entretanto a clivagem mostrou-se inviável, já que a proteína CIICLMFXTNI era pouco clivada, enquanto a CIIMLCFXTNI sofria digestão interna. Frente a todos estes problemas, decidiu-se utilizar um vetor de expressão que possibilitasse a produção da Troponina I sem fusão.

Toda esta fase inicial do trabalho foi desenvolvida por Jesus A. Ferro, nos anos de 1987 e 1988 em nosso laboratório.

Figura 6: Subclonagem do fragmento CLM no vetor pLCIIFXTNI. O fragmento CLM da digestão Bam HI da cadeia leve da miosina (Reinach e Fischman, 1985), apresenta fase de leitura aberta nas duas orientações e sua subclonagem deu origem a dois vetores de expressão: pLCIICLMTNIFXTNI e pLCIIMLCFTNIFXTNI.

1.3 Sistema pET

Escolhemos o sistema pET, em substituição ao vetor pLCII, pelas várias opções que oferece, tanto ao nível da construção do vetor de expressão como quanto à forma de indução, facilidades que não existiam com o vetor anterior.

O sistema pET baseia-se na especificidade dos promotores reconhecidos pela RNA Polimerase do fago T7, como também em sua velocidade de transcrição, cinco vezes maior que a RNA Polimerase

de *E.coli*. Estas características garantem a possibilidade de controle e altos níveis de transcrição de DNAs clonados, já que os promotores reconhecidos pela T7 RNA Polimerase não ocorrem naturalmente em *E.coli* (Studier et al., 1990).

1.3.1 Vetor pET

Os vetores pET foram construídos a partir do plasmídeo pBR322. No único sítio de Bam HI do plasmídeo, foi clonado o fragmento -23 a +96 relativo ao início da transcrição do mRNA do gene 10 do fago T7. Este fragmento inclui o forte promotor do gene 10, como também o sítio de ligação do ribossomo (sequência de Shine-Delgarno) e os 11 primeiros codons da proteína codificada pelo gene (S10). Um outro fragmento, contendo o terminador de transcrição reconhecido pela T7 Polimerase (T Φ), foi também clonado no sítio de Bam HI, concluindo a construção do vetor pET com elementos necessários para garantir uma transcrição e tradução eficientes dos DNAs clonados (Figura 7).

Figura 7: Vetor pET-3a, b ou c.

O fragmento do DNA de T7 contendo o promotor Φ 10, os 12 primeiros aminoácidos (S10) do gene 10 (figura 8) e o terminador de transcrição T Φ foram clonados no sítio de Bam HI do plasmídeo pBR322.

A clonagem dos DNAs pode ser feita diretamente no ATG inicial de S10 (sítio Nde I), no segundo codon de S10 (sítio Nhe I), ou no sítio de Bam HI fundindo o DNA clonado a S10 (proteína de fusão). Para a clonagem em Bam HI existem três construções diferentes, o que torna possível a clonagem do DNA em fase com S10 (Figura 8).

1.3.2 Hospedeiros

O sistema pET utiliza duas cepas de bactérias para clonagem e indução. A cepa *E.coli* K12 HMS174 (F^- recA r_{k12} m_{k12}⁺ Rif^R), destina-se as clonagens iniciais e manutenção dos plasmídeos. Para a indução dos DNAs clonados é utilizada a cepa *E.coli* B, BL21 (F^- ompT r_B m_B), que sendo deficiente na protease lon e tendo perdido a protease ompT, torna o processo de purificação das proteínas induzidas mais fácil, que em cepas que possuam estas proteases.

1.3.3 Indução

A T7 RNA Polimerase necessária à indução dos vetores com DNAs clonados sob controle do promotor de T7, é fornecida pelo fago lambda DE3. Neste fago está clonado o gene da T7 RNA Polimerase sob controle do promotor lacUV5.

Com a infecção de *E.coli* BL21 com o fago DE3, obtém-se a cepa lisogênica *E.coli* BL21(DE3) que é capaz de produzir T7 RNA Polimerase, já que o promotor lacUV5 é indizível por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Desta forma, uma cultura em crescimento de *E.coli* BL21(DE3) lisogênica, inoculada com IPTG induz a produção de T7 RNA Polimerase, que transcreve o DNA clonado no vetor pET.

Figura 8: Fragmento -23 a +96 do fago T7.

A localização do promotor -23, sítio de ligação do ribossomo (SD) e sítios de clonagem, com as construções para clonagem em fase com S10 (sítio de Bam HI).

1.3.3.1 pLysS e pLysE

Como o gene da T7 RNA Polimerase está sob o controle do promotor lacUV5, mesmo sem indução existe um nível basal de atividade da enzima, uma vez que o promotor não é inibido de forma absoluta na ausência do indutor IPTG. Este fato introduz um dado importante na manipulação do sistema: se o produto do DNA clonado no vetor pET for tóxico às bactérias, não há como manter o vetor nestas células.

Para contornar este problema, o sistema pET oferece uma forma de reduzir a atividade basal da enzima. O inibidor natural da T7 RNA Polimerase é a T7 Lisozima, que é uma proteína com dupla função: liga-se a T7 RNA Polimerase inibindo a transcrição além de digerir ligações específicas na camada proteoglicana da parede celular de *E.coli*.

A produção de T7 Lisozima nas células é feita através de dois plasmídeos que possuem seu gene clonado. Nestes plasmídeos o gene da T7 Lisozima está clonado em duas orientações diferentes: na primeira construção, pLysS, o gene está sob o controle do fraco promotor de T7 Φ 3.8, que garante um nível baixo de lisozima; na segunda construção, pLysE, o gene está sob o controle do promotor de tet do plasmídeo, o que resulta num nível maior de lisozima. Desta forma, com as cepas *E.coli* BL21(DE3) pLysS e *E.coli* BL21(DE3) pLysE, dois níveis diferentes de inibição da T7 RNA Polimerase são disponíveis, tornando possível a introdução de vetores que possuem genes de produtos com diferentes graus de toxidez à bactéria. Ainda resta acrescentar que os níveis de lisozima presentes na bactéria

não representam transtorno maior, já que as proteoglicanas digeridas pela enzima, se encontram na parede externa da célula e a lisozima não é capaz de atravessar a membrana celular.

1.3.3.2 Bacteriófago CE6

No caso do produto do gene clonado ser muito tóxico à bactéria e o vetor não puder ser estabelecido nas cepas *E.coli* *E.coli* BL21(DE3) pLysS e *E.coli* BL21(DE3) pLysE, o sistema pET ainda oferece uma alternativa. O vetor pode ser mantido na cepa de manutenção *E.coli* HMS174, já que não há nenhuma T7 RNA Polimerase na célula, e ser induzido via infecção com um fago que possua o gene da T7 RNA Polimerase, que fornecerá a enzima necessária à transcrição.

O fago no caso é o bacteriófago CE6, um fago lambda modificado que possui o gene da T7 RNA Polimerase sob o controle dos promotores pL e pI, como também o cI857, o repressor termolábil, e a mutação Sam7, que impede a lise. Desta forma, o fago CE6 ao infeccionar a bactéria que carrega o vetor, fornecerá a T7 RNA Polimerase necessária à transcrição do gene clonado.

Os níveis de transcrição e tradução dos genes clonados no vetor pET via indução ou infecção são semelhantes, o que torna o sistema pET muito versátil, podendo ser empregado sem restrição.

2 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados tem grau analítico.

2.1 Reagentes radioativos

2.1.1 Nucleotídeos radioativos

$\gamma(^{32}\text{P})\text{rATP}$ (3000 Ci/mmol), $\alpha(^{32}\text{P})\text{dATP}$ (800 Ci/mmol) e $\alpha(^{35}\text{S})\text{dATP}$ (1000 Ci/mmol): Amersham.

2.1.2 Cálcio radioativo

$^{45}\text{CaCl}_2$ (10-40 mCi/mg Ca): Dupont e Amersham.

2.2 Enzimas

2.2.1 New England Biolabs

Bam HI, Eco RI, Eco RV, Hind III, Nde I, T4 DNA ligase e Polinucleotídeo quinase.

2.2.2 Boehringer Mannheim

Fragmento Klenow da DNA polimerase I e Fosfatase alcalina.

2.3 Meios de Cultura

2.3.1 SOB

20 g/l triptona; 5 g/l extrato de levedo; 0,58 g/l NaCl;
0,2 g/l KCl; pH 7,5.

2.3.2 2xTY

16 g/l triptona; 10 g/l extrato de levedo; 5 g/l NaCl;
pH 7,4.

2.3.3 Meio Mínimo

6 g/l Na_2HPO_4 ; 3 g/l KH_2PO_4 ; 0,5 g/l NaCl; 1 g/l NH_4Cl ;
0,2 g/l MgSO_4 ; 2 g/l glicose; 0,1 g/l CaCl_2 ; 1 mg/l vitamina B₁.

2.3.4 Placas Lambda

10 g/l triptona; 5 g/l NaCl; 15 g/l agar.

2.3.5 Lambda Top

10 g/l triptona; 5 g/l NaCl; 7,5 g/l agar.

2.3.6 Placas TYE

10 g/l triptona; 5 g/l extrato de levedo; 8 g/l NaCl;
15 g/l agar.

2.3.7 Placas de Meio Mínimo

Meio Mínimo; 15 g/l agar.

2.4 Antibióticos

2.4.1 Ampicilina

Ampicilina sódica Binotal, Bayer.

Ampicilina sódica Amplacilina, Fontoura-Wyeth.

Solução estoque: ampicilina dissolvida em água deionizada para concentração final de 50 mg/ml e esterilizada por filtração; estocada a -20 °C.

Solução de trabalho: 50 µg/ml em meio líquido ;100 µg/ml em placa.

2.4.2 Cloranfenicol

Succinato de cloranfenicol Quemicetina, Carlo Erba.

Solução estoque: succinato dissolvido em água deionizada para concentração final de 200 mg/ml e esterilizada por filtração; estocado a -20 °C.

Solução de Trabalho: 200 µg/ml em meio líquido ; 400 µg/ml em placa.

2.5 Linhagem de Bactérias

2.5.1 *E.coli* K12 HMS174 (Campbell et al., 1978).

2.5.2 *E.coli* B BL21(DE3) (Studier et al., 1990).

2.5.3 *E.coli* B BL21(DE3) pLyss (Studier et al., 1990).

2.5.4 *E.coli* B BL21(DE3) pLyse (Studier et al., 1990).

2.5.5 *E.coli* JM101 (Yanish-Perron et al., 1985).

2.5.6 *E.coli* BMH 71-18 MutL (Kramer et al., 1984).

2.6 Tampões e Soluções

2.6.1 TFB

100 mM KCl; 45 mM $\text{MnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
3 mM HACoCl_3 ; 10 mM K-Mes pH 6,2.

2.6.2 DnD

1 M DTT; 90% (v/v) DMSO; 10 mM acetato de potássio
pH 7,5.

2.6.3 SSC (1x)

150 mM NaCl; 0,015 mM citrato de sódio pH 7,0.

2.6.4 TE

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

2.6.5 PEG

20% (p/v) polietilenoglicol; 2,5 M NaCl.

2.6.6 Solução de Denhardt (1x)

0,1 g/l Ficoll; 0,1 g/l polivinilpirrolidona;
0,1 g/l BSA.

2.6.7 Solução A

50 mM glicose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl pH 8,0.

2.6.8 Solução B

0,2 N NaOH; 1% SDS.

2.6.9 Solução C

3 M acetato de potássio pH 4,8.

2.6.10 Tampão de Digestão Bam HI/Eco RI

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA;
100 mM NaCl.

2.6.11 Tampão de Digestão Eco RV

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA;
150 mM NaCl.

2.6.12 Tampão de Digestão Bam HI

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA;
100 mM NaCl.

2.6.13 Tampão de Digestão Nde I/Bam HI

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA;
150 mM NaCl.

2.6.14 Tampão de Digestão Nde I/Eco RI

10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 100 µg/ml BSA;
150 mM NaCl.

2.6.15 Tampão de Ligação

60 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM rATP.

2.6.16 Tampão para fosfatase alcalina

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA.

2.6.17 TBE (1x)

90 mM Tris base; 90 mM ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,3.

2.6.18 Tampão de amostra para DNA (6x)

30% (v/v) glicerol; 0,25% (p/v) azul de bromofenol; 0.6% (p/v) SDS; 60 mM EDTA pH 8,0.

2.6.19 Tampão de amostra para SDS-PAGE (2x)

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (v/v) glicerol; 2% (p/v) SDS; 0,004% (p/v) azul de bromofenol; 1,75 M β -mercaptoetanol.

2.6.20 Tampão de amostra uréia-gel (6x)

150 mM Tris 480 mM glicina pH 8,6; 60% (v/v) glicerol; 0,06% (p/v) azul de bromofenol; 375 mM β -mercaptoetanol.

Os métodos utilizados são, em sua maioria, adaptações dos procedimentos descritos por Maniatis et al. (1989).

3.1 Crescimento e manutenção das Bactérias

Foram feitos estoques em meio cultura líquido contendo 20% (v/v) de glicerol e conservadas a -80 °C. As Cepas também foram mantidas em placas de TYE com o antibiótico apropriado, renovadas mensalmente. A cepa *E.coli* JM101 foi mantida em placas de meio mínimo e também renovadas mensalmente. Para uso diário, 20 ml de meio 2xTY com o antibiótico apropriado era inoculado e incubado durante 12 horas a 37 °C, sob agitação.

3.2 Digestão dos vetores

Digerir o DNA dos vetores pela(s) enzima(s) de restrição desejada(s) durante 2 horas a 37 °C, no tampão apropriado. Extrair o DNA com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio. Precipitar com acetato de sódio (final 0,3 M) e 2,5 volumes de etanol a -70 °C durante 1 hora. Após precipitar, centrifugar 12.000xg a 4 °C por 15 min e lavar o DNA precipitado com 70% etanol. Centrifugar novamente e secar o precipitado a vácuo. Ressuspender em TE (10 a 20 ng/ μ l) e estocar a -20 °C.

3.3 Reação de Ligação

Adicionar vetor e inserto na razão molar de 1:3 e 1:6 em tampão de ligação e 20 U de T4 DNA ligase. Incubar por 4 horas a 12-15 °C. Extrair, precipitar e ressuspender o DNA em TE. Estocar a -20 °C.

3.4 Reação de Fosfatase

3.4.1 DNA 5' protuberante

Adicionar 1 pmol de DNA com 5' protuberante e 0,01 U de fosfatase alcalina no tampão apropriado. Incubar 30 min a 37 °C. Inativar 45 min a 65 °C. Extrair, precipitar e ressuspender o DNA em TE. Estocar -20 °C.

3.4.2 DNA "blunt end"

Adicionar 1 pmol de DNA com "blunt end" ou 5'recolhido e 1 U de fosfatase alcalina no tampão apropriado. Incubar 1 hora a 50 °C. Inativar 45 min a 65 °C. Extrair, precipitar e ressuspender o DNA em TE. Estocar -20 °C.

3.5 Introdução do linker de Bam HI (dCGGATCCG)

Quinar o linker como descrito. Digerir o vetor com Eco RV como descrito. Ligar o vetor com linker como descrito. Extrair, precipitar e ressuspender o DNA em TE. Digerir o vetor ligado com Bam HI para verificar a presença do sítio de Bam HI.

3.6 Preparação das Amostras de DNA para eletroforese

Após digestão do DNA, inativar as enzimas a 67 °C por 5 min. Adicionar tampão de amostra.

3.7 Gel de Agarose

Gel: 1% agarose; 1x TBE; 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Corrida: voltagem constante de 10 V/cm de gel em 1x TBE. Marcador: Lambda CI857 digerido com Hind III ou Hind III/Eco RI.

3.8 Transformação de Bactérias com RF M13 ou Plasmídeo

(Hanahan, 1985)

Diluir cultura saturada fresca na proporção 1:100 de SOB com 10 mM MgCl₂ e 10 mM MgSO₄. Incubar a 37 °C sob agitação até O.D.₆₀₀ entre 0,4 - 0,6. Centrifugar 1000xg, 15 min. Descartar sobrenadante. Ressuspender precipitado em 1/3 do volume inicial de TFB. Incubar 15 min em gelo. Centrifugar 1000xg, 15 min. Descartar sobrenadante. Ressuspender precipitado em 1/12,5 do volume inicial de TFB. Adicionar 3,5% (v/v) de DnD. Incubar 10 min em gelo. Adicionar 3,5% (v/v) de DnD. Incubar 15 min em gelo. Aliquotar 210 µl da solução em tubos gelados. Adicionar solução de DNA (100ng, max. 10 µl) nos tubos. Incubar 30 min em gelo. Choque térmico: 42 °C, 90 seg. Esfriar tubos em gelo.

Plaquarem: a) RF M13: adiciona 100 µl de cultura saturada fresca à solução; mistura solução a 3 ml de Lambda Top fundido a 42 °C e espalhar sobre placa de Lambda; b) Plasmídeo: espalhar a solução sobre placa de TYE já contendo o antibiótico apropriado. Incubar durante 12 horas.

3.9 Mini-preparação de DNA

Inocular 2 ml de 2xTY contendo o antibiótico apropriado com uma colônia isolada e incubar por 12 horas sob agitação a 37 °C. Transferir 1,5 ml da cultura para tubo eppendorf e centrifugar 12.000xg por 1 min a 4 °C. Aspirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado com 100 µl de solução A gelada. Adicionar 200 µl de solução B. Fechar o tubo e misturar a solução invertendo o tubo delicadamente. Incubar em gelo por 5 min. Adicionar 150 µl de solução C gelada e vortexar de forma delicada na posição invertida.

Incubar em gelo por 5 min. Centrifugar por 5 min a 12.000xg e 4 °C. Transferir sobrenadante para novo tubo. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio e vortexar vigorosamente. Centrifugar 2 min a 12.000xg e 4 °C. Transferir fase aquosa para novo tubo e precipitar o DNA adicionando 2 volumes de etanol. Incubar por 2 min à temperatura ambiente. Centrifugar 5 min a 12.000xg e 4 °C. Aspirar o sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol 70%. Centrifugar 5 min a 12.000xg a 4 °C. Aspirar o sobrenadante e secar o precipitado a vácuo. Ressuspender precipitado com 50 µl de TE. Estocar a -20 °C.

3.10 Preparação de DNA fita simples (ssDNA)

Transferir vírus M13 com um palito estéril, para 1,5 ml de 2xTY contendo 1% de *E.coli* JM101 de cultura saturada fresca. Incubar a 37 °C por 4 horas. Transferir cultura para tubo eppendorf estéril. Centrifugar 12.000xg 5 min. Transferir sobrenadante para novo tubo. Adicionar 150 µl de PEG. Incubar 20 min à temperatura ambiente. Centrifugar 12.000xg 20 min. Aspirar sobrenadante. Centrifugar 12.000xg 30 seg. Aspirar sobrenadante. Adicionar 100 µl de TE. Adicionar 50 µl de fenol equilibrado em 10 mM Tris-HCl pH 8,0. Vortex 30 s. Centrifugar 12.000xg 1 min. Retirar fase aquosa para novo tubo. Adicionar 10 µl de 3 M acetato de sódio pH 5,2. Adicionar 250 µl de etanol absoluto. Precipitar DNA durante 12 horas a -20 °C. Centrifugar 12.000xg 15 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol 70%. Centrifugar 12.000xg 15 min à temperatura ambiente. Descartar sobrenadante. Secar precipitado a vácuo. Ressuspender precipitado em 30 µl de TE. Estocar -20 °C.

3.11 Mutao Stio-Dirigida com Oligonucleotdeo

(Zoller e Smith, 1982; Carter, 1987)

3.11.1 Fosforilao do Oligonucleotdeo

Adicionar 100 pmoles do oligonucleotdeo e 5 U de T4 polinucleotdeo quinase em 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM rATP. Incubar: 30 min a 37 C. Inativar: 10 min a 70 C. Estocar: -20 C.

3.11.2 Hibridizao

Adicionar 10 pmoles do oligonucleotdo mutagnico fosforilado e 10pmoles de ssDNA do vetor M13 com o inserto a ser mutado em 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂. O tubo com a reao colocado em um beaker contendo gua a 80 C, que esfriar at a temperatura ambiente.

3.11.3 Extenso e Ligao

A soluo de Hibridizao corrigida para: 0,25 mM rATP; 0,25 mM dNTPs; 5 mM DTT; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂. Adicionar 10 U T4 DNA ligase; 5 U do fragmento Klenow da DNA polimerase. Incubar 12-20 horas a 12-15 C. Transformar *E.coli* BMH 71-18 MutL com a soluo de DNA. Adicionar *E.coli* JM101 antes do plaqueamento. As colnias infectadas com M13, obtidas aps a transformao, so replaqueadas.

3.11.4 Seleo dos Mutantes

Fosforilar 15 pmoles de oligonucleotdeo mutagnico com 30 Ci de γ -(³²P)dATP (3000 Ci/mmol). Transferir colnias infec-

tadas com M13 replaqueadas, para filtro de nitrocelulose (Millipore HATF 0085 00). Tratar o filtro de nitrocelulose:

3 min em 0,5 N NaOH, 1 min em 1 M Tris-HCl pH 7,4 (duas vezes) e 5 min em 0,5 N Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl. Secar à temperatura ambiente. Fixar a 80 °C em estufa a vácuo por 1 hora. Umedecer o filtro por 5 min em 6xSSC. Pré-hibridizar por 5 min a 67 °C em: 10x Solução de Denhardts; 6xSSC; 0,2% SDS. Lavar em 100 ml de 6xSSC. Hibridizar em 3 ml de 6xSSC mais oligonucleotídeo marcado com ³²P por 2 horas à temperatura ambiente. Lavar 1 min em 100 ml 6xSSC (três vezes). Autoradiografia a -70 °C por 1 hora (definir background). Lavar em 3xSSC por 1 min em temperaturas sucessivamente maiores até monitoramento com contador Geiger abaixar dramaticamente. Autoradiografia a -70 °C por algumas horas. As colônias positivas (marcas fortes na auto-radiografia após lavagens) são picadas com palitos estéreis e transferidas para 100 µl de 2xTY.

3.11.5 Seqüenciamento dos Mutantes

Diluir sucessivamente os vírus das colônias positivas, para obtenção de colônias isoladas. Preparar ssDNA das colônias isoladas. Seqüenciar as ssDNA mutantes pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo descrito por Sanger et al. (1977), usando os oligonucleotídeos apropriados.

3.12 Preparação em Larga Escala de RF M13 e Plasmídeo

(Ozaki e Cseko, 1984)

3.12.1 RF M13

Inocular 10 ml de Meio Mínimo com 1% (v/v) de cultura saturada de *E.coli* JM101 fresca e colônia isolada do vírus M13 selecionado e incubar a 37 °C sob agitação vigorosa durante 12 horas; inocular 10 ml de Meio Mínimo com 1% (v/v) de cultura saturada de *E.coli* JM101 fresca e incubar a 37 °C sob agitação vigorosa durante 12 horas. Inocular 1 l de 2xTY com 5 ml da cultura de *E.coli* JM101 mais vírus M13 e 5 ml da cultura de *E.coli* JM101. Incubar a 37 °C sob agitação por 5 horas. Adicionar mais 5 ml da cultura de *E.coli* JM101. Incubar a 37 °C sob agitação por 5-7 horas. Centrifugar 1.000xg por 10 min a 4 °C. Fazer diluição seriada do sobrenadante para verificar população de vírus. Guardar precipitado a -20 °C.

3.12.2 Plasmídeo

Inocular 10 ml de 2xTY mais antibiótico apropriado com bactéria que contém o Plasmídeo. Incubar a 37 °C sob agitação durante 12 horas. Inocular 1 l de 2xTY mais antibiótico apropriado com 10 ml da cultura anterior. Incubar a 37 °C sob agitação por 12 horas. Centrifugar 1.000xg por 10 min a 4 °C. Descartar sobrenadante e guardar precipitado a -20 °C.

3.12.3 Extração do DNA por Lise Alcalina

Ressuspender precipitado em 50 ml de Solução A gelada. Lisar bactérias com 50 ml de Solução B sob vigorosa agitação (não

ultrapassar 5 min no processo). Neutralizar Lisado com 50 ml de Solução C até formar um precipitado branco. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Transferir sobrenadante para outro tubo e adicionar 2 volumes de etanol absoluto (ou 1 volume de isopropanol). Precipitar DNA por 1 hora a -20 °C. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Lavar precipitado com 100 ml etanol 70%. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Secar precipitado a vácuo.

3.12.4 Purificação do DNA por gradiente de CsCl

Ressuspender precipitado em TE. Adicionar CsCl_2 na proporção de 1 g para cada ml de solução. Adicionar brometo de etídio para concentração final de 0,5 mg/ml. Centrifugar 3.000xg por 10 min à temperatura ambiente. Transferir sobrenadante para tubos de ultracentrifugação, completando o volume com óleo mineral. Centrifugar a 60.000 rpm por 24 horas a 20 °C (rotor 80 Ti Beckman ou equivalente). Retirar banda de DNA purificado (RF M13 ou Plasmídeo). Extrair o brometo de etídio com 1-butanol saturado com 1 M NaCl (3x). Dialisar contra TE para retirada do CsCl_2 . Estocar -20 °C.

3.13 Mini-indução de proteína (Studier et al., 1990)

Picar com palito estéril colônias isoladas dos clones a ensaiar. Inocular 3 ml de 2xTY contendo o antibiótico apropriado com o palito. Incubar até $\text{O.D.}_{600} = 0,8 - 0,9$, a 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de amostra não induzida. Induzir a expressão adicionando IPTG para uma concentração final de 0,4 mM. Incubar 3 horas, 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de amostra induzida.

3.14 Gel de SDS-PAGE

Gel de separação: 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 14,6% (p/v) acrilamida; 0,4% (p/v) bis-acrilamida; 0,1% (p/v) SDS; 0,05% (v/v) TEMED; 0,05% (p/v) persulfato de amônio. Gel de empacotamento: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 3,9% (p/v) acrilamida; 0,1% (p/v) bis-acrilamida; 0,1% SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,05% (p/v) persulfato de amônio. Correr 50 min: 200 V constante (Mini-Protein II, BioRad), em tampão: 25 mM Tris base; 200 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS; pH 8,6. Corar 15 min em: 50% etanol; 7% ácido acético; 4% azul de Comassie R-250. Descorar em 7% ácido acético.

3.14.1 Preparação de amostra para gel SDS-PAGE

Centrifugar amostra 2 min a 12.000xg. Descartar sobrenadante. Ressuspender precipitado em dH₂O: 50 µl amostra não induzida; 100 µl amostra induzida. Adicionar 2x Tampão de SDS-PAGE. Ferver 5 min. Centrifugar 10 min, 12.000xg

3.15 Indução em larga escala de proteína

(Studier et al., 1990)

Dia anterior: Repicar clone em placa de TYE com antibiótico apropriado, incubar durante a noite a 37 °C. Inocular 50 ml de 2xTY contendo o antibiótico com cultura da placa. Incubar 3 horas, 37 °C e 200 rpm. Inocular 500 ml de 2xTY contendo o antibiótico com 5 ml (1%) da cultura anterior. Incubar até O.D.₆₀₀ = 0,8 - 0,9, a 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de amostra antes da indução. Induzir a expressão adicionando IPTG para uma concentração final de 0,4 mM. Incubar 3 horas, 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de

amostra induzida. Centrifugar 4.500xg, 10 min e 4 °C. Descartar sobrenadante e guardar precipitado a -20 °C.

3.16 Purificação da proteína induzida em larga escala

(Wilkinson, 1974; Potter, 1982)

3.16.1 S10FXTNI

Ressuspender precipitado da larga escala em: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 25% sacarose; 30 ml para cada litro de cultura induzida. Passar 3x "French Press", 16.000psi. Centrifugar 20.000xg, 30 min a 4 °C. Descartar precipitado. Adicionar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido para concentração final de 40% de saturação. Centrifugar 15.000xg, 30 min e 4 °C. Descartar sobrenadante. Ressuspende precipitado em: 50 mM acetato de sódio pH 5,0; 1 mM EDTA; 1,4 mM β -mercaptoetanol. Dialisar contra mesmo tampão, para remover o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Adicionar uréia sólida para 8 M final. Aplicar em coluna de CM-celulose equilibrada com o mesmo tampão: 50 mM acetato de sódio pH 5,0; 1 mM EDTA; 1,4 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Eluir com gradiente de NaCl: 0 a 500 mM em frações de 10 ml, com fluxo de 20 ml/h. Ler frações a O.D.₂₈₀ para isolar pico de eluição da proteína. Reunir frações com a proteína. Aplicar em coluna de CM-celulose equilibrada com o mesmo tampão: 50 mM acetato de sódio pH 5,0; 1 mM EDTA; 1,4 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Lavar coluna com o mesmo tampão mais 50 mM NaCl. Eluir com gradiente de NaCl: 50 a 300 mM em frações de 10 ml, com fluxo de 20 ml/h. Ler frações a O.D.₂₈₀ para isolar pico de eluição da proteína. Reunir frações com a proteína. Dialisar contra: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM MgCl_2 ; 300 mM NaCl. Estocar a -20 °C.

3.16.2 TNI

Ressuspender precipitado da Larga escala em: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 30 ml para cada litro de cultura induzida. Passar 3 x "French Press", 16.000 psi. Centrifugar 20.000xg, 30 min e 4 °C. Descartar sobrenadante. Ressuspender precipitado em: 50 mM acetato de sódio pH 5.0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Aplicar em coluna de CM-celulose equilibrada com o mesmo tampão: 50 mM acetato de sódio pH 5,0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Eluir com gradiente de NaCl: 0 a 300 mM em frações de 10 ml, com fluxo de 20 ml/h. Ler frações a O.D.₂₈₀ para isolar pico de eluição da proteína. Reunir frações com a proteína. Dialisar contra: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM MgCl₂; 1 M NaCl. Estocar a -20 °C.

3.17 Quantificação da concentração de proteína

Para a quantificação da concentração de proteína foi utilizado o método de Hartree (1972), usando como padrão 1 mg/ml de BSA.

3.18 Formação do complexo TNI/TNC (Head e Perry, 1974)

Dialisar amostra de TNC contra: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂; 1,4 mM β -mercaptoetanol. Adicionar uréia sólida nas amostras de TNC para 4 M final e nas amostras de TNI para 6 M final. Reunir quantidades equimolares das amostras de TNC e TNI em uréia. Dialisar amostras reunidas contra: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 0,01 mM CaCl₂; 1,4 mM β -mercaptoetanol. Estocar a -20 °C.

3.18.1 Amostra para gel de Uréia

Adicionar uréia sólida na amostra para 6 M final. Adicionar tampão de corrida 6x uréia gel mais solução de 8 M uréia para concentração final da amostra de 6 M uréia.

3.18.2 Gel de uréia

Gel: 25 mM Tris - 80 mM glicina pH 8,6; 7,8% (p/v) acrilamida; 0,2% (p/v) bis-acrilamida; 6 M uréia; 0,05% (v/v) TEMED; 0,05% (p/v) persulfato de amônio. Correr 90 min., 100 V constante (Mini-Protein II, BioRad) em tampão de corrida: 25 mM Tris - 80 mM glicina pH 8,6. Fixar 20 min em: 10% etanol; 10% ácido acético. Corar 15 min em: 50% etanol; 7% ácido acético; 4% azul de Comassie R-250. Descorar em 7% ácido acético.

3.19 Diálise de Equilíbrio (Potter et al., 1983)

Todas as soluções devem ser preparadas com H₂O Milli-Q. Lavar todo material com uma solução de 5 mM EDTA, seguida por uma lavagem com H₂O Milli-Q. Ferver membranas em: a) 4% bicarbonato de sódio; b) H₂O Milli-Q; c) 5 mM EDTA (obs.: antes de ser utilizadas as membranas devem ser lavadas em H₂O Milli-Q). Preparar soluções de proteína com concentrações de 2 mg/ml para TnC e 4 mg/ml para o complexo TnC/TnI. Pré-dialisar as soluções de proteína em: 10 mM imidazol-HCl pH 7,0; 100 mM KCl; 0,1 mM EGTA; 2 mM MgCl₂. Por 48 horas a 4 °C. Calcular quanto acrescentar de CaCl₂ para obter o pCa ($-\log[Ca^{+2}]$) desejado na solução de diálise (obs. O programa SPECS, Fabiato e Fabiato 1979, realiza estes cálculos). Preparar soluções de diálise: 10 mM imidazol-HCl pH 7,0; 100 mM KCl; 0,1 mM EGTA; 2 mM MgCl₂; 0,2 mM DTT; CaCl₂ necessário para o pCa desejado. Transferir

350 μ l das soluções pré-dialisadas de proteína para tubos plásticos de 1,5 ml. Cobrir os tubos com a membrana de diálise, prendendo-a com um anel de borracha. Adicionar ^{45}Ca à solução de diálise para final 100 cpm/ μ l de solução (2 μ Ci por recipiente de solução). Dialisar amostras por 48 horas a 15 °C, sob suave agitação. Recolher amostras de 150 μ l de cada tubo com proteína e de cada solução de diálise e aplicar em "vials" de cintilação com 3 ml de líquido de cintilação. Contar os cpms das amostras em um cintilador. Calcular a relação moles de cálcio ligado por mol de proteína, em cada um dos pCas (obs. esta relação é obtida comparando a contagem de cpms dentro do tubo com proteína com a contagem fora, na solução de diálise, já que conhecemos a concentração de cálcio, pCa, e de proteína).

4.1 Obtenção de Troponina I como proteína de fusão

Nesta primeira fase do trabalho foram desenvolvidos dois vetores de expressão baseados no vetor pET-3a capazes de expressar a troponina I na forma de proteína da fusão.

4.1.1 Vetor de Expressão sem terminador de transcrição

No primeiro vetor desenvolvido, optou-se pela construção mais simples. Partindo do vetor M13 501 (Figura 9), foi feita uma digestão Bam HI/Eco RI, que libera o inserto FXTNI (vide introdução). O vetor pET-3a foi digerido também com Bam HI/Eco RI, o que retira o terminador de transcrição da T7 polimerase. Foi feita a ligação do vetor pET-3a aberto ao inserto FXTNI, promovendo a fusão em fase da FXTNI aos 12 primeiros codons que codificam a proteína S10 do fago T7. Isto resultou em um vetor capaz de expressar a proteína de fusão S10FXTNI (Figura 9). Esta ligação foi usada para transformar *E.coli* HMS174. Com os clones positivos obtidos (resistentes a ampicilina), foi feita uma mini-preparação de DNA que foi digerida com Bam HI/ Eco RI para seleção dos plasmídeos que possuíam o inserto subclonado. Selecionou-se o plasmídeo pET-501.4, sendo feita uma larga escala do mesmo para preservar a construção.

Figura 9: Construção do vetor de expressão da proteína de fusão S10FXTNI sem terminador de transcrição.

(A) o vetor RF M13 501 foi digerido com Bam HI/Eco RI liberando o fragmento FXTNI. (B) o vetor pET-3a foi digerido com as mesmas enzimas. (C) o fragmento FXTNI foi subclonado no vetor pET-3a aberto, dando origem ao vetor de expressão pET-501.4.

4.1.2 Vetor de Expressão com terminador de transcrição

Na segunda construção procurou-se manter intacto o sistema de expressão fornecido pelo vetor pET-3a. Inicialmente foi feita uma digestão com Eco RV no vetor RF M13 501, para abrir o sítio de Eco RV presente em seu polilinker, na região 3' do inserto FXTNI. No sítio aberto, foi clonado um linker para Bam HI, o que torna possível a retirada do inserto com uma digestão com Bam HI (Figura 10). O vetor M13 resultante foi usado na transformação de *E.coli* JM101. Os vírus obtidos, foram usados para uma mini-preparação de RFs de M13, que digeridos com Bam HI liberam o inserto

FXTNI nos clones em que a clonagem foi correta. Foi selecionado o vetor RF M13 508, sendo feita uma larga escala de RF.

Figura 10: Criação de um sítio de Bam HI no vetor M13 501.

(A) o vetor RF M13 501 foi digerido com Eco RV, sendo subclonado um linker de Bam HI no sítio aberto. Esta operação deu origem ao vetor M13 508 (B)

O vetor RF M13 508 foi digerido com Bam HI, liberando o inserto FXTNI. A mesma digestão Bam HI, foi feita no vetor pET-3a. Procedeu-se então à subclonagem do inserto em pET dando origem aos plasmídeos que foram usados para transformação de *E.coli* HMS174 (Figura 11). Dos clones positivos (resistentes a ampicilina), foi feita uma mini-preparação de DNA. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com Bam HI, para selecionar quais possuíam o inserto. Selecionados os clones com o inserto, foi feita uma digestão com Hind III para verificar quais clones possuíam o inserto na

orientação correta. Foi selecionado o vetor pET-508.7, do qual foi preparada uma larga escala de DNA.

Figura 11: Construção do vetor de expressão da proteína de fusão S10FXTNI com terminador de transcrição.

(A) o vetor RF M13 508 foi digerido com Bam HI liberando o fragmento FXTNI. (B) o vetor pET-3a foi digerido com a mesma enzima. (C) o fragmento FXTNI foi subclonado no vetor pET-3a aberto, dando origem ao vetor de expressão pET-508.7.

4.1.3 Expressão de Troponina I como proteína de fusão

Construídos os dois vetores, passamos aos ensaios de expressão da proteína, com o objetivo de identificar qual construção permitia um maior nível de expressão. Os vetores, pET-501.4 e pET-508.7, foram usados na transformação de *E.coli* BL21(DE3), cepa de expressão do sistema pET, e com os clones positivos (resistentes a ampicilina), foi feita uma mini-indução de proteína.

Amostras de proteína total dos clones, induzidos e não induzidos, foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-PAGE, para verificar o nível de expressão da proteína de fusão S10FXTNI (Figura 12). Observou-se a indução da TNI de fusão usando os dois vetores. Quando comparamos os níveis de expressão nos plasmídeos com e sem terminador concluiu-se não haver diferença apreciável no nível de indução das duas construções (Figura 12). Escolhemos o vetor pET-501.4 (sem terminador) para as preparações de proteína em larga escala.

Figura 12: Expressão da proteína de fusão S10FXTNI.

A) Gel 12% SDS-PAGE; Extrato total de *E.coli* BL21(DE3); (1) *E.coli* BL21(DE3) pET-3a não induzida, (2) *E.coli* BL21(DE3) pET-3a induzida, (3) *E.coli* BL21(DE3) pET-501.4 não induzida, (4) *E.coli* BL21(DE3) pET-501.4 induzida e (5) marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 KDa. B) Gel 12% SDS-PAGE; Extrato total de *E.coli* BL21(DE3); (1) *E.coli* BL21(DE3) pET-501.4 não induzida, (2) *E.coli* BL21(DE3) pET-501.4 induzida, (3) *E.coli* BL21(DE3) pET-508.7 não induzida, (4) *E.coli* BL21(DE3) pET-508.7 induzida e (5) marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 KDa.

4.1.4 Indução em larga escala e purificação da proteína S10FXTNI

A larga escala de proteína foi feita como descrito no item 3.15 de Métodos. A purificação de S10FXTNI a partir do extrato bruto de bactéria foi estabelecida tomando como referência inicial o trabalho de Potter (1982) que descreve a purificação dos componentes do filamento fino de músculo esquelético. O procedimento final adotado, após diversos testes, envolve uma centrifugação diferencial, uma precipitação por sulfato de amônio e duas cromatografias em CM-celulose. O procedimento está descrito em Métodos (item 3.16.1) (Figura 13). Como pode ser visto na Figura 13, obteve-se uma preparação homogênea de S10FXTNI após a cromatografia. O rendimento da preparação foi de 50 mg de proteína/litro de cultura induzida.

Figura 13: Purificação da proteína de fusão S10FXTNI.

Gel 15% SDS-PAGE; (1) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pET 501.4 não induzida, (2) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pET 501.4 induzida, (3) Sobrenadante "French Press", (4) Precipitado "French Press", (5) Sobrenadante da precipitação com 40% Sulfato de Amônio, (6) Precipitado do Sulfato de Amônio, (7) Eluido da primeira passagem em coluna de CM-celulose (gradiente 0 - 500mM NaCl), (8) Eluido da segunda passagem em coluna de CM-celulose (gradiente 50-300mM NaCl) e (9) Marcador, miofibrila de camundongo. Numeração à direita: peso molecular em kDa

4.1.5 Ensaios de caracterização da proteína S10FXTNI

Purificada a proteína de fusão S10FXTNI expressa em *E.coli*, ensaios de caracterização foram feitos para estabelecer se a proteína apresenta comportamento semelhante a Troponina I selvagem, uma vez que a proteína sintetizada contém uma extensão de 18 aminoácidos no seu N-terminal.

4.1.5.1 Formação do complexo TNC/S10FXTNI

Uma das propriedades mais características da TNI é sua alta afinidade pela TNC, como descrito em detalhe na introdução. Com quantidades equimolares de S10FXTNI e TNC recombinante produzida em nosso laboratório, promovemos a formação do complexo conforme descrito em Métodos (item 3.18). Verificamos a formação do complexo, da forma descrita por Head e Perry (1974) através de um gel de uréia. Como pode ser observado na Figura 14, o complexo formado pela proteína de fusão S10FXTNI com a TNC, é estável na presença de 6 M uréia na presença de cálcio, se desfazendo na ausência deste íon. Sob este aspecto a proteína recombinante, apesar de possuir uma extensão no N-terminal se comporta de maneira idêntica à TNI selvagem. Concluímos portanto que a S10FXTNI se comporta de maneira semelhante à Troponina I selvagem, no que se refere a ligação à TNC.

Figura 14: Formação do complexo TNC/S10FXTNI.

Caracterização da proteína de fusão S10FXTNI quanto a sua capacidade de formar complexo com a TNC, como descrito por Head e Perry (Head e Perry, 1974) para TNI selvagem. Gel 8% PAGE e 6 M uréia; (1) TNC com cálcio, (2) TNC com EGTA, (3) S10FXTNI com cálcio, (4) S10FXTNI com EGTA, (5) e (7) TNC/S10FXTNI com cálcio e (6) e (8) TNC/S10FXTNI com EGTA.

4.1.5.2 Diálise de Equilíbrio

De posse do complexo TNC/S10FXTNI passamos a um segundo ensaio de caracterização. Como descrito (Potter e Gergely, 1975) a ligação da TNI à TNC faz com que a afinidade da TNC pelo cálcio aumente uma ordem de magnitude. Para testar se a proteína S10FXTNI possuía as mesmas características da TNI medimos a afinidade do complexo pelo cálcio e comparamos à afinidade da TNC pelo cálcio, em uma diálise de equilíbrio (Método item 3.19). Obtivemos resultados compatíveis com os encontrados na literatura (Figura 15), ou seja, o complexo é capaz de aumentar a afinidade da TNC pelo cálcio em aproximadamente uma ordem de magnitude, uma vez mais evidenciando que a proteína de fusão S10FXTNI tem comportamento semelhante à Troponina I selvagem.

Figura 15: Ensaio comparativo de ligação de cálcio da TNC isolada e do complexo TNC/S10FXTNI.

Caracterização da proteína de fusão S10FXTNI quanto a sua capacidade de aumentar a afinidade da TNC pelo cálcio, como descrito por Potter e Gergely (1975).

4.1.5.3 Sequenciamento da Proteína

Em colaboração com o Dr. Lawrence Bruce Smillie, sequenciamos a proteína S10FXTNI e obtivemos a sequência esperada da proteína de fusão. Como foi feito o sequenciamento de 20 resíduos contendo o segmento de S10, FX e o início da TNI, foi possível demonstrar de maneira inequívoca a identidade da proteína por nós purificada.

4.2 Expressão de Troponina I sem Fusão

Concluída a primeira fase do trabalho em que obtivemos a expressão, purificamos e caracterizamos a proteína de fusão S10FXTNI iniciamos uma segunda fase do trabalho cujo objetivo foi produzir a TNI diretamente, sem ser na forma de uma proteína de fusão. O sistema de expressão pET oferece a possibilidade de expressão da proteína sem fusão ao fragmento S10. Para tanto é necessário construir um sítio de Nco I ou Nde I no início da região

codificadora do gene da proteína. Em nosso caso, optamos por construir um sítio de Nde I, entre a região que codifica o sítio de reconhecimento do Fator Xa (FX) e o início da região codificadora da TNI. Esta operação torna possível a retirada da sequência que codifica a TNI e sua subclonagem em pET, imediatamente após o sítio de ligação do ribossomo (Figura 16).

Figura 16: Construção do sítio de Nde I.

(A) foi construído um sítio de Nde I, através de mutação sítio-dirigida usando o óligo 1089-86, entre a sequência que codifica o sítio de reconhecimento do fator Xa (FX) e o gene da TNI no vetor M13 508. Este procedimento originou o vetor M13 R1 que libera o fragmento TNI com uma digestão Nde I/Bam HI (B).

temp. (°C)	filtro 1 (mR/h)	filtro 2 (mR/h)
ambiente	13,0	14,0
50°	5,0	6,0
55°	2,6	2,8
60°	1,8	2,0
65°	1,3	1,4
70°	1,0	1,1
75°	0,7	0,9
80°	0,3	0,4

Quadro I: Temperaturas de lavagem (1 min em 3xSSC a diferentes temperaturas) e correspondentes leituras no contador Geiger.

Após a última lavagem, os filtros foram novamente autoradiografados. As colônias mutadas, foram localizadas e os vírus seqüenciados.

4.2.3 Seqüenciamento dos mutantes

Os vírus produzidos pelas colônias selecionadas foram diluídos para obter-se clones isolados. Feita a diluição, doze colônias isoladas (M13 R1 a M13 R12) foram escolhidas para o início da seleção do mutante por seqüenciamento. Foi preparado o ssDNA dos clones, e feito o seqüenciamento usando o oligonucleotídeo apropriado para verificar a presença da mutação. Foi selecionado o clone M13 R1, que possui a mutação. Após a seleção do clone, foi feito seu seqüenciamento total, usando os oligonucleotídeos apropriados (Figura 17). Confirmada a seqüência do clone, foi preparado uma larga escala de RF.

<-M13 UNIVERSAL

GGATCCATCGAGCATATGTCTGATGAAGAG 1089-86

GGATCCATCGAGGGTAGGTCTGATGAAGAGAAAAAGAGGAGGGCAGCCACCGCCCGGCGC
10 20 30 40 50 60

CAGCACCTGAAGAGTGCTATGCTCCAGCTTGCTGTCACTGAAATAGAAAAAGAAGCAGCT
70 80 90 100 110 120

CAGAGCATTCCCCTCCTCT CS-48

GCTAAAGAAGTGGAAAAGCAAACTACCTGGCAGAGCATTGCCCTCCTCTGTCCCTCCCA
130 140 150 160 170 180

TGTGCAAAAACTTCATGCCA 233

GGGTCCATGCAGGAACTTCAGGAACTGTGCAAAAACTTCATGCCAAGATAGACTCAGTG
190 200 210 220 230 240

GATGAGGAAAGGTATGACACAGAGGTGAAGCTACAGAAGACTAACAAGGAGCTGGAGGAC
250 260 270 280 290 300

KE-105 CTGAGGGGCGAGTTCAAGA

CTGCGCCGGTG

CTGAGCCAGAAGCTGTTTGACCTGAGGGGCAAGTTCAAGAGGCCACCTCTGCGCCGGGTG
310 320 330 340 350 360

CGCATGTCT VC-114

CGCATGTCTGCTGATGCCATGCTGCGTGCCCTGCTGGGCTCCAAGCACAAGGTCAACATG
370 380 390 400 410 420

CTC

GACCTCCGGGCCAACCTGAAGCAAGTCAAGAAGGAGGACACGGAGAAGGAGAAGGACCTC
430 440 450 460 470 480

CGCGATTAGGGTGA CTG V-157

ATGGAGGGCAAGAAG

CGCGATGTGGGTGACTGGAGGAAGAACATTGAGGAGAAATCTGGCATGGAGGGCAGGAAG
490 500 510 520 530 540

AAG RK-173

AAGATGTTTGAAGCCGGCGAGTCCTAAGCACTGGTCTCTCCACTCTTGCCATTACCACCC
550 560 570 580 590 600

TCTTCCATCCCCCTCCTGAGCATGGCCACAGCTGTGATCATGGCCACCTCCCTGCCCTGAA
610 620 630 640 650 660

CCTCAACATGTCTCACCATGCATTGAACCCACTGACTGGGTGCTGTTTCTCTGATTTTG
670 680 690 700 710 720

TGAAGAGCTGCAGTCTGGAAGCAGCAGTGTAATAAAGCTTTCATGGGAGAGGAAAAAAA
730 740 750 760 770 780

AA
790 800 810 820 830 840

AAAAAAAAAA

850

Figura 17: Oligonucleotídeos usados para o seqüenciamento dos clones M13 R1 e M13 R18 e sua localização ao longo do cDNA da TNI.

4.2.4 Subclonagem do inserto TNI em pET

O vetor M13, RF M13 R1, foi digerido com Nde I/Bam HI, liberando o inserto TNI, que foi subclonado em pET, deu origem ao vetor de expressão pET-R1 (Figura 18). O DNA resultante da subclonagem, foi usado na transformação de *E.coli* HMS174. Com os clones positivos (resistentes a ampicilina), foi feita uma mini-preparação de DNA. Os plasmídeos obtidos foram digeridos com Nde I/Bam HI para seleção dos que continham o inserto TNI. Foi selecionado o clone pET-R1.26, do qual foi feita uma larga escala de plasmídeo.

Figura 18: Construção dos vetores de expressão da TNI.

(A) os vetores RF M13 R1 e RF M13 R18 foram digeridos com Nde I/Bam HI liberando o fragmento TNI. (B) o vetor pET-3a foi digerido com as mesmas enzimas. (C) o fragmento TNI foi subclonado no vetor pET aberto dando origem aos vetores de expressão pET-R1.26 e pET-R18.33.

4.2.5 Primeira tentativa de expressão de TNI sem fusão

Concluída a construção do vetor de expressão pET-R1.26, passamos a tentar a expressão da proteína. O vetor pET-R1.26 foi usado na transformação de *E.coli* BL21(DE3), cepa de indução do sistema T7. Com os clones resistentes a ampicilina foi feita uma mini-preparação de proteína. Nenhum dos clones testados foi capaz de produzir TNI após a indução. Tentamos contornar o problema transformando *E.coli* BL21(DE3) com outras cópias da mesma construção (pET-R1.26), supondo haver algum problema com o clone selecionado. Novamente não houve indução da proteína. Uma terceira alternativa testada foi fazer a indução da proteína via infecção de *E.coli* HMS174 contendo o plasmídeo com o vírus lambda CE6 que possui o gene da T7 polimerase. Esta última possibilidade de indução oferecida pelo sistema pET, também não apresentou resultados positivos.

Esgotadas as soluções oferecidas pelo vetor, passamos a procurar outras alternativas para resolver o problema. Encontramos uma possível solução para o problema em experimentos publicados por Chen e Inouye (1990). Neste trabalho, os autores associam a presença de codons AGG ou AGA nos primeiros 25 codons da região traduzida do gene, com um efeito negativo no seu nível de expressão. Analisando os 25 primeiros codons do cDNA da TNI (ATG TCT GAT GAA GAG AAA AAG **AGG AGG** GCA GCC ACC GCC CGG CGC CAG CAC CTG AAG AGT GCT ATG CTC CAG CTT) encontramos dois codons AGG na oitava e nona posição, o que enquadra o gene da TNI nos casos descritos pelos autores. Para testar se este fato poderia ser responsável pela ausência de expressão da proteína, resolvemos modificar os codons

AGG por codons CGT, substituindo um codon raro em *E.coli* por um mais comum, sem alterar o aminoácido codificado.

4.2.6 Substituição dos Codons AGG por CGT no cDNA da TNI

A modificação dos codons AGG por CGT, foi feita por mutação sítio-dirigida usando o oligonucleotídeo 690-86. O processo de mutação foi feito como descrito, partindo da hibridização do óligo 690-86 ao DNA simples fita do vírus M13 R1 (Figura 19).

R1	5'...	GAT	GAA	GAG	AAA	AAG	AGG	AGG	GCA	GCC	ACC	GCC	...	3'
							X	X	X	X				
690-86	5'	GAT	GAA	GAG	AAA	AAG	CGT	CGT	GCA	GCC	ACC	GCC	3'	

Após a extensão e ligação, o DNA obtido foi usado na transformação de *E.coli* MutL com um reforço de *E.coli* JM101 saturada no plaqueamento.

Figura 19: Substituição dos codons AGG por codons CGT.

(A) os codons AGG presentes na oitava e nona posição da região codificadora da TNI, foram substituídos por codons CGT por mutação sítio-dirigida usando o óligo 690-86. Este procedimento deu origem ao vetor M13 R18 (B).

4.2.7 Seleção dos mutantes contendo CGT

A seleção dos mutantes foi feita como descrito, sendo usada como sonda o óligo 690-86. Novamente usamos 3xSSC na lavagem dos filtros, já que o óligo tem uma temperatura de dissociação (T_d) de 92 °C e 33 bases de extensão.

Depois da primeira exposição a -70 °C, foram feitas a lavagens em temperaturas crescentes, monitoradas com o contador Geiger, (Quadro II).

temp. (°C)	filtro (mR/h)
ambiente	20,0
50°	7,0
55°	4,0
60°	3,0
65°	1,5
70°	0,7
75°	0,5

Quadro II: Temperaturas de lavagem (1 min em 3xSSC a diferentes temperaturas) e correspondentes leituras no contador Geiger.

Após a última lavagem, o filtro foi exposto a -70 °C. As colônias com marcação forte na auto-radiografia, foram localizadas na placa original e caracterizadas.

4.2.8 Seqüenciamento dos mutantes contendo CGT

Da mesma forma como descrito no item 4.2.3, doze clones foram selecionados para seqüenciamento (M13 R13 a M13 R24). Primeiramente foi feita a seleção por seqüenciamento para encontrar o clone mutante. Selecionamos o clone M13 R18, do qual foi feito

um seqüenciamento total, usando os óligos apropriados (Figura 17). Com a seqüência completa do gene confirmada, foi feita uma larga escala da RF do clone.

4.2.9 Subclonagem do inserto TNI modificado em pET

O RF R18, foi digerido com Nde I/Bam HI, liberando o inserto TNI, que foi subclonado em pET digerido com as mesmas enzimas (Figura 18). O DNA obtido foi usado na transformação de *E.coli* HMS174. Com os clones positivos (resistentes a ampicilina) foi feita uma mini-preparação de DNA. Os plasmídeos foram digeridos com Nde I/Bam HI para seleção dos clones que possuíam o inserto TNI. Selecionamos o clone pET-R18.33, sendo feita uma larga escala de plasmídeo.

4.2.10 Segunda tentativa de expressão de TNI sem fusão

Com o vetor de expressão pET-R18.33 pronto, pudemos testar a hipótese de que a falta de expressão se devia ao efeito negativo dos codons AGG. Usamos o vetor pET-R18.33 para transformar *E.coli* BL21(DE3), e com os clones resistentes a ampicilina, foi feita uma mini-preparação de proteína. Foi obtida expressão da proteína sem fusão (Figura 20), confirmando o efeito negativo destes codons.

Figura 20: Expressão da TNI. Gel 12% SDS-PAGE; Extrato total de *E.coli* BL21(DE3). (1) *E.coli* BL21(DE3) pET-3a não induzi-da, (2) *E.coli* BL21(DE3) pET-3a induzida, (3) *E.coli* BL21(DE3) pET-R18.33 não induzida, *E.coli* BL21(DE3) pET-R18.33 induzida e (5) marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 KDa.

4.2.11 Mudança da cepa de expressão para *E.coli* BL21(DE3) pLysS

Verificamos após algumas mini-preparações de proteína que a expressão do vetor pET-R18.33 diminuía de forma muito rápida, na medida em que o clone era repicado. Este fato tornava necessária transformações freqüentes da cepa de expressão com o vetor, para garantir um bom nível de expressão. Concluímos, após alguns testes, tratar-se de instabilidade do vetor na cepa de expressão, devido à atividade basal da T7 Polimerase.

Para contornar o problema usamos o vetor pET-R18.33 na transformação de *E.coli* BL21(DE3) pLysS e *E.coli* BL21(DE3) pLysE. Com os clones resistentes a ampicilina e a cloranfenicol, foi feita uma mini-preparação de proteína, onde comparamos a expressão das duas cepas com a obtida com *E.coli* BL21(DE3) (Figura 21). O nível

de expressão de pLysS e pLysE é muito superior ao obtido com *E.coli* BL21(DE3) e verificamos também, que este nível permanecia inalterado após vários repiques. Isto confirmou a hipótese de instabilidade do vetor em *E.coli* BL21(DE3).

Figura 21: Expressão comparativa de pET-R18.33 em *E.coli* BL21(DE3), *E.coli* BL21(DE3) pLysS e *E.coli* BL21(DE3) pLysE.

Gel 12% SDS-PAGE; Extrato total de *E.coli* BL21(DE3). (1) *E.coli* BL21(DE3) pET-R18.33 não induzida, (2) *E.coli* BL21(DE3) pET-R18.33 induzida, (3) *E.coli* BL21(DE3) pLysS pET-R18.33 não induzida, (4) *E.coli* BL21(DE3) pLysS pET-R18.33 induzida, (5) *E.coli* BL21(DE3) pLysE pET-R18.33 não induzida, (6) *E.coli* BL21(DE3) pLysE pET-R18.33 induzida e (7) marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 kDa.

Após este resultado passamos a utilizar a cepa *E.coli* BL21(DE3) pLysS na produção de TNI. Escolhemos pLysS e não pLysE, porque apesar de ambas apresentarem níveis semelhantes de expressão, a segunda cresce de forma mais lenta.

4.2.12 Larga escala e purificação da TNI recombinante.

Foi feita uma preparação em larga escala da TNI. O processo de purificação da TNI do extrato bruto de bactéria, foi basicamente o já estabelecido para a purificação de S10FXTNI, com algumas modificações nos passos iniciais (Métodos item 3.16.2). Retiramos a sacarose do tampão de ressuspensão das bactérias após a indução, uma vez que a cepa utilizada expressa lisozima o que promove lise das bactérias no início da ressuspensão. Outra modificação foi a introdução de 10 mM β -mercaptoetanol no tampão de ressuspensão (Wilkinson, 1974). Nestas condições, ao contrário da proteína de fusão S10FXTNI, a TNI está na forma insolúvel no citoplasma da bactéria, eliminando a necessidade de precipitação com sulfato de amônio (Figura 22).

Figura 22: Purificação da TNI.

Gel 15% SDS-PAGE; (1) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pLysS pET-R18.33 não induzida, (2) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pLysS pET-R18.33 induzida, (3) Sobrenadante da lise com "French Press", (4) Precipitado da lise com "French Press", (5) Marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 kDa e (6) Eluido da coluna de CM-celulose (gradiente 0-300mM NaCl).

4.2.13 Ensaios de caracterização da TNI recombinante

Como foi feito para proteína de fusão S10FXTNI, também com a TNI recombinante foram feitos os ensaios de caracterização, para estabelecer se a proteína sintetizada apresenta comportamento semelhante à Troponina I selvagem.

4.2.13.1 Formação do complexo TNC/TNI

Com a proteína purificada procedemos ao primeiro ensaio de caracterização, a formação do complexo TNC/TNI. Como já descrito, quantidades equimolares de TNI e TNC foram reunidas para obtermos o complexo. Um gel de poliacrilamida na presença de 6 M uréia (Head e Perry, 1974) revelou a formação do complexo (Figura 23). Este resultado confirma o que já esperávamos: que a TNI recombinante é funcional no que se refere a ligação a TNC.

Figura 23: Formação do complexo TNC/TNI.

Caracterização da TNI recombinante quanto a sua capacidade de formar complexo com a TNC, como descrito por Perry e Head (Head and Perry, 1974). Gel 8% PAGE e 6 M uréia, (1) TNC com cálcio, (2) TNC com EGTA, (3) TNI com cálcio, (4) TNI com EGTA, (5) e (7) TNC/TNI com cálcio e (6) e (8) TNC/TNI com EGTA.

4.2.13.2 Diálise de Equilíbrio

Com o complexo TNC/TNI formado, procedemos ao ensaio de diálise de equilíbrio como já descrito (item 4.1.5.2). Os resultados que obtivemos são compatíveis com os encontrados na literatura (Figura 24), demonstrando que o complexo formado com a TNI recombinante aumenta a afinidade da TNC por cálcio em aproximadamente uma ordem de magnitude, comportando-se de modo semelhante à Troponina I selvagem.

Figura 24: Ensaio comparativo de ligação de cálcio da TNC isolada e do complexo TNC/TNI. Caracterização da TNI recombinante quanto a sua capacidade de aumentar a afinidade da TNC por cálcio, como descrito por Potter e Gergely (1975).

4.2.13.3 Seqüenciamento da TNI recombinante

Recentemente, com a instalação do seqüenciador de proteínas em nosso departamento, pudemos, em colaboração com o Dr. Angelo Gambarini, seqüenciar o N-terminal da TNI recombinante produzida em *E.coli*. Este seqüenciamento confirmou a identidade da proteína e demonstrou que a *E.coli* remove a Met inicial de toda a preparação.

O objetivo proposto no início desta dissertação, de expressar, purificar e caracterizar a troponina I de músculo esquelético de galinha produzida em *E.coli*, foi atingido. No momento temos a capacidade de produzir e purificar em grande quantidade a TNI de galinha expressa em *E.coli* ou uma proteína de fusão contendo 18 aminoácidos no seu N-terminal. Estas proteínas recombinantes comportam-se como a troponina I selvagem nos experimentos de caracterização a que foram submetidas. Este resultado era esperado uma vez que a estrutura primária da proteína expressa é idêntica à proteína extraída de músculo, e já foi demonstrado que a TNI pode ser renaturada "in vitro" (Potter, 1982).

O trabalho que desenvolvemos nesta dissertação é essencialmente metodológico, na medida que estabelecemos um método de expressão e purificação da troponina I em *E.coli*. Para atingir este objetivo algumas dificuldades tiveram que ser superadas e os métodos que desenvolvemos para superar estas dificuldades acrescentam alguns dados ao problema da expressão em larga escala de proteínas de eucariotos em *E.coli*.

5.1 Vetores de expressão

No início do trabalho de construção do vetor de expressão para a troponina I, realizado por Jesus Aparecido Ferro, foi utilizado o vetor já em uso em nosso laboratório para a expressão em bactéria da troponina C e da tropomiosina de músculo esquelético de galinha em *E.coli* (Nagai e Thogersen, 1987; Reinach

e Karlsson, 1988). A estratégia de clonagem e expressão foi a mesma empregada para a produção da troponina C (proteína de fusão CIIFXTNC), entretanto não foi obtida expressão da troponina I como proteína de fusão. Acreditando haver algum tipo de instabilidade que inviabilizava a expressão, procurou-se contornar o problema utilizando o procedimento descrito por Nagai et al. (Nagai et al., 1988). Neste trabalho, o autor obtém altos níveis de expressão quando introduz um fragmento de Bam HI da cadeia leve da miosina (MLC; Reinach e Fischman, 1985) entre CII e seu inserto. Com a utilização deste procedimento Jesus A. Ferro obteve expressão das proteínas de fusão CIIMLCFXTNI e CIICLMFXTNI. Entretanto, ao tentar cliva-las com fator Xa para liberação do segmento TNI, havia clivagem parcial no caso de CIICLMFXTNI e digestão interna no caso de CIIMLCFXTNI. Frente a isto concluímos que a estratégia de expressão deveria ser modificada, uma vez que estávamos acrescentando 220 aminoácidos à proteína que queríamos expressar e não era possível remover este acréscimo.

Sem outra alternativa para resolver o problema de expressão da proteína usando o vetor pLCII, optamos por mudar o sistema de expressão. O sistema escolhido foi o do vetor pET que utiliza a especificidade dos promotores reconhecidos pela T7 RNA polimerase para expressar genes clonados sob o controle destes promotores (Studier et al., 1990).

Na construção do vetor de expressão utilizando pET, optamos de início pela estratégia mais rápida para verificarmos a viabilidade da expressão da proteína com o novo vetor. Partimos da

construção em M13, que havia sido feita para a construção do vetor de expressão com pLCII, e transferimos o fragmento FXTNI diretamente para o pET. Entretanto, com esta clonagem o vetor pET perde o terminador de transcrição da T7 RNA polimerase. A perda do terminador poderia significar uma baixa expressão da proteína, mas verificaríamos rapidamente a viabilidade do vetor de expressão. Com esta primeira construção obtivemos a expressão da proteína de fusão S10FXTNI. Posteriormente construímos o vetor de expressão com terminador, que também expressa a proteína de fusão em nível semelhante à primeira construção, indicando que a presença do terminador não alterou de modo drástico o nível de expressão da proteína.

Como não existem regras que antecipem o sucesso da expressão de uma determinada proteína em cada tipo de vetor, este resultado mostra que muitas vezes o sucesso da expressão da proteína depende do sistema utilizado.

O insucesso com pLCII é difícil de explicar, pois empregávamos o mesmo vetor com sucesso para expressão de outras proteínas: troponina C e tropomiosina. É difícil analisar as razões desse resultado sem uma análise detalhada da síntese de mRNA e proteína no sistema pLCII. O resultado negativo pode se dever a uma série de fatores, entre eles a instabilidade do mRNA ou da proteína ou outras diferenças entre as cepas de bactérias usadas.

O passo seguinte foi a construção do vetor de expressão a partir da metionina inicial da proteína, portanto sem fusão a S10.

Com essa construção não obtivemos expressão. Isto indica claramente que o segmento S10 garantia a expressão da proteína, na construção inicial. A razão do fragmento S10 garantir a expressão enquanto que o fragmento de CII parece não possuir esta propriedade, não é muito clara. O artigo de Chen e Inouye (1990), discute o efeito negativo no nível de expressão de proteínas em *E.coli* devido à presença de codons AGG nos primeiros vinte e cinco codons da região codificadora do gene. Ao verificarmos a sequência de nossa proteína, encontramos dois codons AGG, na oitava e nona posição. Isto explicaria o porquê da expressão da proteína de fusão e a não expressão da proteína sem fusão, uma vez que os codons AGG na oitava e nona posição do gene, na proteína de fusão seriam empurrados para 26ª e 27ª posição eliminando seu efeito negativo no nível de expressão. Verificamos que esta hipótese estava correta, pois quando substituímos os codons AGG por codons CGT no vetor da proteína sem fusão, obtivemos expressão da proteína sem fusão.

Este resultado explica a falta de expressão no vetor pET, mas não explica os resultados negativos obtidos com a proteína de fusão usando o vetor pLCII, já que o segmento CII que possui 31 aminoácidos coloca os codons AGG a uma distância ainda maior da metionina inicial. Concluimos portanto que o insucesso com a proteína de fusão no vetor pLCII tem que ser explicado através de um outro mecanismo. Como nunca conseguimos uma expressão em pLCII somente podemos especular sobre os possíveis problemas. Um possível problema com pLCII pode estar relacionado com os resultados que obtivemos quando medimos a estabilidade dos vetores de expressão que construímos usando pET. No início do trabalho com os vetores

de expressão construídos com pET, para a proteína de fusão e posteriormente sem fusão, observamos que os clones transformados com o vetor diminuíam seu nível de expressão gradativamente, conforme eram repicados. No caso do vetor da proteína de fusão diminuíam de forma lenta e na sem fusão, rapidamente. Studier et al.(1990), observa que dependendo da toxidez do gene clonado no vetor pET fica difícil a manutenção do plasmídeo na bactéria, já que existe um nível basal de indução do gene devido ao "leakage" do promotor Lac. Como alternativa, outras cepas são oferecidas pelo sistema de modo que esta indução basal seja diminuída ou mesmo suprimida, o que estabiliza o vetor. Com este procedimento obtivemos níveis de expressão iniciais maiores que os obtidos com a cepa anteriormente usada, e estes níveis eram mantidos após vários repiques.

Este resultado acrescenta um dado até então não considerado: a toxidez da troponina I à *E.coli*. Isto pode explicar o insucesso com o vetor pLCII. Se supusermos que a cepa de indução do vetor pLCII seja mais suscetível aos baixos níveis de TNI que a usada por pET, podemos imaginar que esta expressão basal criaria uma seleção negativa muito forte contra o plasmídeo, inviabilizando a expressão da proteína. Um outro dado que podemos acrescentar para reforçar esta hipótese, é o resultado obtido por Kumie Fujimori (comunicação pessoal) com a expressão da troponina T de músculo esquelético de galinha, que, de modo semelhante à troponina I, não é expressa pelo vetor pLCII, mas é expressa por pET. Esta proteína também apresenta diminuição do nível de expressão nos sucessivos

repiques, problema que foi resolvido com base em nossas observações feitas no estudo da troponina I.

Realmente não podemos afirmar que o fracasso com o vetor pLCII seja devido à toxidez da troponina I, mas esta possibilidade tem que ser levada em consideração. Uma conclusão importante desse resultado é que o insucesso em expressar proteínas de eucariotos em *E.coli* pode ser devida a vários fatores agindo em paralelo que devem que ser estudados simultaneamente.

Resumindo, podemos concluir que obtivemos dois dados relevantes no processo de desenvolvimento de um vetor de expressão para a troponina I. Em primeiro lugar, a confirmação da hipótese de Chen e Inouye (1990) sobre o papel desempenhado pelos codons AGG nos primeiros 25 codons da região traduzida do gene, que nos garantiu a expressão da troponina I a partir de sua metionina inicial. Em segundo lugar, a necessidade de atenção sobre a possibilidade da proteína que pretendemos produzir em bactéria ser tóxica, tornando o plasmídeo instável.

5.2 Caracterização das TNI recombinantes

Um segundo aspecto de nossa dissertação que merece análise é a purificação e caracterização das duas formas de TNI recombinante.

Para o desenvolvimento do método de purificação tomamos como referência os trabalhos sobre purificação da troponina e suas subunidades estabelecidos por Wilkinson (1974) e Potter (1982), como

também métodos já empregados em nosso laboratório para purificação de outras proteínas recombinantes a partir do extrato bruto de bactéria.

Inicialmente estabelecemos o método de purificação da proteína de fusão S10FXTNI. O precipitado de bactérias obtido após a indução da proteína de fusão, é ressuspendido em uma solução isotônica e a lise das bactérias é feita através de três passagens pela "French Press". Com o homogenizado resultante é feita uma centrifugação diferencial que produz o primeiro fracionamento, precipitando as proteínas insolúveis. O sobrenadante, que contém a proteína de fusão, é submetido a um novo fracionamento com sulfato de amônio, desta forma precipitando a proteína S10FXTNI. Vários fracionamentos com sulfato de amônio foram ensaiados para obtenção do melhor rendimento e optamos por um único fracionamento com 40% sulfato de amônio, já que todos os fracionamentos em concentrações inferiores 40% (concentração de precipitação de S10FXTNI), foram ineficientes na remoção das proteínas contaminantes. O precipitado do fracionamento com sulfato de amônio é ressuspendido em tampão com 8 M uréia e submetido a uma cromatografia de troca iônica em CM-celulose. A eluição da proteína de fusão S10FXTNI é feita com um gradiente de NaCl. As frações que foram reunidas, além de S10FXTNI, possuíam proteínas contaminantes o que tornou necessário um passo adicional de purificação. Obtivemos um alto grau de purificação submetendo as frações com S10FXTNI à nova cromatografia em CM-celulose nas mesmas condições iniciais da primeira cromatografia, na qual introduzimos uma lavagem inicial com 50 mM NaCl e reduzimos o perfil do gradiente de NaCl para 50-300 mM.

Para a purificação da TNI recombinante foram necessárias algumas modificações no método estabelecido para S10FXTNI, o que mostra que algumas características bioquímicas desta proteína foram alteradas pela remoção do S10. Primeiramente, na expressão da TNI, não utilizamos a mesma cepa que para S10FXTNI. A cepa de expressão de TNI produz lisozima de T7 nas bactérias, o que inicia o processo de lise quando o precipitado é ressuspensionado, tornando desnecessário o uso de um tampão de ressuspensão isotônico. Foi mantida a lise na "French Press" para uma melhor homogenização do lisado de bactérias. A segunda modificação introduzida também foi feita no tampão de ressuspensão, com a adição de 10 mM β -mercaptoetanol. Isto foi necessário porque quando era feita a centrifugação diferencial, a proteína dividia-se em partes iguais entre o sobrenadante e o precipitado. Com a adição do β -mercaptoetanol no tampão, como descrito por Wilkinson (1974), a TNI fica no precipitado, o que simplifica muito a purificação tornando desnecessário o passo de fracionamento com sulfato de amônio. Como a TNI está pouco contaminada com as outras proteínas da bactéria no precipitado da centrifugação, obtivemos um alto grau de purificação submetendo a amostra a somente uma cromatografia em CM-celulose a 8 M uréia, eluída com um gradiente de NaCl.

O dado importante que obtivemos durante o estabelecimento do método de purificação das duas proteínas recombinantes, esta no comportamento em solução dessas proteínas. Enquanto a proteína de fusão S10FXTNI permanece solúvel, a TNI dividia-se em partes iguais entre sobrenadante e precipitado. Com a adição de β -mercaptoetanol, a TNI precipita após a lise das bactérias. Se

supomos que a diferença entre as duas proteínas está apenas na sua sequência primária, então a diferença de solubilidade se deve ao segmento S10FX. Esta hipótese é fortalecida pelo comportamento das duas proteínas em solução após a purificação: enquanto a S10FXTNI permanece em solução a 300 mM NaCl a TNI só permanece em solução em 1 M NaCl. Entretanto estas diferenças parecem não interferir no comportamento da proteína de fusão nos ensaios de caracterização.

No primeiro ensaio de caracterização verificamos que as proteínas recombinantes, TNI e S10FXTNI, apresentavam a alta afinidade da troponina I selvagem pela troponina C, mesmo em geis de 6 M uréia na presença de cálcio, como descrito por Head e Perry (1974). Promovemos a formação dos complexos S10FXTNI/TNC e TNI/TNC e verificamos sua estabilidade na presença de cálcio e como estes complexos eram desfeitos na ausência de cálcio em 6 M uréia. O comportamento de ambas proteínas foi o mesmo que o descrito na literatura, o que indica que a TNI recombinante e a S10FXTNI apresentam comportamento semelhante a troponina I selvagem.

O ensaio seguinte foi a verificação da capacidade da proteína de fusão S10FXTNI em aumentar a afinidade por cálcio da TNC em uma ordem de magnitude (Potter e Gergely, 1975). Em experimento de diálise de equilíbrio verificamos que a proteína de fusão apresenta comportamento semelhante à troponina I selvagem, aumentando a afinidade por cálcio da TNC. Um detalhe do experimento de diálise de equilíbrio merece ser mencionado: o fato da TNC isolada ligar até 5 moles de cálcio, enquanto o complexo satura em 4 moles. Não só neste experimento, mas também em outros experimentos

de diálise de equilíbrio realizados, em nosso laboratório, a TNC isolada liga mais de 4 moles de cálcio. Como a TNC possui somente quatro sítios de cálcio, deveria saturar em 4 moles. Com o experimento com o complexo obtivemos a saturação com 4 moles como o esperado, o que indica a possibilidade de haver algum tipo de ligação inespecífica de cálcio à TNC isolada em altas concentrações de cálcio, devido ao caráter ácido da TNC. A formação do complexo impediria esta ligação inespecífica. Acreditamos que este aspecto merece um estudo mais cuidadoso no futuro.

Dentre os resultados que demonstram a semelhança de comportamento das proteínas recombinantes à troponina I selvagem, devemos atentar para alguns detalhes que demonstram um possível efeito do segmento S10FX. Observamos a capacidade do fragmento S10 tornar a proteína de fusão mais solúvel que a TNI, que tem o comportamento em solução semelhante à troponina I selvagem. Como a troponina I selvagem possui o N-terminal bloqueado (acetilado) enquanto que as proteínas recombinantes não têm o N-terminal bloqueado, esta diferença poderia conferir às proteínas recombinantes um comportamento diferente da selvagem. Nos ensaios de caracterização não encontramos diferenças, o que indica que tanto a presença do segmento S10FX como a ausência de acetilação na TNI, não interferiram na estabilidade do complexo com a TNC na presença de cálcio, bem como no aumento de afinidade da TNC por cálcio quando em complexo.

A análise do papel desempenhado pelo N-terminal da TNI e outras questões sobre a interação de várias regiões da TNI com

os outros componentes do sistema regulatório podem agora ser estudadas em detalhe, uma vez que temos a capacidade de expressar e purificar esta proteína. Com o vetor de expressão para troponina I operacional, e com a purificação e caracterização inicial da TNI recombinante terminada, estas questões poderão ser abordadas através da construção de mutantes sítio-dirigidos. Com estas novas possibilidades experimentais esperamos elucidar alguns aspectos do funcionamento do sistema regulatório da contração muscular.

BIBLIOGRAFIA

Campbell, J.L., Richardson, C.C. and Studier, F.W. Genetic recombination and complementation between Bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 75:2276, 1978.

Carter, P. Improved Oligonucleotide-Direct Mutagenesis Using M13 Vectors. *Meth.Enzymol.* 154:382-403, 1987.

Chen, G.-F.T. and Inouye, M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res.* 18:1465-1473, 1990.

Chong, P.C.S. and Hodges, R.S. Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin and α -tropomyosin: attachment of the photoaffinity probe N-(4-azidobenzoyl-[2-3H]GLYCYL)-S-(2-thiopyridyl)-cysteine to cysteine 190 of α -tropomyosin. *J.Biol.Chem.* 257:9152-9160, 1982.

Ebashi, S., Ohnishi, S., Maruyama, K. and Fujii, T. . *Proc.Febs Meet.9th* 71-83, 1974.

Ebashi, S., Ohtsuki, I. and Mihashi, K. Regulatory Proteins of Muscle with Special Reference to Troponin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37:215-224, 1973.

Fabiato, A. and Fabiato, F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J.Physiol.(Paris)* 75:463-505, 1979.

Grabarek, Z., Drabikowski, W., Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S. and Gergely, J. Proteolytic Fragments of Troponin C. *J.Biol.Chem.* 256:13121-13127, 1981.

Grand, R.J.A., Levine, B.A. and Perry, S.V. Proton-magnetic-resonance studies on the interaction of rabbit skeletal-muscle troponin I with troponin C and action. *Biochem.J.* 203:61-68, 1982.

Hanahan, D. Techniques for Transformation of E.coli. In: *DNA Cloning volume I: A Pratical Approach*, edited by Glover, D.M. Oxford: IRL Press, 1985, p. 109-135.

Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry* 48:422-427, 1972.

Head, J.F. and Perry, S.V. The Interaction of the Calcium-Binding Protein (Troponina C) with Bivalent Cations and the Inhibitory Protein (Troponina I). *Biochem.J.* 137:145-154, 1974.

Hitchcock, S.E. Cross-linking of troponin with dimethylimido esters. *Biochemistry* 14:5162-5167, 1975.

Hitchcock-De Gregori, S.E. Study of the Structure of Troponin I by measuring the relatives of Lysines with Acetic Anhydride. *J.Biol.Chem.* 257:7372-7380, 1982.

Horwitz, J., Bullard, B. and Mercola, D. Interaction of Troponin Subunits. *J.Biol.Chem.* 254:350-355, 1979.

Katayama, E. Interaction of Troponin I with Troponin T and Its Fragments. *J.Biochem.* 85:1379-1381, 1979.

Katayama, E. . In: *Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms*, edited by Ebashi, S. Tokyo/Springer-Verlag, Berlin and New York: Japan Sci. Soc. Press, 1980, p. 251-258.

Katayama, E. and Nozaki, S. Ca²⁺- dependent binding of synthetic peptides corresponding to some regions of troponin-I to troponin-C. *J.Biochem.* 91:1449-1452, 1982.

Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H-J. Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of E.coli. *Cell* 38:879-887, 1984.

Leavis, P.C. and Gergely, J. Thin Filament Proteins and Thin Filament-Linked Regulation of Vertebrate Muscle Contraction. *CRC Crit.Rev.Biochem.* 16:235-305, 1982.

Leszyk, J., Collins, J.H., Leavis, P.C. and Tao, T. Cross-linking of rabbit skeletal muscle troponin with the photoactive reagent 4-maleimidobenzophenone: identification of residues in troponin I that are close to cysteine-98 of troponin C. *Biochemistry* 26:7042-7047, 1987.

Leszyk, J., Grabarek, Z., Gergely, J. and Collins, J.H. Characterization of zero-length cross-links between rabbit skeletal muscle troponin C and troponin I: Evidence for direct interaction between the inhibitory region of troponin I and the NH₂-terminal, regulatory domain of troponin C. *Biochemistry* 29:299-304, 1990.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. Ed. 2nd

Moir, A.J.G., Ordidge, M., Grand, R.J.A., Trayer, I.P. and Perry, S.V. Characterization of Region of the Primary Sequence of Troponin C involved in Calcium Ion-Dependent interaction with Troponin I. *Biochem.J.* 173:449-457, 1978.

Nagai, K., Nakaseko, Y., Nasmyth, K. and Rhodes, D. Zinc-finger motifs expressed in E.coli and folded in vitro direct specific binding to DNA. *Nature* 332:284-286, 1988.

Nagai, K. and Thogersen, H.C. Synthesis and Sequence-Specific Proteolysis of Hybrid Proteins Produced in E.coli. *Meth.Enzymol.* 143:461-481, 1987.

Ohnishi, S.-I., Maruyama, K. and Ebashi, S. Calcium-induced conformational changes and mutual interactions of troponin components as studied by spin labeling. *J.Biochem.* 78:73-81, 1975.

Ohtsuki, I., Maruyama, K. and Ebashi, S. Regulatory and Cytoskeletal Proteins of Vertebrate Skeletal Muscle. *Adv.Prot.Chem.* 38:1-67, 1986.

Ozaki, L.S. and Cseko, Y.M.T. Genomic DNA Cloning and Related Techniques. In: *Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual*, edited by Morel, C.M. Rio de Janeiro: UNDP/WORLD BANK/WHO & Fundação Oswaldo Cruz, 1984, p. 165-185.

Perry, S.V., Head, J.F. and Wilson, F.J. Localization and Mode of Action of the Inhibitory Protein Component of the Troponin Complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37:251-262, 1973.

Potter, J.D. Preparation of troponin and its subunits. *Meth.Enzymol.* 85:241-264, 1982.

Potter, J.D. and Gergely, J. Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺. Regulation of muscle contraction. *Biochemistry* 13:2697-2703, 1974.

Potter, J.D. and Gergely, J. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar ATPase. *J.Biol.Chem.* 250:4628-4633, 1975.

Potter, J.D., Strang-Brown, P., Walker, P.L. and Iida, S. Ca^{2+} Binding to Calmodulin. *Meth.Enzymol.* 102:135-143, 1983.

Reinach, F.C. and Fischman, D.A. Recombinant DNA approach for defining the primary structure of monoclonal antibody epitopes. The analysis of a conformational-specific antibody to myosin light chain two. *J.Mol.Biol.* 181:411-422, 1985.

Reinach, F.C. and Karlsson, R. Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C. *J.Biol.Chem.* 263:2371-2376, 1988.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)* 74:5463-5467, 1977.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth.Enzymol.* 185:60-89, 1990.

Syska, H., Wilkinson, J.M., Grand, R.J.A. and Perry, S.V. The Relationship between Biological Activity and Primary Structure of Troponin I from White Skeletal Muscle of the Rabbit. *Biochem.J.* 153:375-387, 1976.

Talbot, J.A. and Hodges, R.S. Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. *J.Biol.Chem.* 256:2798-2802, 1981.

Tanokura, M. and Ohtsuki, I. Location of Troponin I binding on Troponin T Sequence. *FEBS Lett.* 145:147-149, 1982.

Waye, M.m.Y., Verhoeyen, M.E., Jones, P.T. and Winter, G. Ecol selection vectors for shotgun cloning into M13 and selection mutagenesis. *Nucleic Acids Research* 13:8561-8571, 1985.

Weeks, R.A. and Perry, S.V. Characterization of a region of the primary sequence of troponin C involved in calcium ion-dependent interaction with troponin I. *Biochem.J.* 173:449-457, 1978.

Wilkinson, J.M. The preparation and properties of the components of troponin B. *BBA* 359:379-388, 1974.

Wilkinson, J.M. and Grand, R.J.A. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 271:31-35, 1978.

Wilkinson, J.M. and Grand, R.J.A. The amino acid sequence of troponin I from rabbit skeletal muscle. *Biochem.J.* 149:493-496, 1975.

Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119, 1985.

Zoller, M.J. and Smith, M. Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA. *Nucleic Acids Research* 10:6487-6500, 1982.