UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

A LIGAÇÃO DE CÁLCIO À TROPONINA C ANALISADA POR
DIÁLISE DE FLUXO E POR ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA

FERNANDO FORTES DE VALENCIA

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

Orientador: Dr. Fernando de Castro Reinach

São Paulo, 22 de outubro de 2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Valencia, Fernando Fortes de
V152L A ligação de cálcio à troponina C analisada por diálise de
fluxo e por espectroscopia de fluorescência / Fernando
Fortes de Valencia. -- São Paulo, 2001.
99p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Reinach, Fernando de Castro

"Acompanha esta obra um CD-ROM"

I. Biofísica 2. Proteína : Estrutura : Bioquímica 1. T.
II. Reinach, Fernando de Castro, orientador.

574.191 CDD

***“A Ligação de Cálcio à Troponina C
Analisada por Diálise de Fluxo e por
Espectroscopia de Fluorescência”***

**FERNANDO FORTES DE
VALENCIA**

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.*

Aprovada por:

Prof. Dr. FERNANDO DE CASTRO REINACH
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. SHIRLEY SCHREIER
IQ – USP

Profa. Dra. BIANCA SILVANA ZINGALES
IQ – USP

Profa. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB – USP

Prof. Dr. ARMANDO MORAES VENTURA
IB – USP

**SÃO PAULO
22 DE OUTUBRO 2001.**

ao José Fortes (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Fernanda, Emanuella e Gabriel, por todo o amor que recebo.

Aos meus pais Carmélia e Ruben, a minha irmã Simone, aos meus sobrinhos Helena e César, pela maravilhosa família brasileira e portuguesa.

Ao meu amigo Deodoro, por nesses cinco anos de convívio ter me ensinado mais sobre a vida do que haviam ensinado meus trinta anos anteriores - e que é para mim um presente de Deus.

Ao Fernando Reinach, pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Chuck Farah, pela atenção, discussões e sugestões.

Ao Bayardo, por me mostrar um modo honesto de ser professor e por tantas vezes ter me acolhido em sua casa.

A todos que fizeram e fazem do *Reinalab* e do *Chucklab* lugares onde se aprende muito, sempre com muita diversão: Kumiê, Catarina, Martin, Patrícia, Carlão, Ricardo, Tharin, Dani Oliveira, Dani Costa, Ivan, Erik, Áurea, Vadim, Guilherme, Gabriel, Vivi, Seu Zé Lino, Reinaldinho, Ildinha, Isaura, Rosane, Cássia, Elaine, Adriana, Luís, Marcos, Sandro, Dona Neusa, Stephano, Jean, Leandro e Marcelo.

Ao professor Ronaldo Bento Quaggio pela construção da cepa auxotrófica de *E. coli* e pela agradabilíssima companhia.

À professora Ana Cláudia Rasera da Silva pelos mutantes D30A e D66A.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumo.....	3
Summary	5
Introdução	7
Aspectos gerais da contração do músculo esquelético	7
A estrutura da TnC: os sítios para ligação de cálcio e as diferenças de função entre eles	13
Os detalhes da ligação de Ca^{2+} ao domínio N terminal da sTnC.....	19
O mutante F29W e a cooperatividade entre os sítios I e II.....	22
Objetivos	25
Materiais e Métodos	27
Construção dos mutantes de sTnC	27
Produção da sTnC e de seus mutantes.....	27
Estimativa de incorporação dos análogos à F29HW e F29ZW	29
Ligação de Ca^{2+} à sTnC e aos mutantes determinada por diálise de fluxo.....	31
Ligação de Ca^{2+} às F29's e F29's/D30A monitorada por fluorescência.....	33
Resultados	37
Incorporação dos análogos de triptofano aos mutantes F29HW e F29ZW.....	37
Fig. 21. Espectros de absorção do triptofano, 5-hidroxitriptofano, 7-aza- triptofano, sTnC e dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW	39
Fig. 22. Espectros de excitação e emissão do triptofano, 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano e espectros de emissão e excitação dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW , com e sem Ca^{2+}	40
Ligação de cálcio à sTnc e aos mutantes D/A, F29's e F29'sD/A.....	41
Fig. 23. Ligação de Ca^{2+} à sTnC e aos mutantes F29's. Medições de diálise de fluxo e/ou de fluorescência.....	44
Fig. 24. Ligação de Ca^{2+} aos mutantes D/A determinada por diálise de fluxo.....	47

Fig. 25. Variação de fluorescência causada pela ligação de Ca^{2+} aos mutantes F29's/D30A e titulação de Ca^{2+} comparando o nível de saturação de cada mutante com a variação de fluorescência.....	49
Fig. 26. Ligação de Ca^{2+} medida por diálise de fluxo e acompanhada por fluorescência para os mutantes D30A e F29'sD30A e comparação da ligação de Ca^{2+} seguida por fluorescência entre os mutantes F29's e os mutantes F29'sD30A.....	52
Tabela 3. Número de sítios, constantes aparentes de dissociação e coeficientes de Hill para a sTnC e seus mutantes, medidos por diálise de fluxo.....	53
Tabela 4. Constantes aparentes de dissociação e coeficientes de Hill para os mutantes F29W, F29HW e F29ZW e respectivos mutantes D30A's medidos por fluorescência.....	54
Discussão	55
Porque o mutante F29W apresenta afinidade maior que a da sTnC	58
Porque o mutante F29HW apresenta afinidade próxima à da sTnC	60
Porque o mutante F29ZW apresenta afinidade intermediária, entre a da sTnC e a da F29W.....	61
Porque a mutação Asp→Ala na posição 30 não afeta a ligação do Ca^{2+} ao sítio II.....	62
Porque a mutação na posição 29 se torna silenciosa quando o sítio I está inativo.....	65
Porque a mutação Asp→Ala na posição 66 impede a ligação de Ca^{2+} aos sítios II e I.....	66
Porque não se detectam nem a diferença de afinidade nem a cooperatividade entre os sítios I e II através de técnicas diretas.....	69
O que os dados de fluorescência indicam.....	75
Podem-se simular também os dados de diálise de fluxo	78
Conclusões.....	79
Bibliografia	83
Curriculum Vitae	93

ABREVIATURAS

W,	triptofano
5-<u>H</u>W,	5-hidróxitriptofano
7-<u>Z</u>W,	7-azatriptofano
sTnC,	troponina C recombinante de músculo esquelético de galinha
TnI,	troponina I
TnT,	troponina T
F29W,	um mutante da sTnC no qual a fenilalanina da posição 29 foi substituída por triptofano
F29<u>H</u>W ,	um mutante da sTnC no qual a fenilalanina da posição 29 foi substituída por 5-hidróxitriptofano
F29<u>Z</u>W ,	um mutante da sTnC no qual a fenilalanina da posição 29 foi substituída por 7-azatriptofano
D30A,	um mutante da sTnC no qual o aspartato da posição 30 foi substituído por alanina
D66A,	um mutante da sTnC no qual o aspartato da posição 66 foi substituído por alanina
D30A/D66A,	um mutante da sTnC no qual o aspartato da posição 30 e o aspartato da posição 66 foram substituídos por alanina. Quando D30A, D66A ou D30A/D66A seguem as abreviações F29W, F29 <u>H</u> W e F29 <u>Z</u> W , a notação se refere ao mutante duplo (ex.: F29 <u>H</u> W/D30A) ou triplo (ex.: F29 <u>Z</u> W/D30A/D66A) da sTnC.
D/A,	qualquer proteína com fenilalanina na posição 29 e pelo menos uma substituição de aspartato por alanina
F29's,	qualquer mutante único no qual a fenilalanina da posição 29 foi substituída por triptofano, 5-hidróxitriptofano ou 7-azatriptofano

F29'sD/A,	qualquer mutante duplo ou triplo com triptofano ou um análogo de triptofano na posição 29 e pelo menos uma substituição de aspartato por alanina
sítios N,	sítios para ligação de Ca^{2+} localizados no domínio amino terminal da TnC; também referidos como sítios regulatórios ou Ca^{2+} -específicos ou sítios I e II
sítios C,	sítios para ligação de Ca^{2+} localizados no domínio carbóxi terminal da TnC; também referidos como sítios estruturais ou sítios Ca^{2+} / Mg^{2+} ou sítios III e IV
pCa_{1/2} ,	valor na escala de pCa correspondente a 50% da transição máxima associada

RESUMO

A troponina C é o componente do complexo heterotrimérico troponina ao qual o Ca^{2+} se associa. Essa associação torna a contração muscular um processo regulado por Ca^{2+} . Pearlstone et al. (*Biochemistry* 31, 6545, (1992)) utilizaram o cDNA da troponina C de músculo esquelético de galinha (sTnC) para contruir um mutante onde a fenilalanina da posição 29 foi substituída por triptofano (mutante F29W). Esse mutante permitiu que a ligação de Ca^{2+} aos sítios regulatórios amino terminais fosse acompanhada através de técnicas fluorescentes. Entretanto, algumas propriedades da sTnC foram alteradas pela mutação (Li et al. (1995) *Biochemistry* 34, 8330). No presente estudo, ensaios de ligação direta de Ca^{2+} bem como titulações de Ca^{2+} seguidas por fluorescência foram usadas para melhor se entenderem os efeitos da mutação Phe→Trp na posição 29 bem como a influência de certos aminoácidos componentes do sítio de ligação de Ca^{2+} nas propriedades do domínio regulatório. Dois novos mutantes foram construídos nos quais os análogos do triptofano 5-hidroxitriptofano ou 7-azatriptofano foram introduzidos na posição 29 (resultando nos mutantes F29HW e F29ZW, respectivamente). Os dados mostraram que, quando comparada com a sTnC, a afinidade por Ca^{2+} dos sítios amino terminais foi elevada na F29W em aproximadamente seis vezes, três vezes na F29ZW e levemente diminuída na F29HW. A curva de fluorescência associada à ligação de Ca^{2+} à F29ZW mostrou-se bimodal, com cada fase podendo ser relacionada à ligação de Ca^{2+} a cada um dos sítios regulatórios. Esta é a primeira descrição através de técnicas de fluorescência da ligação sequencial de Ca^{2+} aos sítios amino terminais. Para investigar a influência de cada um dos sítios amino terminais nas propriedades de ligação ao Ca^{2+} ou propriedades fluorescentes da sTnC, F29W, F29HW e F29ZW, construímos mutantes duplos e triplos através da substituição do aspartato da posição 30 ou 66 (ou ambos) por alanina. Essas mutações afetam respectivamente a capacidade de ligação ao Ca^{2+} dos sítios I e II. Os dados mostraram que: 1) nas concentrações de Ca^{2+} analisadas, a mutação Asp→Ala na posição 30 impede

somente a ligação de Ca^{2+} ao sítio I, enquanto a mutação Asp $\rightarrow$ Ala na posição 66 impede a ligação de Ca^{2+} aos sítios I e II, e 2) a mutação Asp $\rightarrow$ Ala na posição 30 torna silenciosa a substituição da fenilalanina da posição 29 por Trp, 5-hidroxitriptofano ou 7-azatriptofano. Concluimos que o sítio I é essencialmente inativo sem a ligação prévia de Ca^{2+} ao sítio II e que a posição 29 influencia a afinidade ao Ca^{2+} do sítio I "ajustado".

SUMMARY

Troponin C is the Ca^{2+} binding component of heterotrimeric troponin. It makes skeletal muscle contraction a Ca^{2+} regulated process. We have previously used the cDNA of chicken skeletal TnC (sTnC) to construct a mutant where phenylalanine at position 29 was replaced by tryptophan (F29W mutant) [Pearlstone *et al.* (1992) *Biochemistry* 31, 6545]. This mutant allowed calcium binding to the regulatory amino terminal sites to be followed through fluorescence techniques, but altered some properties of sTnC [Li *et al.* (1995) *Biochemistry* 34, 8330]. In the present study, direct calcium binding assays and fluorescence followed calcium titrations were used to better understand the effects of the Phe→Trp mutation at position 29 as well as the influence of each amino site on the calcium binding properties of the regulatory domain. Two new mutants were constructed in which the tryptophan analogs 5-hydroxytryptophan or 7-azatryptophan were introduced at position 29 (resulting in F29HW and F29ZW mutants, respectively). The data showed that when compared to sTnC, the Ca^{2+} affinity of amino sites was increased sixfold in F29W, nearly threefold in F29ZW and slightly decreased in F29HW. The F29ZW fluorescence followed Ca^{2+} titration displayed a bimodal curve that could be related to Ca^{2+} binding to each of the amino sites. This is the first report of fluorescence detection of the sequential Ca^{2+} binding to the regulatory sites. To investigate the influence of each amino site in the calcium binding or fluorescence properties of sTnC, F29W, F29HW and F29ZW, we have constructed double and triple mutants by replacing aspartate at position 30 or 66 (or both) by alanine. These mutations affect respectively the binding capacity of sites I and II. The data showed that: 1) in the calcium concentration range analyzed, the Asp→Ala mutation at position 30 impairs calcium binding to site I only, while Asp→Ala mutation at position 66 impairs calcium binding to both sites I and II, and 2) the Asp→Ala mutation at position 30 makes silent the replacement of Phe at position 29 by Trp, 5-hydroxytryptophan or 7-

azatryptophan. We conclude that site I is essentially defunct without previous binding to site II and that position 29 influences the affinity of this “adjusted” site I.

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da contração do músculo esquelético

A contração do músculo esquelético é resultado do encurtamento da célula muscular esquelética. O citoplasma da célula muscular esquelética é organizado em feixes longitudinais chamados de miofibrilas com um padrão típico de bandas transversais claras (bandas I) e escuras (bandas A) ([figura 1](#)). Cada miofibrila tem como unidade funcional o sarcômero. Ali os eventos responsáveis pelo movimento se evidenciam ao nível molecular. O sarcômero é uma estrutura macromolecular cujo arcabouço é construído por múltímeros proteicos filamentosos classificados em filamentos grossos e finos ([figura 2](#)). Tais filamentos são agregados orientados de várias proteínas. O principal componente do

figura 1 A célula muscular esquelética

<http://www.udel.edu/Biology/Wags/histopage/empage/em/em9.gif>

figura 2 Sarcômero, a unidade funcional da célula muscular esquelética

<http://people.ne.mediaone.net/jkimball/BiologyPages/M/Muscles.html>

filamento grosso é a miosina. Os filamentos finos são compostos por actina, à qual se associam as proteínas tropomiosina e troponina. Essas quatro proteínas são os agentes principais da contração; das suas propriedades vêm as características básicas de todo o processo de contração (para revisão consultar Gordon et al., 2000).

A diminuição da extensão do sarcômero leva à diminuição da extensão da célula muscular. Por sua vez a diminuição do sarcômero é resultado da interpenetração dos filamentos finos e grossos, com consequente aproximação das linhas Z e diminuição da extensão da banda I ([figura 3](#)).

http://npbsn41.nimr.mrc.ac.uk/protocol_html/maf_home.html

figura 3 Sarcômero em diferentes estágios de contração

O processo de interpenetração de filamentos grossos e finos é promovido pelos domínios globulares da miosina. A miosina é uma molécula dimérica ([figura 4](#)) dividida em domínios globular e filamentosos. Seus domínios globulares se projetam do filamento grosso em direção ao filamento fino. ([figura 5](#)) e são ATPases dependentes de actina ([figura 6](#)). Quando em associação favorável à actina, a miosina é capaz de catalisar a hidrólise do ATP e acoplar a energia liberada a um movimento pendular coerente do domínio globular em direção à linha Z. A contração muscular envolve a associação/separação (ou associação forte/associação fraca) cíclica entre o domínio globular da miosina e a actina do filamento fino (Huxley, 1998). A geração da força é resultado de o movimento pendular do domínio globular da miosina ocorrer em um dos sentidos quando a associação com a actina é forte. O movimento pendular no outro sentido é independente da actina e ocorre quando a associação com a actina é fraca. Há desse modo uma seleção dos movimentos pendulares que resultarão em força: apenas aqueles em direção à linha Z terão “ponto de apoio” (o filamento fino) e portanto somente esses serão traduzidos em tendência de interpenetração dos filamentos (sumarizado em

<http://130.219.172.134/mcbaca.html>

figura 4 Modelo da miosina baseado em microscopia eletrônica, ressaltando a estrutura dimérica e os domínios globulares e filamentosos.

figura 5 Esquema da associação entre domínio globular da miosina e filamento de actina.

http://npbsn41.nimr.mrc.ac.uk/protocol_html/maf_home.html

http://npbsn41.nimr.mrc.ac.uk/protocol_html/maf_home.html

figura 6 Estrutura do domínio globular da miosina. ELC e RLC significam respectivamente cadeia leve essencial e cadeia leve regulatória.

Myosins <http://www.bio.uk.ac.uk/Egeevs/research/myo.htm> e Ina

Taha <http://oase.mpimf-heidelberg.mpg.de/~ina/first.html> .

Proteínas acessórias estão envolvidas na manutenção da estrutura do sarcômero. As regiões de junção entre diferentes sarcômeros, chamadas de linhas Z, são compostas pelas proteínas desmina e α -actinina. Os filamentos grossos e a linha M são ligados às linhas Z pela proteína titina, que juntamente com a nebulina, associada aos filamentos finos, conferem elasticidade e resistência adicionais e definem o grau de polimerização, ou a extensão dos filamentos grossos e finos (figura 7).

A regulação da contração do músculo esquelético se dá por modificações estruturais do filamento fino. Os principais componentes regulatórios do filamento fino são a actina, a

tropomiosina e a troponina. A actina é uma proteína globular de aproximadamente 42 kD no estado monomérico (actina-G) capaz de se polimerizar em filamentos duplos que adotam aproximadamente a estrutura helicoidal (figura 8, modificado de De La Cruz et al., 2000). Ao longo desse filamento se associam moléculas de tropomiosina. A tropomiosina é uma proteína de aproximadamente 280 resíduos que apresenta estrutura dimérica em “coiled-coil”. Ela se liga à actina-F, acompanhando uma das faces do filamento duplo e estabelece contato com 7 moléculas de actina. As extremidades amino e carboxi terminal de moléculas adjacentes de tropomiosina também fazem contato entre si (interação cabeça/cauda). No terço final (porção carbóxi terminal) da tropomiosina, se associa o complexo trimérico troponina (figura 9). A troponina é composta por três proteínas: troponina T (TnT), troponina I (TnI) e troponina C (TnC) de massas moleculares respectivamente 31, 21 e 18 kDal. A TnT está envolvida com a associação da troponina ao filamento fino. A TnI inibe a atividade estimulatória da actina sobre a ATPase da miosina, através de uma região chamada peptídeo inibitório. A TnC se liga ao cálcio e reverte a inibição da TnI, tornando o processo de contração muscular um evento Ca^{2+} -

figura 8 Microscopia eletrônica (a) e modelos da actina polimerizada (b, c), actina-F. As barras indicam 20, 2,5 e 0,5 nm respectivamente em a, b e c.

figura 9 Modelo do filamento fino (modificado de Gordon et al., 2000).

dependente. A ligação do Ca^{2+} à TnC provoca modificações estruturais que são transferidas para os outros componentes da troponina e para a tropomiosina. Como resultado, a tropomiosina movimenta-se da face externa do filamento da actina para o sulco da região de contato entre os dois semi-filamentos. Expõem-se então os sítios da actina (ou modificam-se suas propriedades) o que permite a associação forte com o domínio globular da miosina e a geração da força contrátil (figura 10) (Farah & Reinach, 1995; Gordon et al., 2000).

Das três subunidades da troponina, apenas a TnC tem a estrutura tridimensional já determinada e vários estudos esclareceram importantes aspectos das modificações estruturais que a ligação do Ca^{2+} provoca. O

figura 10 Modelo das modificações estruturais do filamento fino resultantes da ligação do Ca^{2+} . Destacam-se os domínios carbóxi (C) e amino (N) terminais da TnC. Na TnI, além desses, destaca-se o peptídeo inibitório (I) (Farah & Reinach, 1995).

presente trabalho analisa algumas características da ligação do Ca^{2+} à TnC. Nas seções seguintes será dada atenção às propriedades gerais da TnC e das alterações de estrutura provocadas pela ligação do Ca^{2+} .

...

A estrutura da TnC: os sítios para ligação de cálcio e as diferenças de função entre eles

A TnC tem cerca de 160 resíduos. Na estrutura determinada por cristalografia de raios X (Herzberg & James, 1985), a TnC apresenta uma forma de haltéres (figura 11) com dois domínios globulares (amino e carbóxi) separados por uma α -hélice de 9 voltas que vai do resíduo 75 ao 107, aproximadamente. A determinação por RMN da estrutura da TnC mostrou que a hélice separadora (D/E) não se apresenta rígida e permite várias disposições relativas entre os domínios amino e carbóxi (Slupsky & Sykes, 1995) (figura 12). No músculo esquelético de contração rápida é expressa uma isoforma (sTnC) de características distintas em alguns aspectos da isoforma expressa no músculo cardíaco (cTnC) ou esquelético de contração lenta*. Na sTnC fazem parte do domínio amino terminal quatro segmentos em α -hélice mais uma parte da α -hélice separadora. Tais hélices do domínio amino são designadas, a partir da extremidade amino terminal, de hélices N, A, B, C e D,

figura 11 A estrutura da TnC determinada por cristalografia de raios X, destacando-se os domínios globulares amino e carbóxi.[§]

figura 12 Estrutura de 6 modelos (de um total de 23) da sTnC determinados por RMN. Os domínios C (em azul escuro) estão sobrepostos. Os domínios N estão em vermelho e a hélice separadora (D/E) está em amarelo. O ponto de mobilidade da hélice separadora se localiza numa sequência de três glutamatos, Glu95, Glu96 e Glu97. O Glu96 está destacado em azul claro.

* <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/muscle/index.htm>

§ As referências relativas às estruturas cristalográficas ou de RMN utilizadas nas figuras estão no final da bibliografia.

figura 13 A estrutura da sTnC destacando-se os segmentos em α -hélice. A hélice N em amarelo, A em roxo, B em verde, D em laranja, E em preto, F em verde claro, G em branco e H em laranja.

figura 14 Estrutura de um "EF-hand". Esse padrão hélice-alça-hélice capaz de ligar Ca^{2+} foi pela primeira vez identificado na parvalbumina, compondo-se da alça entre a quinta e a sexta hélice, ou hélices E e F. Daí o termo "EF".

* http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/

sendo que esta última é a porção amino da hélice separadora. No domínio carboxi terminal encontram-se a parte carboxi da α -hélice separadora, denominada de hélice E, e mais três segmentos em α -hélice, denominados F, G e H (figura 13) (a cTnC não apresenta a hélice N, mas mantém o restante dessa organização em hélices).

Excetuando-se a hélice N, as outras compõem sítios capazes de ligar Ca^{2+} . Todos os sítios obedecem ao padrão "EF-hand*" (figura 14), identificado pela primeira vez por Kretsinger & Nockolds (1973). Na estrutura "EF-hand" típica o sítio para ligação do metal é composto por 6 resíduos de uma alça de 12 resíduos localizada entre dois segmentos em α -hélice. Os seis resíduos são denominados X, Y, Z, -Y, -X e -Z e ocupam respectivamente as posições 1, 3, 5, 7, 9 e 12, na alça de 12 resíduos. Na sTnC as hélices A e B flanqueiam o sítio I, as hélices C e D flanqueiam o sítio II, as hélices E e F o sítio III e as hélices G e H o sítio IV. Na tabela 1 estão as posições absolutas dos resíduos ligantes do metal em cada um dos quatro sítios da sTnC recombinante de galinha. A sTnC e a cTnC diferem com relação ao número de sítios ligantes de metal. A cTnC apresenta o sítio I não funcional devido a uma inserção de uma valina na posição 28 e às substituições do aspartato da posição 30 por

Tabela 1: posições absolutas dos resíduos dos sítios para ligação de metal da sTnC

		X(1)	Y(3)	Z(5)	-Y(7)	-X(9)	-Z(12)
domínio N	sítio I	Asp 30	Asp 32	Gly 34	Asp 36	Ser 38	Glu 41
	sítio II	Asp 66	Asp 68	Ser 70	Thr 72	Asp 74	Glu 77
domínio C	sítio III	Asp 106	Asn 108	Asn 110	Phe 112	Asp 114	Glu 117
	sítio IV	Asp 142	Asn 144	Asp 146	Arg 148	Asp 150	Glu 153

leucina e do aspartato da posição 32 por alanina. A cTnC é capaz, portanto, de se ligar a apenas três átomos de metal: dois no domínio carboxi (sítios III e IV) e um no domínio amino (sítio II). Nas figuras 15 e 16 está destacada a estrutura do sítio II da sTnC ressaltando o padrão “EF-hand” e os átomos envolvidos na coordenação do Ca^{2+} . O átomo de Ca^{2+} se associa a sete átomos de oxigênio, numa geometria chamada de pentagonal bipiramidal, pois ao se unirem todos os átomos de oxigênio que coordenam o átomo de Ca^{2+} forma-se algo parecido a uma pirâmide dupla com base comum pentagonal. Dos sete átomos de oxigênio que coordenam o átomo de Ca^{2+} no sítio II da sTnC, seis vêm da cadeia proteica e um de uma molécula de água. Cinco oxigênios dos que vêm da cadeia proteica são das cadeias laterais e apenas um, o do resíduo Thr72, é da cadeia principal.

Apesar de tanto os sítios I e II, do domínio amino, como os sítios III e IV, do domínio carboxi, serem semelhantes com

figura 15 Estrutura do sítio II da sTnC. Estão indicados apenas o primeiro (Asp66) e o último (Glu77) resíduos do sítio.

figura 16 Sítio II da sTnC, do resíduo 66 ao 77. Em vermelho indicam-se os átomos de oxigênio que coordenam o átomo de Ca^{2+} .

relação ao padrão EF-hand, eles diferem de um modo significativo em alguns aspectos. Íons Ca^{2+} se ligam com alta afinidade ($K_d \approx 10^{-7} \text{ M}$) aos dois sítios localizados no domínio carboxi (sítios III e IV). Tais sítios também ligam íons Mg^{2+} com constante de dissociação $\approx 10^{-3} \text{ M}$ e por isso são chamados de sítios $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Os íons Ca^{2+} se ligam com baixa afinidade ($K_d \approx 10^{-5} \text{ M}$) aos dois sítios do domínio amino terminal (sítios I e II, ou sítios N). Esses sítios não se ligam ao Mg^{2+} em concentrações fisiológicas deste metal e por isso são também conhecidos como sítios Ca^{2+} -específicos (Potter & Gergely, 1975). Há também diferenças fundamentais quanto ao papel dos sítios de cada domínio na regulação da contração muscular: os sítios III e IV estão sempre ocupados *in vivo*, por Mg^{2+} ou Ca^{2+} (dependendo de o estado do músculo ser de relaxamento ou contração e da duração da contração) e estão envolvidos num tipo de associação estável e constante à TnI (Farah et al., 1994). Já os sítios Ca^{2+} específicos (sítios I e II ou sítios N) têm valores de constantes de afinidade e de velocidade de associação e dissociação que os tornam capazes de alternar entre os estados ocupados e desocupados pelo Ca^{2+} , dentro da variação na concentração de Ca^{2+} intrasarcomérica provocada pelo estímulo nervoso e pela bomba de Ca^{2+} e também na

escala de tempo em que essa variação de concentração ocorre (Leavis et al, 1978; Grabarek et al. 1986). Com essas características dos sítios I e II, pôde-se desenvolver entre o domínio N terminal da sTnC e o peptídeo inibitório da TnI uma relação dinâmica (Ca^{2+} -dependente) que propaga o sinal do Ca^{2+} à etapa seguinte do processo de contração: quando os sítios I e II estão ocupados por Ca^{2+} , o peptídeo inibitório se desliga da actina e se associa ao domínio N terminal da sTnC permitindo a geração da força contrátil; quando os sítios I e II estão livres, o peptídeo inibitório permanece associado à actina, e o músculo no estado relaxado (Herzberg et al., 1986). Os sítios I e II são portanto regulatórios enquanto os sítios III e IV têm papel estrutural. Em 1985, Herzberg & James determinaram por cristalografia de raios X a estrutura da TnC de músculo esquelético de peru (figura 17). Como os cristais foram obtidos em pH 5, que favorece a protonação dos resíduos Asp e Glu (incluindo os que coordenam o Ca^{2+}), mesmo a alta concentração de Ca^{2+} da solução de cristalização (10 mM) não foi capaz de forçar a ocupação dos sítios I e II, normalmente já de menor afinidade do que os sítios III e IV. Assim a estrutura obtida mostrou a conformação do domínio C com os sítios III e IV ocupados e a conformação do domínio N com os sítios I e II

figura 17 Estrutura da TnC de músculo esquelético de peru. O domínio C está em laranja e o N está em azul. Os íons Ca^{2+} que ocupam os sítios III e IV estão em roxo.

desocupados (figura 17). Foi observado, como distinção marcante entre as estruturas dos dois domínios, que a superfície hidrofóbica exposta no domínio C era bem maior que no domínio N. Utilizando a estrutura do domínio C como molde, Herzberg et al. (1986) propuseram um modelo (conhecido atualmente como modelo HMJ) para a estrutura do domínio N ligado ao Ca^{2+} . No modelo havia um aumento na superfície hidrofóbica exposta (um tipo de abertura do domínio N, figura 18), consequência da ligação de Ca^{2+} . Também foi

figura 18 O domínio N se abre quando liga Ca^{2+} . A estrutura com o domínio N desocupado é da TnC de músculo esquelético de peru; a estrutura com o domínio N ligado ao Ca^{2+} é da TnC de músculo esquelético de coelho. O domínio C está em laranja e o N está em azul. As hélices B e C estão destacadas em amarelo e vermelho, respectivamente. Os íons Ca^{2+} estão em roxo.

proposto que nesse “bolso hidrofóbico” do domínio N se ligaria o peptídeo inibitório da TnI, propagando assim o sinal da contração. A determinação por RMN (Gagné et al., 1995) e por cristalografia de raios X (Strynadka et al., 1997) da estrutura do domínio N terminal da sTnC ligada ao Ca^{2+} confirmou o modelo HMJ e a natureza da transição estrutural do domínio N: as hélices B e C se distanciam, como uma unidade, das hélices A e D e a superfície hidrofóbica aumenta em $\approx 550 \text{ \AA}^2$.

Os detalhes da ligação de Ca^{2+} ao domínio N terminal da sTnC

A ligação de Ca^{2+} à sTnC é estudada para se determinarem, numa abordagem inicial, as constantes aparentes de afinidade e, mais à frente, possíveis efeitos cooperativos entre os sítios I e II ou III e IV. Esses dois aspectos revelam as propriedades mais gerais da ligação do Ca^{2+} à sTnC. As técnicas utilizadas para determiná-los se baseiam em medições diretas das concentrações de cálcio livre em sistemas de associação (como diálise de equilíbrio e diálise de fluxo, chamadas em conjunto de técnicas diretas) (Potter & Gergely, 1975; Iida, 1988; Fujimori et al., 1990; Da Silva et al., 1993) ou através de titulações acompanhadas por variações de fluorescência (Leavis et al., 1978; Johnson et al., 1978; Potter

figura 19 Aparência de gráficos obtidos por técnicas diretas (A) e indiretas (B). O eixo das abcissas utiliza uma escala logarítmica e indica a concentração de Ca^{2+} livre ($\text{pCa} = -\log[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}$). No caso das técnicas diretas, o eixo das ordenadas fornece o grau de saturação da proteína pelo ligante (nesse exemplo, da TnC por Ca^{2+}). No caso das técnicas indiretas, o eixo das ordenadas fornece a variação da propriedade sensível ao Ca^{2+} .

et al., 1981; Grabarek et al., 1983, 1990; Griffiths et al., 1990; Zot et al., 1986; Zot & Potter, 1987, 1987a, 1989; Guth & Potter, 1987; Ellis et al., 1988; Golosinska et al., 1991; Gusev et al., 1991; Pearlstone et al., 1992, 1992a; Trigo-Gonzalez et al., 1992; Chandra et al., 1994, 1994a e Fredricksen et al, 1996) ou por modificações no padrão de RMN (Li et al., 1995) (chamadas em conjunto de técnicas indiretas). Na maioria desses casos, os dados obtidos (número de íons cálcio ligados por molécula de TnC, se técnicas diretas são usadas, ou variação de uma propriedade que se verificou sensível ao Ca^{2+} , se técnicas indiretas são usadas) são associados a diferentes valores de concentração de cálcio livre. Tais valores de concentração de cálcio livre são determinados, como dito acima, experimentalmente nas técnicas diretas e previstos teoricamente nas técnicas indiretas. Obtem-se assim um gráfico que pode ser ajustado a modelos/equações clássicos de ligação. A figura 19 dá exemplos (construídos teoricamente) que visam ressaltar a aparência de alguns tipos de gráficos obtidos em cada tipo de técnica. Em ambos os casos utilizou-se o modelo/equação clássico para associação entre receptor e ligante, de onde a equação de Michaelis e Menten é um caso particular para cinética enzimática. A utilização de técnicas indiretas tem a vantagem de os ensaios serem

realizados de modo mais simples, mas a desvantagem de não se saber a que processo especificamente a variação medida está associada. Um gráfico como o da figura 19-A (de ligação direta) nos informa que a proteína tem quatro sítios de ligação para o cálcio e, devido ao pequeno patamar próximo ao ponto de dois íons por molécula de proteína, que esses sítios dividem-se em duas classes com dois sítios cada, uma com sítios de maior afinidade, com constante de dissociação aparente por volta de 10^{-6} M, e outra com sítios de menor afinidade, com constante de dissociação aparente próxima a 10^{-4} M. Um gráfico como o da figura 19-B nos informa apenas que existe na proteína uma transição associada à adição de cálcio e que essa transição chega à metade do valor máximo quando a concentração de cálcio livre é próxima a 10^{-4} M.

Potter & Gergely (1975) utilizaram técnicas diretas para analisar as características gerais dos quatro sítios. Os parâmetros obtidos não foram relacionados especificamente a quaisquer um dos sítios. Dois aspectos devem ser destacados: 1) os dados experimentais foram ajustados a uma equação sem parâmetro indicador de cooperatividade e 2) a precisão dos dados experimentais indicou apenas duas classes de sítio, obtendo-se desse modo

figura 20 A posição da Phe29 está destacada nas estruturas do domínio N fechado (sem Ca^{2+} , à esquerda) e aberto (com Ca^{2+} , à direita). Na primeira linha a vista é de baixo, com o fim da hélice D acima e mais distante do plano no papel. Na linha do meio a vista é de cima, com a hélice D abaixo do plano do papel. A última linha apresenta uma vista lateral, com as hélices A e B mais próximas do leitor.

constantes de afinidade aplicáveis para ambos sítios de cada classe. Em estudos subsequentes utilizando técnicas diretas (Reinach & Karlsson, 1988; Fujimori et al., 1990; Silva et al., 1993) valores semelhantes foram obtidos, mantendo-se a exclusão de parâmetros indicadores de cooperatividade no processo de ajuste dos dados e mantendo-se também a divisão dos sítios em duas classes. Leavis et al. (1978), Jahnke & Heilmeyer (1980), Teleman et al. (1983), Grabarek et al. (1983, 1986, 1990) e Iida (1988) se distinguiram por observarem cooperatividade entre os sítios III e IV. Nesses trabalhos as titulações foram acompanhadas por fluorescência, ligação direta (Jahnke & Heilmeyer, 1980) ou por eletrodos sensíveis a Ca^{2+} (Iida, 1988).

O mutante F29W e a cooperatividade entre os sítios I e II

Pearlstone et al. (1992) detectaram através de ensaios acompanhados por fluorescência o mais alto nível de cooperatividade entre os sítios I e II num mutante da sTnC onde a Phe29 havia sido substituída por Trp (mutante F29W). Foi verificado que a fluorescência do Trp na posição 29 é sensível à ligação de Ca^{2+} aos sítios N terminais (o que era esperado dado à proximidade dessa posição das hélices B e C,

que são as que se movem quando da ligação de Ca^{2+} , figura 20) e insensível à ligação de Ca^{2+} ao domínio C terminal. No mutante F29W todo o sinal de fluorescência pode ser atribuído ao Trp29 já que a sTnC é desprovida de resíduos de Trp ou Tyr. As titulações de Ca^{2+} acompanhadas por variação de fluorescência do mutante F29W apresentaram um coeficiente de Hill de 1,96. Esse valor indica que a ocupação do primeiro sítio é imediatamente seguida pela ocupação do segundo sítio, não existindo durante a titulação quantidades significativas da forma com apenas um Ca^{2+} ligado ao domínio N.

Essa observação levantou a possibilidade de as condições potencialmente danosas, os longos períodos necessários para preparar as amostras ou os elevados erros intrínsecos envolvidos nas técnicas diretas perturbarem ou encobrirem a cooperatividade entre os sítios N. Titulações acompanhadas por RMN realizadas com o domínio isolado da sTnC (NsTnC), onde relacionou-se a movimentação dos picos de ressonância de certos resíduos provocada pela ligação com o Ca^{2+} com diferentes valores da razão $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}}/[\text{NsTnC}]_{\text{total}}$, indicaram que os sítios I e II eram ocupados sequencialmente (com uma diferença de afinidade de aproximadamente 10 vezes) e que não há cooperatividade entre eles

(Li et al., 1995). Também foi sugerido que o primeiro sítio ocupado, com constante de dissociação de $\approx 2 \mu\text{M}$, era o sítio II e que a constante de dissociação do sítio I era de $\approx 15 \mu\text{M}$. No mesmo estudo, evidenciou-se o caráter monofásico da curva de titulação com Ca^{2+} do domínio N da F29W e bifásico do domínio N da sTnC, obtidos por dicróismo circular, reforçando as diferenças entre essas duas proteínas.

Para esclarecer a influência da posição 29 da sTnC nas propriedades dos sítios N, usamos um sistema de expressão bacteriano capaz de introduzir os análogos de Trp 5-hidroxitriptofano (5-HW) e 7-azatriptofano (7-ZW) (Barlati & Ciferri, 1970; Ross et al., 1992; Hogue et al., 1992; Hogue & Szabo, 1993; Wong & Eftink, 1997, 1998; Farah & Reinach, 1999). Esses novos mutantes (respectivamente F29HW e F29ZW), F29W e sTnC foram analisados através de técnicas diretas (diálise de fluxo) e indiretas (fluorescência). Também construímos mutantes com substituições do tipo Asp→Ala nas posições X dos sítios I ou II ou ambos, que foram submetidos ao mesmo par de técnicas.

OBJETIVOS

Analisar a influência do resíduo de aminoácido na posição 29 e de mutações Asp→Ala na posição 1 (X) dos sítios I e/ou II sobre as propriedades de ligação da TnC ao Ca^{2+} .

1. Os aminoácidos 5-hidróxitriptofano e 7-azatriptofano foram incorporados à posição 29, gerando respectivamente as proteínas F29HW e F29ZW. Estes, juntamente com a sTnC (Reinach & Karlsson, 1988) e a F29W (Pearlstone et al., 1992) foram comparados quanto às propriedades de ligação ao Ca^{2+} através de técnicas diretas e/ou indiretas.
2. A partir de cada uma dessas quatro proteínas foram contruídos três mutantes (A. C. Rases da Silva, comunicação pessoal):
 - a. com a mutação Asp→Ala na posição 30
 - b. com a mutação Asp→Ala na posição 66
 - c. com a mutação Asp→Ala nas posições 30 e 66 (tabela 2)

Tabela 2: designação dos mutantes de TnC quanto ao tipo de resíduo na posição 29, 30 e 66

	Fenilalanina na posição 29	Triptofano na posição 29	5-hidróxitriptofano na posição 29	7-azatriptofano na posição 29	
Asp nas posições 30 e 66	sTnC	F29W	F29 <u>H</u> W	F29 <u>Z</u> W	sítios I e II intactos
Ala na posição 30 e Asp na posição 66	D30A	F29W/D30A	F29 <u>H</u> W/D30A	F29 <u>Z</u> W/D30A	sítio I mutante e sítio II intacto
Ala na posição 66 e Asp na posição 30	D66A	F29W/D66A	F29 <u>H</u> W/D66A	F29 <u>Z</u> W/D66A	sítio I intacto e sítio II mutante
Ala nas posições 30 e 66	D30A/D66A	F29W/D30A/D66A	F29 <u>H</u> W/D30A/D66A	F29 <u>Z</u> W/D30A/D66A	sítios I e II mutantes

PÁGINA
EM
BRANCO

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção dos mutantes de *sTnC*: Os mutantes D30A, D66A (A.C.R. da Silva, resultados não publicados) e F29W (Pearlstone et al., 1992) foram previamente construídos e foram usados para a obtenção dos mutantes D30A/D66A, F29W/D30A, F29W/D66A e F29W/D30A/D66A. Utilizamos o método de extensão de sobreposição por PCR. Os oligonucleotídeos sintetizados para a geração da mutação Asp→Ala na posição 30 no gene do mutante F29W foram: a) 5' C ACC ACC GTC CGC AGC CCA CAT GTC AAA 3' e b) 5' TTT GAC ATG TGG GCT GCG GAC GGT GGT G 3'. A mutação Asp→Ala na posição 66 nos mutantes F29W, F29W/D30A e D30A foram geradas com os oligonucleotídeos c) 5' C GCT GCC ATC CTC GGC CAC CTC CTC GAT GA 3' e d) 5' TC ATC GAG GAG GTG GCC GAG GAT GGC AGC G 3'. Os produtos da PCR foram purificados através de eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão e usados nas reações de extensão finais. Estes produtos foram digeridos com BamHI e NdeI e ligados ao vetor pET3a (Studier & Moffatt, 1986) digerido com as mesmas enzimas. A sequência dos genes mutantes foi inteiramente confirmada por sequenciamento.

Produção da *sTnC* e de seus mutantes: a expressão e purificação da *sTnC* e do mutante

F29W foi descrita anteriormente (Reinach & Karlsson, 1988; Fujimori et al., 1990; Pearlstone et al., 1992). O mesmo procedimento foi usado para produzir os mutantes D/A e F29'sD/A. Para incorporar 5-HW ou 7-ZW nos mutantes da sTnC, nós utilizamos uma cepa derivada da W3110TrpA33 (Drapeau et al., 1968) construída pela infecção com o fago λ DE3 (Studier & Moffatt, 1986) e transformando com o plasmídeos pLysS (Studier et al., 1990). Essa nova cepa, denominada W3110TrpA33-(DE3)pLysS, carrega uma marca auxotrófica para o triptofano da cepa original, o gene da T7 RNA polimerase do fago λ DE3 sob o controle do promotor do gene lacUV5, induzível por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo), e o gene da lisozima do plasmídeo pLysS. Através da transformação dessa cepa com o plasmídeo pET-F29W ou pET-F29WD/A nós pudemos regular a produção de grandes quantidades do mRNA desejado. Para incorporar os análogos do Trp, inoculamos um clone recém-transformado com o plasmídeo pET-F29W ou pET-F29WD/A em meio mínimo M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; NaCl 0.5 g/L; NH_4Cl 1 g/L; glucose 4 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L; tiamina 5 mg/L) contendo ampicilina 200 $\mu\text{g/mL}$, cloranfenicol 20 $\mu\text{g/mL}$ e L-triptofano 20 $\mu\text{g/mL}$ até $\text{O.D}_{600\text{nm}} \approx 1.0$. A cultura foi

centrifugada a 5000rpm/10min a 4°C e ressuspensa em meio mínimo M9 mais ampicilina 200 µg/mL, cloranfenicol 20 µg/mL, IPTG 0.4 mM, e 5-hidroxitriptofano ou 7-azatriptofano 100µg/mL em vez de L-triptofano, seguida por mais 3 horas de incubação a 37°C com agitação vigorosa. Na presença de IPTG a maquinaria bacteriana de síntese de RNA é principalmente dirigida à síntese do mRNA de interesse. As grandes quantidades produzidas desse mRNA sequestram a maquinaria de síntese proteica e, desde que não há L-Trp disponível, os análogos 5-HW ou 7-ZW são incorporados à posição 29 (Hogue et al., 1992). O processo de purificação das proteínas mutantes foi o mesmo utilizado para a sTnC, rendendo aproximadamente 20 mg de proteína por litro de cultura.

Estimativa de incorporação dos análogos à F29HW e F29ZW: A incorporação dos análogos de Trp foi estimada baseando-se nos espectros de absorbância e de emissão. Os espectros de absorção dos aminoácidos e proteínas foram obtidos em guanidina-HCl 5M numa faixa de concentração proteica de 18 a 24 µM (e posteriormente corrigidas quanto a essas diferenças de concentração para obtermos dados equivalentes) e numa concentração de aminoácidos de 100 µM. Os espectros absolutos da F29W, F29HW e F29ZW foram modificados

através da subtração do espectro de absorção absoluto da sTnC para suprimir a contribuição dos resíduos de fenilalanina. No caso da F29HW, tanto os espectros de absorção como o de emissão foram utilizados; no caso da F29ZW apenas o espectro de emissão foi utilizado. Para estimar a percentagem de incorporação de 5-HW no mutante F29HW a área do espectro de absorbância do mutante F29W normalizado entre os comprimentos de onda 269 e 324 nm foi subtraída da área correspondente do espectro normalizado da 5-HW. Entre esses comprimentos de onda os valores do espectro normalizado da 5-HW são maiores que aqueles do espectro de absorção da F29W e essa diferença representa a incorporação máxima teórica possível do análogo. Do mesmo modo, a área entre 296 e 316 nm dos espectros normalizados de absorção da F29HW foram subtraídos da área correspondente do espectro normalizado de absorbância da 5-HW. Entre esses comprimentos de onda o espectro normalizado da 5-HW é maior que os correspondentes da F29HW e essa diferença representa a verdadeira taxa de incorporação do análogo. Esse valor dividido pela diferença anterior foi considerado como o primeiro valor de incorporação do análogo 5-HW na F29HW. Um segundo valor foi obtido simplesmente determinando-se a razão entre o espectro de

absorção normalizado da 5-HW subtraído do espectro da F29W e o espectro de absorção da F29HW menos o espectro da F29W (todos na faixa de 260-340 nm). A estimativa da incorporação do 7-ZW no mutante F29ZW foi mais direta já que o espectro de emissão é deslocado para o vermelho com um máximo perto do comprimento de onda de 380 nm. Subtraímos dois espectros de emissão normalizados do F29ZW, um obtido empregando 287 nm e o outro obtido empregando 315 nm como comprimentos de onda de excitação, e a diferença (vista como um pequeno pico a 340 nm) foi transformada de volta a valores absolutos. Essa área foi comparada com a correspondente de uma amostra com concentração conhecida de F29W e relacionada à quantidade de F29W presente na amostra de F29ZW.

Ligação de Ca^{2+} à sTnC e aos mutantes determinada por diálise de fluxo: Os experimentos de diálise de fluxo foram realizados como descrito anteriormente (Da Silva et al., 1993) com algumas modificações. Os tampões usados para a remoção do Ca^{2+} ligado às proteínas foram: 1) Tampão A (MOPS 20 mM, KCl 100 mM, DTT 1 mM, pH=7,0) com EDTA 5 mM; 2) Tampão A com 2 mM EDTA; 3) Tampão A sem EDTA. As proteínas foram dialisadas com cada tampão por 12 horas com duas trocas

(volumes de tampão 40 vezes maior que os volumes das amostras proteicas). A concentração das proteínas foi determinada como descrito em Hartree (1972) usando uma amostra padrão de sTnC cuja concentração foi determinada por análise de aminoácidos. A concentração proteica na câmara de diálise foi 13 μ M, ajustada com o tampão usado na última diálise. O algoritmo Marquardt-Levenberg para regressão não linear da versão 2.0 do programa Jandel Sigma Plot foi usado em todos os procedimentos de ajuste de curvas. O número de sítios para ligação de cálcio em cada proteína foi inferido do platô de saturação obtido entre os valores de pCa 4.5 e 4.0. Isso evitou a introdução de outro parâmetro (distorcido por ligação inespecífica de Ca^{2+} em valores baixos de pCa, veja abaixo) a ser determinado pelo processo de ajuste. Os dados da sTnC, F29W, F29HW e F29ZW foram ajustados à equação (1):

$$(equação 1) \quad \frac{[\text{Ca}^{2+}_{\text{ligado}}]}{[\text{TnC}]} = \frac{2 \cdot [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1}}{(K_{d1})^{n1} + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1}} + \frac{2 \cdot [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n2}}{(K_{d2})^{n2} + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n2}}$$

Os dados dos mutantes D30A, F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A foram ajustados à equação (2):

$$(equação 2) \quad \frac{[\text{Ca}^{2+}_{\text{ligado}}]}{[\text{TnC}]} = \frac{2 \cdot [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1}}{(K_{d1})^{n1} + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]^{n1}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]}{(K_{d2}) + [\text{Ca}^{2+}_{\text{livre}}]}$$

Os dados dos mutantes D66A, D30A/D66A, F29's/D66A e F29's/D30A/D66A foram ajustados à equação (3):

$$(equação\ 3) \quad \frac{[Ca^{2+}_{\text{ligado}}]}{[TnC]} = \frac{2 \cdot [Ca^{2+}_{\text{livre}}]^{n_1}}{(K_{d1})^{n_1} + [Ca^{2+}_{\text{livre}}]^{n_1}}$$

onde K_{d1} e K_{d2} são as constantes aparentes de dissociação e n_1 e n_2 os coeficientes de Hill, sendo o índice 1 relativo aos sítios C terminais e o índice 2 relativo aos sítios N terminais.

Ligação de Ca^{2+} às F29's e F29's/D30A monitorada por fluorescência: Os experimentos

de fluorescência foram realizados no espectrofluorímetro Hitachi F-4500 com 2.5 nm de fenda de excitação e 5 nm de fenda de emissão para o mutante F29W e 5 nm de fenda de excitação e emissão para todos os outros mutantes. O comprimento de onda usado para a excitação foi de 287 nm para o F29W e F29W/D30A e 315 nm para os F29's e F29's/D30A. A temperatura da cubeta foi mantida em 25°C. Não usamos tampões de EGTA mas uma amostra "calcium-free" correspondente àquela usada nos experimentos de diálise de fluxo. O volume dos ensaios de fluorescência foi de 2.5 mL e o volume de cada adição de cálcio foi reduzido para manter a concentração de cálcio a mesma dos experimentos de diálise de fluxo. Desse modo, pudemos usar a escala média de valores de pCa

obtida nos experimentos de diálise de fluxo e relacioná-la aos dados de fluorescência. Os dados obtidos com os mutantes F29W, F29HW e F29ZW/D30A foram ajustados à equação:

$$(equação 4) \quad \Delta F\% = \frac{100 \cdot ([Ca^{2+}]_{livre})^{n_2}}{(K_{d2})^{n_2} + [Ca^{2+}]_{livre}^{n_2}}$$

Os dados obtidos com os mutantes F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A (nesse caso a variação negativa) foram ajustados à equação:

$$(equação 5) \quad \Delta F\% = \frac{100 \cdot ([Ca^{2+}]_{livre})}{(K_{d2}) + [Ca^{2+}]_{livre}}$$

onde $\Delta F\%$ é a variação máxima relativa de fluorescência, K_{d2} é a constante aparente de dissociação do cálcio para os sítios N terminais (equação 4), ou microscópica para o sítio N terminal restante (equação 5), e n_2 o coeficiente de Hill, reflexo da cooperatividade entre os dois sítios N terminais. Os dados obtidos do mutante F29ZW foram ajustados à equação:

$$(equação 6) \quad \Delta F\% = \frac{f_{21} K_{d21} [Ca^{2+}]_{livre}}{K_{d12} K_{d21} + K_{d12} [Ca^{2+}]_{livre} + [Ca^{2+}]_{livre}^2} + \frac{f_{12} [Ca^{2+}]_{livre}^2}{K_{d12} K_{d21} + K_{d12} [Ca^{2+}]_{livre} + [Ca^{2+}]_{livre}^2}$$

onde $\Delta F\%$ é a variação máxima relativa de fluorescência, f_{21} é a variação relativa associada à ligação do Ca^{2+} ao sítio II, K_{d21} é a constante microscópica de dissociação para o sítio II, f_{12} é a variação relativa de fluorescência associada à ligação do Ca^{2+} ao sítio I e K_{d12} é a constante microscópica de afinidade do sítio I.

PÁGINA
EM
BRANCO

RESULTADOS

Incorporação dos análogos de triptofano aos mutantes F29HW e F29ZW: a figura 21, painel A, mostra os espectros normalizados de absorbância dos três aminoácidos isolados triptofano, 5-HW e 7-ZW. Tanto o 5-HW como o 7-ZW têm espectros de absorção deslocados para o vermelho quando comparados com o espectro de absorção do triptofano. Essa característica é mantida nos espectros de absorção dos mutantes de sTnC correspondentes, F29W, F29HW e F29ZW (Figura 21, painel B). Os painéis C, D e E demonstram a similaridade entre os espectros de absorção dos aminoácidos livres e das proteínas correspondentes. Os espectros de excitação e emissão dos três aminoácidos livres e dos três mutantes (esses últimos em presença de concentrações crescentes de Ca^{2+}) são mostrados na figura 22. A fluorescência da F29W aumenta aproximadamente 3 vezes com a adição de Ca^{2+} (pCa 2,0), como previamente comunicado (Pearlstone et al., 1992). Quando excitada a 315 nm, a fluorescência da F29HW aumenta aproximadamente 7 vezes com a adição de Ca^{2+} (pCa 2,0) (esse aumento cai para aproximadamente 3 vezes se o comprimento de onda de excitação for 287 nm). A fluorescência da F29ZW apresenta um padrão bimodal, aumentando em aproximadamente 40% em pCa 5,0 e diminuindo aproximadamente 10% em pCa

3,0. A análise dos espectros de absorção e emissão indicam de 87 a 96% de incorporação de análogo para a F29HW e de 96% para a F29ZW (ver **Materiais e Métodos**). Devido a esse resultado de incorporação, os dados obtidos com ambos mutantes não são significativamente distorcidos por contaminação com a F29W. Usamos o mesmo procedimento para a produção de todos os outros mutantes F29HW/D/A e F29ZW/D/A.

Fig. 21. Espectros de absorção do triptofano (W), 5-hidroxitriptofano (5-HW), 7-aza-triptofano (7-ZW), sTnC e dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW. Todos os espectros foram obtidos em cloridrato de guanidina 5M, temperatura de 25°C; concentração dos aminoácidos de 100 μ M e concentração de proteínas de 3 μ M. O espectro de absorção da sTnC foi subtraído dos espectros dos mutantes para minimizar a contribuição dos resíduos de fenilalanina. Painel A: espectros de absorbância normalizados do W (O), 5-HW ($\square$) e 7-ZW (Δ). Painel B: espectros de absorção normalizados da F29W ($\bullet$), F29HW ($\blacksquare$) e F29ZW ($\blacktriangle$). Painéis C, D e E: comparação dos espectros de absorção normalizados dos aminoácidos livres e quando incorporados nas proteínas. Os símbolos são os mesmos dos painéis A e B.

Fig. 22. Espectros de excitação e emissão do triptofano (W), 5-hidroxitriptofano (5-HW) e 7-azatriptofano (7-ZW) e espectros de emissão e excitação dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW, com e sem Ca^{2+} ; tampão descrito em Materiais e Métodos; temperatura; 25°C; concentrações de aminoácidos e proteínas de 3 μM . Painel A: espectros de excitação normalizados do W (O), HW ($\square$) e ZW ($\triangle$). Emissão a 340 nm para o W e 5-HW e em 380 nm para o 7-ZW. Painel B: espectros de excitação normalizados da F29W em pCa 9.0 (O) e em pCa 2.0 ($\square$), F29HW em pCa 9.0 ($\triangle$) e em pCa 2.0 (∇), e F29ZW em pCa 9.0 ($\bullet$), em pCa 5.0 ($\blacksquare$) e em pCa 3.0 ($\blacktriangle$). O comprimento de onda de emissão foi 340 nm para a F29W e F29HW e 380 nm para a F29ZW. Painel C: espectros normalizados de emissão do W, 5-HW e 7-ZW. Excitação feita a 287 nm (O) and 315 nm (∇ , normalizada contra 5-HW e $\diamond$, normalizada contra 7-ZW) para o W e 315 nm para HW ($\square$) e ZW ($\triangle$). Painel D: espectros de emissão normalizados da F29W excitada a 287 nm, pCa 9.0 (O) e pCa 2.0 ($\square$), F29HW excitada em 315 nm, em pCa 9.0 ($\triangle$) e pCa 2.0 (∇) e F29ZW excitada em 315 nm, em pCa 9.0 ($\bullet$), pCa 5.0 ($\blacksquare$) e pCa 3.0 ($\blacktriangle$).

Ligação de cálcio à sTnC e aos mutantes D/A, F29's e F29'sD/A: A figura 23 mostra as curvas de ligação de Ca^{2+} à sTnC e aos três mutantes F29W, F29HW e F29ZW, e também a ligação de Ca^{2+} acompanhada por fluorescência. O painel A compara as quatro curvas de ligação de cálcio determinadas por diálise de fluxo. Todas as curvas indicam uma saturação no nível de quatro cálcios por proteína, como sugere o platô entre os pCa's 4,5 e 4. Um aspecto a ser observado é que, acima de pCa 4,0, o aumento no Ca^{2+} ligado é muito provavelmente relacionado a ligação inespecífica de Ca^{2+} a TnC. Portanto, assumimos o valor de pCa 4 como o máximo valor de concentração de Ca^{2+} ao qual podemos relacionar qualquer parâmetro dependente, nas condições dos nossos experimentos. De pCa 5,5 a pCa 4,0, a diferença mais evidente entre as curvas é o deslocamento das curvas dos mutantes F29W e F29ZW para pCa's de maior valor, quando comparados às curvas da sTnC e F29HW. Esse comportamento reflete um aumento da afinidade dos últimos sítios a serem preenchidos. Os sítios C terminais têm afinidade aproximadamente 100 vezes maior que o sítios N terminais e são representados pela parte inferior das curvas (entre pCa's 7 e 5,5). As curvas de ligação da sTnC e F29HW são semelhantes considerando a transição geral.

O painel B compara as mudanças relativas de fluorescência dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW provocadas pela ligação de Ca^{2+} . Os dados foram obtidos na ausência de tampão de EGTA. Usamos a mesma escala média de pCa dos experimentos de diálise de fluxo para relacionar aos dados de fluorescência obtidos em titulações equivalentes (ver Materiais e Métodos). Os experimentos de fluorescência mostraram que o ponto da meia-transição do mutante F29HW ocorre 0,7 pontos de pCa depois da transição do mutante F29W. Isso confirma a menor afinidade do sítios N terminais dos mutante F29HW quando comparados aos sítios N terminais do mutante F29W. A variação de fluorescência da F29ZW é bimodal, com o maior valor próximo a pCa 5 e um decréscimo final de aproximadamente 20%, que indica um platô após pCa 3,5.

Os painéis C, D e E mostram a comparação entre os experimentos correspondentes de fluorescência e de diálise de fluxo para cada mutante. Essas comparações ressaltam em que ponto de saturação de Ca^{2+} a fluorescência começa a aumentar. No caso da F29W (painel C) e da F29HW (painel D), a maioria da variação de fluorescência ocorre acima de dois cálcios ligados por molécula. Esse limite é melhor definido para o aumento da F29HW que para a F29W, já que a diferença

entre as afinidades dos sítios C e N terminais da F29HW é aproximadamente 0.7 unidades de pCa maior que entre os sítios C e N terminais da F29W. Esses padrões de mudança são uma evidência de que a ligação de cálcio aos sítios C terminais não altera a fluorescência do triptofano ou do 5-HW incorporados à posição 29 da TnC e que essas sondas são, portanto, seletivas à ligação de cálcio aos sítios N terminais regulatórios da sTnC.

O painel E mostra o padrão de aumento de fluorescência associado à curva total de ligação de cálcio para o mutante F29ZW. O valor máximo de fluorescência ocorre em pCa 5 e está associado ao nível três Ca^{2+} por molécula de proteína na curva saturação. Não é possível, no entanto, nesse caso, relacionar o valor inicial de pCa a partir do qual a fluorescência começa a aumentar com um determinado valor mínimo de saturação de cálcio, como feito para o F29W e para a F29HW, porque a normalização da variação bimodal pode amplificar pequenas diferenças.

Fig. 23. Ligação de Ca^{2+} à sTnC e aos mutantes F29's. Medições de diálise de fluxo (símbolos brancos) e/ou de fluorescência (símbolos negros) foram usadas para determinar as características de ligação de cálcio à sTnC (círculos em A), F29W (quadrados em A, B e C), F29HW (triângulos para cima em A, B e D) e F29ZW (triângulos para baixo em A, B e E). Cada conjunto de pontos é a média de três experimentos. Muitas vezes a barra de erro representando o desvio padrão está oculta pelos símbolos. Nos painéis B, C, D e E os valores de pCa usados com os dados de fluorescência foram obtidos de experimentos correspondentes de diálise de fluxo. O painel A compara a ligação do Ca^{2+} à sTnC com os mutantes F29's. O painel B mostra as variações de fluorescência causadas pela ligação de Ca^{2+} aos mutantes F29W, F29HW e F29ZW. Os painéis C, D e E correlacionam a variação de fluorescência de cada mutante com o nível de saturação de Ca^{2+} .

A figura 24 mostra a ligação de cálcio medida por diálise de fluxo à sTnC e aos mutantes D/A (painel A), à F29W e F29WD/A's (painel B), à F29HW e mutantes F29HWD/A's (painel C) e ao F29ZW e mutantes F29ZWD/A's (painel D). Os dados para a sTnC e seus mutantes (painel A) mostram que as mutações Asp→Ala nas posições 30 ou 66 ou ambas afetam predominantemente a ligação de cálcio em valores de pCa menores que 6 (concentrações de Ca^{2+} livre maiores que 10^{-6} M), ou seja, na faixa associada à ligação de cálcio aos sítios N terminais. Isto está de acordo com a independência estrutural dos domínios N e C da sTnC. Próximo ao pCa 6, as curvas de ligação de cálcio da sTnC e do mutante D30A divergem das curvas de ligação de cálcio dos mutantes D66A e D30A/D66A. As curvas de ligação de cálcio da sTnC e da D30A divergem apenas em pCa's menores do que 5, onde a curva do mutante D30A alcança um platô (indicando um máximo de três cálcios por proteína). A curva de ligação de cálcio da sTnC continua até quatro cálcios ligados por proteína, em pCa 4,0.

Esse padrão é repetido nas curvas de ligação dos mutantes F29's e F29'sD/A (painéis B, C e D). A diferença é que a divergência entre as curvas dos mutantes F29's e os respectivos F29'sD30A varia (pCa $\cong$ 6 para F29W e F29W/D30A, pCa $\cong$ 4,6 para a F29HW e

F29HW/D30A e $pCa \cong 5,4$ para a F29ZW e F29ZW/D30A). Essa variação reflete as diferenças entre os sítios previamente mostrada na figura 23. As curvas de ligação de Ca^{2+} aos mutantes F29'sD66A e F29'sD30A/D66A são praticamente superpostas em toda a escala de pCa .

Em todas as análises de dados o número por proteína de sítios para o cálcio foi inferido do platô observável entre os pCa 's 4,5 e 4,0. Em concentrações maiores de Ca^{2+} , ocorre ligação inespecífica (nas nossas condições experimentais), o que distorce a parte final da curva. Desconsideramos portanto, qualquer ligação de Ca^{2+} que ocorreu em valores de pCa menores do que 4. Os valores de constante de dissociação e coeficiente de Hill obtidos a partir dos dados dos experimentos de diálise de fluxo estão apresentados na tabela 3.

Fig. 24. Ligação de Ca^{2+} aos mutantes D/A determinada por diálise de fluxo. O painel A mostra a ligação de Ca^{2+} à sTnC(O) e aos mutantes D30A ($\square$), D66A ($\triangle$) e D30A/D66A (∇). Os painéis B, C e D mostram, respectivamente, a ligação de cálcio aos mutantes F29W, F29HW e F29ZW e aos mutantes D/A's duplos ou triplos correspondentes. Cada conjunto de pontos é a média de dois experimentos. Muitas vezes a barra de erro representando o desvio padrão está oculta pelos símbolos.

A figura 25 mostra a variação de fluorescência causada pela ligação de Ca^{2+} aos mutantes F29's e F29'sD/A. O painel A compara a variação de fluorescência causada pela ligação de Ca^{2+} dividida pelo valor de fluorescência da proteína sem Ca^{2+} , considerada como 100%, para todos os mutantes F29's e F29'sD/A. A variação de fluorescência diminui em todos os mutantes F29'sD/A quando comparada com os mutantes F29's e é praticamente abolida nos mutantes F29'sD30A/D66A. Os mutantes F29'sD66A e F29'sD30A/D66A apresentaram variação de fluorescência causada pela ligação de Ca^{2+} menor que 5% e não foram nas titulações subsequentes. Os painéis B, C e D correlacionam a variação de fluorescência com o nível de saturação de Ca^{2+} para os mutantes F29W/D30A (painel B), F29HW/D30A (painel C) e F29ZW/D30A (painel D). Aproximadamente 60% da variação total de fluorescência desses mutantes ocorre depois de o nível de saturação de Ca^{2+} atingir dois cálcios por proteína e termina quando o nível chega a três cálcios por proteína. Essa é uma indicação que a ligação de cálcio ao sítio N terminal restante é o evento associado à mudança de fluorescência.

Fig. 25. Variação de fluorescência causada pela ligação de Ca^{2+} aos mutantes F29's/D30A e titulação de Ca^{2+} comparando o nível de saturação de cada mutante com a variação de fluorescência. O painel A mostra o aumento na fluorescência dos mutantes F29's devido à ligação de Ca^{2+} relativo ao valor de fluorescência da proteína sem Ca^{2+} , considerada como 100%. Somente os mutantes D/A's cuja variação na fluorescência foi maior que 5% foram usados nos experimentos paralelos de diálise de fluxo/fluorescência. Os painéis B, C e D correlacionam a variação de fluorescência dos mutantes F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A, respectivamente, com o nível de saturação de Ca^{2+} obtidos dos experimentos correspondentes de diálise de fluxo, como na figura 23, painéis B-E, para os mutantes F29's.

A figura 26 ressalta a similaridade entre os mutantes D30A e F29's/D30A e compara a titulação de cálcio seguida por fluorescência dos mutantes F29's com os respectivos F29'sD30A. O painel A mostra as curvas de ligação de Ca^{2+} obtidas por diálise de fluxo para os mutantes D30A e F29'sD30A. As quatro curvas de ligação apresentam um alto grau de similaridade, indicando que o efeito da mutação Phe→Trp na posição 29 é minimizada nos mutantes duplos F29'sD30A. O painel B compara a titulação de cálcio seguida por fluorescência dos mutantes F29'sD30A. Os três valores de $\text{pCa}_{1/2}$ são aproximadamente 5,5 para os mutantes F29W/D30A e F29HW/D30A e aproximadamente 5,3 para o mutante F29ZW/D30A. Os painéis C, D e E mostram a titulação de Ca^{2+} seguida por fluorescência dos mutantes F29's e F29's/D30A. No painel C as curvas dos mutantes F29W e F29W/D30A são apresentadas. Ambas têm $\text{pCa}_{1/2}$ próximo a 5,5 e diferem ligeiramente em baixas concentrações de Ca^{2+} , o que culmina com o valor de 1,28 predito para o coeficiente de Hill do mutante F29W (ver tabela 4). O painel D compara as curvas de titulação de Ca^{2+} seguida por fluorescência dos mutantes F29HW e F29HW/D30A. O $\text{pCa}_{1/2}$ do mutante F29HW é próximo a 4,8 enquanto o $\text{pCa}_{1/2}$ do mutante F29HW/D30A é aproximadamente 5,5. As

inclinações de ambas as curvas são similares (coeficiente de Hill predito 1,11 para a F29HW e fixado em 1 para a F29HW/D30A). O painel E compara as curvas dos mutantes F29ZW e F29ZW/D30A. A forma bimodal da curva do mutante F29ZW é substituída por um decréscimo monotônico no mutante F29ZW/D30A, com $pCa_{1/2}$ próximo a 5,3 e uma inclinação menor que a esperada (ver tabela 4).

Fig. 26. Ligação de Ca^{2+} medida por diálise de fluxo e acompanhada por fluorescência para os mutantes D30A e F29'sD30A e comparação da ligação de Ca^{2+} seguida por fluorescência entre os mutantes F29's e os mutantes F29'sD30A. O painel A mostra as curvas de ligação de cálcio aos mutantes D30A e F29'sD30A. O painel B compara a variação de fluorescência dos mutantes F29'sD30A. Os painéis C, D e E mostram a variação de fluorescência causada pela ligação do cálcio aos mutantes F29W versus F29W/D30A (painel C), F29HW versus F29HWD30A (painel D) e F29ZW versus F29ZWD30A (painel E).

Tabela 3. Número de sítios, constantes aparentes de dissociação e coeficientes de Hill para a sTnC e seus mutantes, medidos por diálise de fluxo. As constantes aparentes de dissociação e os coeficientes de Hill para a ligação de Ca^{2+} aos sítios C terminais (K_{d1} e n_1) e N terminais (K_{d2} and n_2) foram determinados usando o ajuste de curvas descrito em Materiais e Métodos. O número de sítios para o Ca^{2+} foi deduzido pelo platô sugerido pelos valores correspondentes a pCa 's entre 4,5 e 5,0.

DIÁLISE DE FLUXO					
	nº sítios	$K_{d1} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$	n_1	$K_{d2} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$	n_2
sTnC	4	4.77 ± 0.48	1.31 ± 0.20	189.81 ± 11.19	1.20 ± 0.08
D30A	3	4.78 ± 0.04	1.51 ± 0.12	45.40 ± 8.51	-
D66A	2	6.16 ± 0.69	1.18 ± 0.15	-	-
D30A/D66A	2	5.30 ± 0.29	1.41 ± 0.26	-	-
F29W	4	5.84 ± 0.18	1.22 ± 0.39	31.01 ± 4.88	1.11 ± 0.04
F29W/D30A	3	5.07 ± 0.60	-*	31.60 ± 2.64	-
F29W/D66A	2	7.01 ± 0.34	0.89 ± 0.06	-	-
F29W/D30A/D66A	2	5.74 ± 0.16	1.07 ± 0.10	-	-
F29HW	4	8.69 ± 1.51	0.90 ± 0.07	236.59 ± 6.13	0.85 ± 0.02
F29HW/D30A	3	6.14 ± 0.54	1.13 ± 0.09	58.01 ± 10.67	-
F29HW/D66A	2	10.45 ± 2.61	0.82 ± 0.03	-	-
F29HW/D30A/D66A	2	10.82 ± 2.17	0.75 ± 0.04	-	-
F29ZW	4	8.16 ± 0.60	0.99 ± 0.14	69.73 ± 12.50	1.07 ± 0.18
F29ZW/D30A	3	6.60 ± 0.04	1.07 ± 0.03	34.50 ± 16.69	-
F29ZW/D66A	2	7.35 ± 1.67	0.99 ± 0.06	-	-
F29ZW/D30A/D66A	2	8.32 ± 1.4	1.14 ± 0.18	-	-

* o n_1 para o mutante F29W/D30A não foi determinado devido a divergência do processo de ajuste em um dos conjuntos de dados.

Tabela 4. Constantes aparentes de dissociação e coeficientes de Hill para os mutantes F29W, F29HW e F29ZW e respectivos mutantes D30A's medidos por fluorescência. As constantes de dissociação (K_d) dos sítios II (K_{d21} - constante microscópica) e I (K_{d12} - constante microscópica), somente ao II (K_{d2} - constante microscópica para os mutantes F29's/D30A) ou ambos (K_{d2} macroscópica para os mutantes F29's), com cooperatividade (n_2), foram obtidos através de titulações de Ca^{2+} seguidas por fluorescência, usando a mesma escala de pCa de experimentos correspondentes de diálise de fluxo. Os dados foram ajustados usando os procedimentos descritos em Materiais e Métodos.

	FLUORESCÊNCIA				
	$K_{d2} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$	$K_{d2} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$	n_2	$K_{d21} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$	$K_{d12} \cdot 10^7 \cdot \text{M}^{-1}$
F29W	39.2±1.2	-	1.3±0.1	-	-
F29W/D30A	-	32.7±0.9	-	-	-
F29HW	184.6±54.4	-	1.1±0.1	-	-
F29HW/D30A	-	31.2±3.5	-	-	-
F29ZW	-	-	-	59.2±3.2	81.4±8.1
F29ZW/D30A	-	51.8±10.6	0.7±0.1*	-	-

* embora o mutante F29ZW/D30A tenha um único sítio N funcional, a curva de fluorescência apresentou uma inclinação inesperada. O procedimento de ajuste permitiu, por esse motivo, um parâmetro artificial para implementar a qualidade da constante de dissociação predita.

DISCUSSÃO

A troponina C recombinante de músculo esquelético de galinha (sTnC) não tem resíduos de Tyr nem de Trp. Pearlstone et al. (1992) construíram uma sonda da sTnC através da substituição da Phe da posição 29 por Trp, permitindo que a ligação do Ca^{2+} aos sítios N terminais fosse acompanhada por espectroscopia de fluorescência. Os testes iniciais indicaram que as mais importantes propriedades da sTnC haviam sido mantidas no mutante, chamado de F29W, incluindo a afinidade por cálcio dos sítios regulatórios N terminais. Os dados obtidos com o mutante F29W através dos ensaios de ligação de Ca^{2+} seguidos por fluorescência previram um alto grau de cooperatividade (coeficiente de Hill de 1,96), o que implicava numa quase ausência da espécie com apenas um cálcio ligado aos sítios N terminais.

A posição 29 está no final da hélice A e é imediatamente adjacente ao sítio I (resíduos 30 a 41). A substituição da Phe original da sTnC por Trp foi inicialmente considerada como afetando apenas marginalmente a estrutura do domínio N terminal, tanto na forma associada como da não-associada ao Ca^{2+} . Isso tornaria o mutante F29W uma sonda fluorescente com propriedades equivalentes à da sTnC. Com a ligação de Ca^{2+} aos sítios N terminais o

mutante F29W apresenta um incremento de aproximadamente 3 vezes na fluorescência a 340 nm. Assim o processo de ligação do Ca^{2+} aos sítios N poderia ser facilmente acompanhado por ensaios rápidos e simples.

No entanto comunicações posteriores indicaram que as propriedades do domínio N terminal da F29W eram diferentes daquelas do domínio N terminal da sTnC. Chandra et al. (1994) mostraram que o mutante F29W era deficiente na estimulação da atividade ATPásica da miosina tanto em ensaios com o subfragmento 1 quanto em ensaios utilizando miofibras. Li et al. (1995) detectaram por dicroísmo circular que a ligação de Ca^{2+} ao domínio N do mutante F29W induzia um aumento de elipticidade negativa (a 221 nm) maior que o induzido no domínio N da sTnC. Utilizando a variação no sinal de UV-CD também foi detectado um aumento da afinidade pelo Ca^{2+} dos sítios N terminais da F29W de aproximadamente 2,5 vezes em relação à sTnC. Yu et al. (1999) comunicaram que, na ausência de Ca^{2+} , o domínio N terminal da F29W desnaturava à temperatura de 47° C, enquanto que o da sTnC resistia até temperaturas de 56° C. De várias direções, portanto, houve indicações que as propriedades da sTnC eram diferentes das propriedades da F29W.

Aqui mostramos através de técnicas de ligação direta, que os sítios N terminais da F29W têm uma afinidade por Ca^{2+} pelo menos 6 vezes maior que os sítios N terminais da sTnC (tabela 3) (ver adiante para detalhes). A substituição do Trp por 5-HW na posição 29 reverte esse aumento de afinidade, e quando o 7-ZW é incorporado em vez de Trp, a afinidade dos sítios N terminais aumenta em aproximadamente 3 vezes quando comparada à sTnC.

Esta influência da posição 29 sobre a afinidade dos sítios N terminais não é surpreendente, já que na estrutura cristalina da sTnC com apenas os sítios C terminais preenchidos, uma extensa rede de interações entre a Phe29, envolvendo a Met28, a Met48, o Glu41, a Thr44 e a Val45, pode ser observada (figura 27). Tanto nas estruturas determinadas por RMN (Gagné et al., 1995) como por cristalografia de raios X da forma saturada por Ca^{2+} da sTnC (Strynadka et al., 1997), a cadeia lateral da Phe29 se aproxima da cadeia lateral da Phe78, Ile37 e especialmente da Val45 (figura 28). É portanto muito provável que a estrutura da sTnC seja sensível de algum modo à introdução na posição 29 de um resíduo com cadeia lateral maior e com, no caso da 5-HW e 7-ZW, doadores e receptores potenciais de ponte de hidrogênio no anel de seis membros.

figura 27 Interações importantes da Phe29 quando os sítios N estão desocupados. A Phe29 está em magenta, a Met28 em laranja, o Glu41 em amarelo, a Thr44 em preto, a Val45 em verde e a Met48 em vermelho. Em A e B vista lateral e em C e D vista de baixo, com o início da hélice A acima do plano. Em B e D destaca-se a superfície acessível ao solvente.

figura 28 Interações importantes da Phe29 quando os sítios N estão ocupados. A Phe29 está em magenta, a Met28 em laranja, a Ile37 em azul claro, o Glu41 em amarelo, a Thr44 em preto, a Val45 em verde e a Met48 em vermelho e a Phe78 em rosa. Em A e B vista lateral e em C e D vista de baixo, com o fim da hélice D acima do plano. Em B e D destaca-se a superfície acessível ao solvente.

- *Porque o mutante F29W apresenta maior afinidade que a da sTnC*

A Phe29 e os resíduos citados acima contribuem para o “bolso hidrofóbico” que é exposto quando o Ca^{2+} se liga aos sítios do domínio N terminal, simultaneamente à transconformação da sTnC da forma “fechada” para a forma “aberta”. Há um grande número de evidências que no filamento fino esse “bolso hidrofóbico” interage com o peptídeo inibitório da TnI, o que inicia o processo efetivo de liberação dos sítios da actina para ligação da miosina. Na forma isolada e saturada por Ca^{2+} da TnC, a ausência do peptídeo inibitório da TnI força o “bolso hidrofóbico” a ser exposto ao ambiente aquoso, o que é visto como uma diminuição da afinidade dos sítios N terminais quando comparada àquela do complexo TnC/TnI (Potter & Gergely, 1975). Pearlstone et al. (1992) e da Silva et al. (1993) comunicaram a construção de mutantes de sTnC com afinidade por Ca^{2+} dos domínios N terminais aumentada, pela substituição, um por um, dos cinco resíduos altamente hidrofóbicos Val45, Met46, Met48, Leu49 e Met82 do “bolso hidrofóbico” por Thr, Gln, Ala, Thr e Gln, respectivamente. Essas substituições diminuem a barreira energética entre as formas “aberta” e “fechada” e, portanto, aumentam a afinidade dos sítios N terminais. Esta pode ser uma das explicações

para o aumento de afinidade dos sítios N terminais da F29W: que o triptofano imprimiria uma face menos hidrofóbica ao “bolso” exposto pela ligação do Ca^{2+} , apresentando seu anel de 5 elementos com um doador potencial de ponte de hidrogênio, mantendo por outro lado pelo menos algumas das interações originais do anel de 6 elementos na forma aberta; o Trp na posição 29 funcionaria como um peptídeo inibitório elementar, um “built-in inhibitory peptide”.

Potenciando o aumento da afinidade dos sítios N terminais, na forma não associada ao Ca^{2+} do domínio N terminal, a cadeia lateral do Trp, devido a seu maior volume, desestabilizaria o grupo convencional de interações do núcleo proteico, contribuindo para um deslocamento adicional do equilíbrio das formas “fechada”/“aberta” para a forma “aberta”, onde, em teoria, haveria uma acomodação mais eficiente do Trp.

Apesar de o número de grupamentos capazes de interações polares ser maior no 5-HW do que no triptofano, surpreendentemente a afinidade dos sítios N terminais da F29HW ficou nos mesmos níveis daquela da sTnC (constantes de dissociação de $2,4 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$ e $1,9 \cdot 10^{-5} \text{M}^{-1}$, respectivamente, tabela 3). Se a justificativa apresentada acima para o aumento da afinidade dos sítios N do mutante F29W

fosse estendida ao mutante F29HW, a afinidade dos sítios N deste último deveria ser maior que a do primeiro. Outras propriedades do resíduo da posição 29 devem, portanto, ser levados em conta além da hidrofobicidade.

- *Porque o mutante F29HW apresenta afinidade próxima à da sTnC*

Na estrutura da sTnC com ambos domínios saturados por Ca^{2+} determinada por RMN, a abertura do domínio N foi relacionada à rotação das ligações Φ e Ψ do resíduo glutamato da posição 41. Esse resíduo ocupa a posição -Z do sítio I, imediatamente antes do início da hélice B e é o único resíduo que doa ambos oxigênios da cadeia lateral para a coordenação do íon Ca^{2+} . Na reorientação da cadeia lateral do Glu41 os ângulos Φ e Ψ passam de -95.9° e -6.8° para -62.9° e -43.4° , respectivamente, assumindo valores típicos de α -hélice (figura 29). Gagné et al. (1997) e Li et al. (1997) analisaram o comportamento de um mutante da sTnC onde o Glu41 havia sido substituído por Ala (mutante E41A). Nesse mutante a ocupação do sítio I ocorria apenas em concentrações de Ca^{2+} 100 vezes maiores que na proteína tipo selvagem e a ligação de Ca^{2+} aos sítios I e II não provocava a abertura do domínio. Foi proposto então que as mudanças nos ângulos de rotação das ligações Φ e Ψ do Glu41 que acontece com a

figura 29 A ligação do Ca^{2+} no sítio I força a reorientação da cadeia lateral do resíduo Glu41 e a alteração dos ângulos Φ e Ψ .

reorientação da cadeia lateral ácida para se ligar ao Ca^{2+} , são indissociáveis do processo de abertura do domínio N. O Glu41 seria um pivô de rotação, uma espécie de ponto de articulação, que por se localizar no início da hélice B, alavanca a reorientação do par de hélices B e C. Concluiu-se que o resíduo Glu41 é essencial tanto para a ligação do Ca^{2+} ao sítio I como para o acoplamento dessa ligação à abertura do domínio N. Herzberg & James. (1988) mostraram que no estado apo, o Glu41 estabelece interações com a Lys 40. Strynadka et al. (1997) revelaram que na estrutura ligada ao Ca^{2+} essa ponte salina não mais existe (figura 30). No caso do mutante F29HW deve ser destacado que na estrutura sem Ca^{2+} , dependendo da orientação da cadeia lateral do 5-HW pode haver uma interação entre a hidroxila do carbono 5 do anel de seis membros com os grupamentos carregados do Glu41 e da Lys40, criando uma rede de ligações não covalentes e estabilizando a cadeia lateral do Glu41 na orientação oposta à necessária à coordenação do Ca^{2+} . Essa estabilização seria vista então como uma diminuição na afinidade do sítio I pelo Ca^{2+} .

- Porque o mutante F29ZW apresenta afinidade intermediária, entre a da sTnC e a da F29W.

figura 30 Distâncias em Å entre os grupamentos carregados do Glu41 (em amarelo), Lys40 (em vermelho) e dois carbonos do anel da Phe29 (em magenta) da sTnC com os sítios I e II desocupados (A) e ocupados (B). No mutante F29HW é possível que a cadeia lateral do 5-HW aproxime o grupamento hidroxila dos oxigênios da cadeia lateral do Glu41. Surgiria assim uma rede de interações capaz de fixar a cadeia lateral do Glu41 entre as cadeias laterais do 5-HW na posição 29 e da Lys40. O íon Ca^{2+} ocupante do sítio I está representado em verde azulado.

O mutante F29ZW apresentou um nível intermediário para a afinidade dos sítios N terminais, entre aquela da F29W e sTnC (aproximadamente 2 vezes menor que a da F29W e 3 vezes maior que a sTnC, tabela 3). Estes dados se assemelham aos dados do mutante F29HW já que confirmam que a diminuição do caráter hidrofóbico do resíduo na posição 29, inicialmente da Phe para o Trp, não pode ser estendida como uma regra geral para explicar a influência da posição 29 sobre a afinidade dos sítios N terminais, e aponta para interações específicas do anel de 6 membros como um aspecto adicional. Tais interações só poderão ser sugeridas com a construção de um modelo estrutural do mutante F29ZW, e confirmadas apenas quando a estrutura tridimensional do mutante for determinada (o que, de modo geral, é válido também para os mutantes F29W e F29HW).

- Porque a mutação Asp→Ala na posição 30 não afeta a ligação do Ca^{2+} ao sítio II

Os mutantes D30A, F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A têm o sítio I inativo. Os dados mostram que a mutação Asp→Ala na posição 30 se restringe ao sítio I. O pCa no qual o número de íons Ca^{2+} ligados por molécula de proteína atinge 3 é praticamente o mesmo tanto nas proteínas D30A, F29W/D30A,

F29HW/D30A e F29ZW/D30A como nas proteínas com os dois sítios intactos (figura 24). A parte da curva de saturação entre os níveis de 2 e 3 íons Ca^{2+} ligados por molécula de proteína no caso das proteínas com os dois sítios intactos deve corresponder, a princípio, à ligação do Ca^{2+} ao sítio II. Nos mutantes D30A, F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A os valores de constante de dissociação variam de 3,1 a 5,8 μM . Essa é a primeira vez que, através de técnicas diretas, a ordem de ligação dos íons Ca^{2+} aos sítios regulatórios da TnC é determinada: o sítio II é o primeiro a ser ocupado e é a ele que deve ser associada a constante de afinidade de $\approx 2\mu\text{M}$ determinada por Li et al. (1995). A ordem de ligação de Ca^{2+} aos sítios regulatórios já havia sido proposta por Gagné et al. (1997) que construíram um mutante do domínio N terminal da sTnC onde o Glu41 havia sido substituído por Ala (mutante E41A). Li et al. (1997) determinaram as constantes de dissociação dos sítios I e II do mutante E41A como sendo respectivamente 1,3 mM e 15 μM . Nesse caso portanto, a mutação Asp→Ala na posição 41 diminui em aproximadamente 10 vezes a afinidade do sítio II pelo Ca^{2+} (a constante de dissociação passa de 2 para 15 μM). Os dados apresentados aqui mostram que a mesma substituição na posição 30 não afeta a afinidade do sítio II. Na estrutura

figura 31 Estrutura dos sítios I e II da sTnC sem Ca^{2+} . Destacam-se o Glu41 e o Asp66 em azul claro, a Lys40 em amarelo, a Thr39 em violeta e outros resíduos ácidos em vermelho. A seta pontilhada em laranja indica o movimento que a cadeia lateral da Lys40 pode realizar para se aproximar do Asp66 quando o Glu41 for substituído por Ala.

do domínio N da sTnC com os sítios I e II desocupados determinada por Herzberg & James (1988), o Glu41 interage com a Lys40 através de uma ponte salina, como já destacado acima (figura 30). No mutante E41A a Lys40 perde seu parceiro de interação e fica, teoricamente, livre para estabelecer contatos com outros resíduos. Curiosamente o resíduo ácido mais próximo da Lys40, depois do Glu41, é o Asp66, primeiro resíduo do sítio II (posição X). Uma rotação de 180° no ângulo χ_1 da Lys40 aproximaria o grupamento amino carregado do grupamento carboxílico do Asp66 a uma distância menor que $5 \text{ \AA}$ (figura 31). Tal rotação também aproximaria a parte hidrofóbica da cadeia lateral da Lys40 da cadeia lateral da Thr44, fornecendo assim um outro ponto de fixação para a nova orientação da Lys40. Se isso ocorre, a cadeia lateral do Asp66 teria que romper a interação com a Lys40 para poder coordenar o íon Ca^{2+} , o que seria visto como uma diminuição da afinidade do sítio II. Já o Asp30 se localiza (na estrutura do domínio N com os sítios I e II desocupados) distante de quaisquer resíduos do sítio II, de resíduos do sítio I que interagem com resíduos do sítio II (na pequena região de “ β -sheet” que se inicia na Gly35) ou de resíduos básicos de cadeia lateral longa, restringindo seu conjunto de interações não covalentes a resíduos componentes da

própria alça de ligação do sítio I (Asp32 e Gly34). Sua substituição por Ala provocaria, assim, mudanças restritas ao sítio I

- Porque a mutação na posição 29 se torna silenciosa quando o sítio I está inativo

A influência do resíduo na posição 29 sobre os padrões de ligação de Ca^{2+} é abolida quando o Ca^{2+} não se liga ao sítio I. Isso é demonstrado, como a conclusão do item anterior, pelo fato de as curvas dos experimentos de diálise de fluxo das proteínas D30A, F29W/D30A, F29HW/D30A e F29ZW/D30A se sobreporem. Como dito anteriormente, Gagné et al. (1997) sugeriram que a abertura do domínio N está associada à ligação de Ca^{2+} ao sítio I. As diferenças de afinidade entre as quatro proteínas com os sítios I e II intactos só se manifesta quando o sítio I é ocupado; significa dizer, na faixa de pCa analisada, quando o domínio N se abre. Portanto o resíduo da posição 29 deve alterar a energia necessária ou à rotação do Glu41 que precede a ligação de Ca^{2+} , como aventado para o mutante F29HW, ou alterando a estabilidade da estrutura da proteína na forma aberta, como sugerido para a F29W e F29ZW. É razoável relacionar, desse modo, toda diferença no padrão de ligação de Ca^{2+} às proteínas com os

sítios I e II intactos às diferenças nas afinidades dos sítios I (ver abaixo).

- Porque a mutação Asp→Ala na posição 66 impede a ligação de Ca^{2+} aos sítios II e I

Os dados apresentados aqui mostram que os mutantes D66A, F29W/D66A, F29HW/D66A e F29ZW/D66A (onde apenas o sítio II perdeu o resíduo da posição X) têm um padrão muito semelhante aos mutantes D30A/D66A, F29W/D30A/D66A, F29HW/D30A/D66A e F29ZW/D30A/D66A. Todos esses oito mutantes ligam apenas 2 íons Ca^{2+} . De algum modo, portanto, a inativação do sítio II leva à inativação do sítio I. Uma possibilidade é que a modificação estrutural provocada pela mutação Asp→Ala na posição 66 se propague aos resíduos do sítio I. Outra possibilidade é que, como postulado por Li et al. (1995), o primeiro sítio a ser ocupado é o sítio II e que essa ocupação, apesar de provocar apenas pequenas modificações na estrutura do domínio N, “ajusta” o sítio I para a ocupação. Se assim for, a inativação do sítio II “travaria” o sítio I numa estrutura incapaz de ligar Ca^{2+} . Gagné et al. (1997) citaram dados não publicados de S. M. Gagné, J. Pearlstone e B. D. Sykes que indicavam que num mutante onde o Glu77 (posição -Z do sítio II) havia sido substituído por Ala (análoga à mutação

Glu→Ala na posição 41 do sítio I) tanto o sítio I como o II perdiam a capacidade de ligar Ca^{2+} . Tal dado enfraquece a primeira possibilidade (da propagação das modificações estruturais causadas pela mutação Asp→Ala na posição 66 até os resíduos do sítio I) pois é improvável que a estrutura do sítio I seja igualmente dependente tanto do Asp66 como do Glu77. Torna-se mais razoável pensar que a estrutura do sítio I seja dependente do conjunto de modificações estruturais associadas à ligação do Ca^{2+} ao sítio II. Tal ligação sim, seria bloqueada por mutações individuais em diferentes resíduos do sítio II.

A dependência da ligação do Ca^{2+} ao sítio I da ligação prévia do Ca^{2+} ao sítio II só pode ser considerada se existir entre os dois sítios uma interação essencial (ou uma rede de interações). Pode-se observar que no estado apo há quatro pontes de hidrogênio entre carbonilas e NH's da cadeia principal dos sítios I e II. No estado ligado, há três pontes de hidrogênio (figura 32). Os resíduos participantes são a Gly35, Ile37 e Thr39 (do sítio I) interagindo respectivamente com Phe75, Ile73 e Gly71 (do sítio II). Os ângulos Φ e Ψ dos resíduos desses segmentos adotam valores característicos de "β-strand". A interação entre eles dá origem a uma pequena "β-sheet" antiparalela. A ponte de hidrogênio entre a Thr39 e a Gly71 é

figura 32 O elo estrutural entre os sítios I e II. Nos 2 primeiros esquemas estão destacadas (sem e com Ca^{2+}) as pontes de hidrogênio que formam a "β-sheet" entre os sítios N. No esquema 3 é apresentada uma vista de baixo pra cima (com o fim da hélice D mais próxima do leitor) da modificação da "β-sheet" do domínio N causada pela ligação de Ca^{2+} .

rompida com a ligação do Ca^{2+} e uma molécula de água se insere entre os dois resíduos. Também como resultado da ligação de Ca^{2+} as duas pontes de hidrogênio entre a Ile37 e a Ile73 se tornam menores (diminuição média de 0.3 Å) e há a aproximação das cadeias alifáticas, muito provavelmente ampliando a interação de Van der Waals entre esses resíduos.

No entanto, apesar de as estruturas do domínio N desocupado e ocupado pelos dois íons Ca^{2+} revelar que existe um acoplamento estrutural entre os dois sítios, elas não revelam o essencial: qual o padrão de interações entre os dois sítios quando o sítio II está ocupado e o sítio I ainda não foi ocupado. É essa estrutura parcialmente ocupada que mostrará qual padrão (essencial à ligação de Ca^{2+} ao sítio I) surge quando ocorre a ligação do Ca^{2+} ao sítio II.

A conclusão marcante desse modo de ocupação dos sítios do domínio regulatório da TnC é que o sítio I desocupado deve existir em duas formas alternativas: uma com o sítio II desocupado e outra com o sítio II ocupado. Podemos nos referir respectivamente a essas formas como sítio I "pré" e forma sítio I "pós". Os dados com os mutantes D/A's mostram que essas formas alternativas têm afinidades bem diferentes pelo Ca^{2+} pois tanto o sítio II como o sítio I são preenchidos quase que

completamente na sTnC e nos mutantes F29's em concentrações de Ca^{2+} livre menores que 10^{-4} M (pCa 4). Nessas proteínas o sítio I que se liga ao Ca^{2+} está na forma "pós". Nos mutantes D66A ou F29's/D66A, onde apenas o sítio II foi mutado e, por causa disso, o sítio I se encontra na forma "pré" tal ocupação não ocorre e o nível de saturação permanece em 2 Ca^{2+} ligados por molécula de proteína em pCa 4.

- porque não se detectam nem a diferença de afinidade nem a cooperatividade entre os sítios I e II através de técnicas diretas.

Li et al. (1995) foram os primeiros a sugerir que os sítios I e II tinham afinidades diferentes pelo Ca^{2+} . Também sugeriram que a ocupação dos dois sítios era sequencial e independente, ou seja, haveria ausência de cooperatividade entre eles. No entanto a obrigatoriedade da ocupação do sítio II para a posterior ocupação do sítio I significa, obviamente, que há cooperatividade. Aparentemente os dados de RMN obtidos por Li et al. (1995) permitiram apenas a identificação das diferenças de afinidade mas não a cooperatividade entre os sítios I e II. Já os experimentos de ligação direta não detectaram nem a diferença de afinidades nem a cooperatividade. Quanto aos experimentos de ligação direta é importante ressaltar os limites

figura 33 Análise teórica da influência de modelos de ligação diferentes sobre o perfil dos dados obtidos por técnicas diretas.

de detecção dessas técnicas. A figura 33-A mostra gráficos teóricos construídos para uma proteína hipotética (PnX) com quatro sítios para ligação do Ca^{2+} . Dois desses sítios têm alta afinidade (constante de dissociação de 10^{-6} M) e um sítio tem constante de afinidade de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Ao sítio restante foram designadas afinidades variáveis ($5 \cdot 10^{-5}$ M, $1 \cdot 10^{-4}$ M, $2 \cdot 10^{-4}$ M e $4 \cdot 10^{-4}$ M). Cada conjunto de dados reflete assim a

(equação 7)

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{PnX}]} = \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}{K_{d1} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}{K_{d21} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}{K_{d22} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}$$

ligação de Ca^{2+} a 4 proteínas diferentes apenas na afinidade de um dos sítios. Todos os gráficos foram obtidos utilizando a equação 7

A dificuldade se torna evidente quando se observa que na figura 33-B estão apresentados dados, também construídos teoricamente para a mesma proteína hipotética, obtidos com a

(equação 8)

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{PnX}]} = \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}{K_{d1} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}} + \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}{K_{d2} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}}$$

suposição que os quatro sítios para ligação do Ca^{2+} se dividem em duas classes, cada uma com dois sítios. A equação 8 foi a utilizada na geração dos dados. A constante de dissociação dos sítios de uma das classes (K_{d1}) é 10^{-6} M e variou-se a constante de dissociação dos sítios da outra classe (K_{d2}) (mantendo-se iguais entre

ambos) de $5 \cdot 10^{-5}$ M até $1,4 \cdot 10^{-4}$ M. Na figura 33-C sobrepõem-se os gráficos A e B. Por dois motivos principais fica clara a inviabilidade de, só se dispondo de dados de ligação direta, decidir-se sobre qual o modelo aplicável à proteína PnX: primeiro, e mais importante, a taxa intrínseca de erro dos ensaios de ligação direta são maiores que as diferenças entre algumas curvas dos dois diferentes modelos e, segundo, o processo de ajuste dos pontos à equação escolhida não é capaz de diferenciar entre os modelos baseando-se num parâmetro explícito de qualidade do ajuste. Nessa situação é costume optar-se pelo modelo mais simples que, nesse caso, é o de apenas duas classes de sítios, cada uma com uma constante de dissociação.

A mesma linha de raciocínio pode ser usada para se justificar a não observação de cooperatividade entre os sítios N. Podem ser construídos gráficos teóricos para uma proteína com duas classes de sítios, cada classe com dois sítios de afinidades iguais quando ambos estão desocupados ($K_{a1[1,0]}$ e $K_{a2[1,0]}$, constantes de associação) e que apresenta cooperatividade, de modo que a ligação de um Ca^{2+} a um dos sítios aumenta em L_1 ou L_2 vezes as constantes de associação $K_{a1[1,0]}$ ou $K_{a2[1,0]}$ do sítio da mesma

figura 34 A relação entre cooperatividade e coeficiente de Hill. No gráfico A os dados foram obtidos com o uso da equação 9. No gráfico B os mesmos dados foram ajustados à equação de Hill (equação 10). A curva obtida está representada pela linha contínua.

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{PnX}]} = \frac{2K_{a1}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}(1 + K_{a1}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}})}{L_1 + 2K_{a1}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + K_{a1}^2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2} + \frac{2K_{a2}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}(1 + K_{a2}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}})}{L_2 + 2K_{a2}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + K_{a2}^2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2} \quad (\text{equação 9})$$

figura 35 Os dados obtidos pela equação 9 podem ser ajustados com a equação 8, desprezando parâmetros de cooperatividade, com razoável sobreposição.

(equação 10)

classe, resultando na constante de associação K_{a1} ou K_{a2} , (ou seja, $K_{a1} = L_1 \cdot K_{a1[1,0]}$ e $K_{a2} = L_2 \cdot K_{a2[1,0]}$) respectivamente. Utiliza-se a equação 9. A figura 34-A mostra dados obtidos através da equação 9. Ali mantiveram-se os valores das constantes de associação para o primeiro Ca^{2+} de cada classe ($K_{a1[1,0]} = 10^7$ e $K_{a2[1,0]} = 10^5$) e variaram-se os parâmetros de cooperatividade L_1 e L_2 de 2 a 10 (intervalos de 2) e de 1 a 5 (intervalos de 1) respectivamente. Na figura 34-B os dados apresentados no painel A foram ajustados à fórmula de Hill (equação 10). O ajuste pela fórmula de Hill é eficiente, como mostra a sobreposição dos dados com a linha contínua, o que explica seu uso frequente, apesar de traduzir os parâmetros explícitos de cooperatividade L_1 e L_2 nos parâmetros n_1 e n_2 , que não refletem de modo direto a influência da ocupação de um sítio na afinidade do outro. Um aumento de duas vezes provocado pela ligação

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{PnX}]} = \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n_1}}{K_{d1}^{n_1} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n_1}} + \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n_2}}{K_{d2}^{n_2} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n_2}}$$

do primeiro Ca^{2+} em um dos sítios de um dos domínios ($L=2$) se traduz num coeficiente de Hill de 1,15; um aumento de 10 vezes ($L=10$) resulta em um $n = 1,48$. Se os mesmos dados da figura 34-A forem ajustados pela equação 8, que não inclui nenhum parâmetro de

cooperatividade, haverá um razoável grau de sobreposição, como mostra a figura 35. Apenas técnicas com baixos erros intrínsecos e a construção de curvas com alta densidade de pontos podem ser eficazes na identificação de efeitos cooperativos, como descrito por Iida (1988).

No entanto, todas as equações anteriormente apresentadas não refletem o modelo que postulamos para a relação entre os sítios I e II da TnC (modelo sequencial obrigatório). Em todas as equações que explicitavam um parâmetro indicador de cooperatividade as afinidades dos dois sítios acoplados antes da ligação do primeiro Ca^{2+} eram iguais. Na situação real para a TnC, propomos que o sítio I é virtualmente não funcional e completamente dependente da ligação do Ca^{2+} ao sítio II. A figura 36 ilustra a diferença entre as duas situações. No caso da relação entre os sítios do domínio N da TnC não há possibilidade de o primeiro Ca^{2+} ligar-se ao sítio I, de modo que a constante de associação para esse evento ($K_{1,1}$) é zero.

Uma equação que traduz a ocupação do domínio N da TnC segundo esse modelo é

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{N-TnC}]} = \frac{K_{d12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}{K_{d12}K_{d21} + K_{d12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}$$

(equação 11)

figura 36 Modelos diferentes para a associação de um ligante a uma proteína, ou domínio, com dois sítios. Em A os dois sítios da PnX (aqui capaz de se ligar a apenas dois Ca^{2+}) são equivalentes. Em B, o sítio II tem que ser obrigatoriamente ocupado primeiro, ou seja, a constante de associação K_{11} é zero. N-TnC é o domínio N da TnC.

onde todas as constantes são de dissociação.
A equação completa para a ligação de Ca^{2+} à sTnC é

(equação 12)

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ligado}}}{[\text{TnC}]} = \frac{2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n1}}{K_{d1}^{n1} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^{n1}} + \frac{K_{d12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + 2[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}{K_{d12}K_{d21} + K_{d12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}$$

	●	■	▲
$K_{d1} \cdot (10^7 \cdot \text{M}^{-1})$	5	5	5
$K_{d21} \cdot (10^7 \cdot \text{M}^{-1})$	15	50	30
$K_{d12} \cdot (10^7 \cdot \text{M}^{-1})$	15	500	100

figura 37 Exemplos de três proteínas que se comportam segundo modelo representado pela equação 12: dois sítios equivalentes de alta afinidade pelo Ca^{2+} ($K_{d1}=5 \cdot 10^{-7} \text{M}$), com cooperatividade (coeficiente de Hill de 1,2), um sítio de menor afinidade (K_{d21}) cuja ocupação é essencial para a ocupação do sítio restante, com constante de dissociação K_{d12} . (valores usados na geração dos dados estão indicados na tabela).

O primeiro termo do lado direito da equação 12 representa a ligação do Ca^{2+} aos sítios do domínio C, III e IV. Assumiu-se ali equivalência entre os sítios e representou-se a cooperatividade pelo coeficiente de Hill. O segundo termo representa a ligação de Ca^{2+} aos sítios II e I segundo o modelo sequencial obrigatório. Usando a equação 12 na geração de dados teóricos obtêm-se os gráficos da figura 37. Simulou-se o padrão de ligação a três proteínas diferentes que obedeceriam ao mesmo modelo proposto para a TnC. Repetindo as situações anteriores, também esses conjuntos de dados teóricos podem ser ajustados usando a equação de Hill (equação 10) como mostra a figura 38. Se esse procedimento for adotado, todos os valores de coeficiente de Hill para os sítios de menor afinidade variam de 0,82 a 1,27, apesar de existir a mesma relação de dependência funcional do sítio I.

- O que os dados de fluorescência indicam.

O modelo que postulamos aqui para as TnC's com os sítios I e II intactos é que o sítio I é virtualmente não funcional e que toda diferença entre os padrões de ligação da sTnC, F29W, F29HW e F29ZW observados nos ensaios de ligação direta advém de diferenças na barreira energética que separa a forma aberta e fechada do domínio N, ou seja, advém de diferenças de afinidade do sítio I. Evidentemente os dados obtidos a partir de um sistema que obedeça a esse modelo podem ser ajustados (como demonstrado acima e como de fato foram, à exceção dos dados de fluorescência do mutante F29ZW, ver **Materiais e Métodos**) pelo modelo mais simples de duas classes de sítios cada uma com dois sítios de afinidades iguais e sem ligação sequencial obrigatória. Portanto são necessários dados adicionais que justifiquem a adoção desse modelo mais complexo. Tais dados foram obtidos a partir de titulações seguidas por fluorescência dos mutantes com substituições Asp→Ala na posição 30 e também por ensaios de ligação direta com as mesmas proteínas e o mutante D30A. Antes, no entanto, é importante ressaltar que um comportamento peculiar na variação de fluorescência do mutante F29ZW era esperado já que a fotofísica do 7-ZW é a mais complexa dos três cromóforos

	●	■	▲
$K_{d1} \cdot (10^7 \cdot M^{-1})$	5,7	5,1	5,0
n_1	1,1	1,2	1,2
$K_{d2} \cdot (10^7 \cdot M^{-1})$	13	158	55
n_2	1,27	0,83	1,04

figura 38 Parâmetros preditos (tabela) ao se ajustarem valores gerados com a equação 12 e parâmetros da figura 37, com a equação de Hill (equação 8). É fundamental observar-se que as curvas preditas (linhas contínuas) têm um alto grau de aderência aos valores gerados, representados pelos símbolos.

usados, com elevados rendimento quântico e sensibilidade de comprimento de emissão máxima a mudanças no microambiente (Ross et al., 1997). Rosenfeld & Taylor (1985) comunicaram uma variação bimodal de fluorescência usando a TnC de músculo esquelético de coelho marcada na Cys-98 com IANBD, (4-(N-iodoacetoxietil-N-metil-7-nitro-benz-2-oxa-1,3-diazole)) que ocorria em baixas forças iônicas (sem KCl) e era ausente em KCl 100 mM. As titulações apresentadas aqui foram todas feitas em KCl 100 mM, o que reforça a hipótese de o comportamento bimodal da variação de fluorescência do F29Z_W não ser causado por sutis variações na força iônica que acompanham as adições de Ca²⁺. Embora uma curva bimodal coloque problemas de ordem de significância estatística para o procedimento de ajuste, as duas partes da curva de titulação com Ca²⁺ seguida por fluorescência podem ser relacionadas à ligação de Ca²⁺ ao sítio II e sítio I na estrutura "pós". Uma indicação de que o aumento da fluorescência do F29Z_W não é causado pela ligação de Ca²⁺ aos sítios C terminais é que ela continua bem além do nível de saturação equivalente a dois cálcios ligados por molécula de proteína. Além disso, a presença de MgCl₂ 2 mM não altera significativamente o pCa_{1/2} da transição (dados não apresentados). A figura 26, painel C, mostra

as curvas de titulação de Ca^{2+} seguidas por fluorescência dos mutantes F29W e F29W/D30A. Essas transições ocorrem na mesma faixa de pCa, mas a transição do mutante F29W apresenta um coeficiente de Hill um pouco maior (tabela 4). A figura 26, painel D, mostra as variações de fluorescência dos mutantes F29HW e F29HW/D30A. A transição do mutante F29HW ocorre aproximadamente 0,7 unidades de pCa acima da transição do mutante F29HW/D30A. A figura 26, painel E compara as titulação de Ca^{2+} seguidas por fluorescência dos mutantes F29ZW e F29ZW/D30A. A mudança de fluorescência do mutante F29ZW/D30A tem um $\text{pCa}_{1/2}$ próximo a 5,6, o que resulta numa constante de dissociação próxima a $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, que é da mesma ordem de grandeza das constantes de dissociação dos mutantes F29W/D30A e F29HW/D30A. Todos esses dados citados acima, de variação de fluorescência dos mutantes F29W, F29HW e F29ZW, são ajustados com razoável grau de eficácia usando o modelo sequencial. A figura 39 mostra todos os dados ajustados pelo modelo sequencial juntamente com os valores escolhidos para os parâmetros K_{d21} (constante de dissociação do sítio II), K_{d12} (constante de dissociação do sítio I “pós”), f_{12} (aumento de fluorescência provocado pela ligação do Ca^{2+} ao sítio I) e f_{21}

	F29W	F29HW	F29ZW
K_{d21} $\cdot (10^7 \cdot \text{M}^{-1})$	15	50	59
K_{d12} $\cdot (10^7 \cdot \text{M}^{-1})$	30	180	81
f_{12}	103	98	75
f_{21}	-	-	260

figura 39 As linhas contínuas representam o conjunto de dados gerados com a equação 13 (mutantes F29W e F29HW) ou 14 (mutante F29ZW), utilizando os parâmetros da tabela. Os dados obtidos experimentalmente estão representados por símbolos (○ para a F29W, □ para a F29HW e △ para o F29ZW)

(equação 13)

	F29W	F29HW	F29ZW
K_{d1} *(10 ⁷ *M ⁻¹)	5	5	5
K_{d21} *(10 ⁷ *M ⁻¹)	30	200	59
K_{d12} *(10 ⁷ *M ⁻¹)	30	400	81

figura 40 As linhas contínuas representam o conjunto de dados gerados com a equação 12 utilizando os parâmetros da tabela. Os dados obtidos experimentalmente estão representados por símbolos (○ para a F29W, □ para a F29HW e △ para o F29ZW)

$$\Delta F\% = \frac{f_{12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}{K_{d12}K_{d21} + K_{d12}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}} + [\text{Ca}^{2+}]_{\text{livre}}^2}$$

(aumento de fluorescência provocado pela ligação do Ca²⁺ ao sítio II). A equação 13 foi usada para os mutantes F29W e F29HW. Assumindo que a variação de fluorescência do mutante F29ZW pode ser relacionada a um aumento da fluorescência devido à ligação de cálcio ao sítio II e um concomitante decréscimo da fluorescência com a ligação de cálcio ao sítio I “pós”, utilizamos para a simulação desse mutante a equação 6 (a mesma descrita em **Materiais e Métodos**). No caso particular do mutante F29W, o coeficiente de Hill predito é 1,2 (contra 1,3 ± 0,1 da tabela 4).

- Podem-se simular também os dados de diálise de fluxo

De maneira análoga podemos obter dados gerados por equações que representam o modelo sequencial e que sejam compatíveis com os dados de diálise de fluxo. A figura 40 ilustra tal simulação, gerada com a equação 12 e representada pelas linhas contínuas, juntamente com os dados experimentais da figura 23-A. Os parâmetros usados para a simulação estão destacados logo abaixo do gráfico. As maiores discrepâncias são com relação ao mutante F29HW.

Baseando-nos nos parâmetros utilizados em todas essas simulações concluímos que a afinidade do sítio I “pós” da F29W é aproximadamente igual ou pouco menor que a afinidade do sítio II. Descartamos a hipótese de o aumento de fluorescência ser causado pela ligação de Ca^{2+} a qualquer um dos sítios pelo fato de 50% do aumento de fluorescência ocorrer entre os níveis de saturação de Ca^{2+} três e quatro. Uma equipartição do aumento da fluorescência para a ligação de Ca^{2+} a cada sítio nos parece pouco provável. Para o mutante F29ZW as simulações também indicam que o sítio I “pós” tem afinidade próxima à do sítio II. Para o mutante F29HW as simulações utilizando os dados de fluorescência indicaram constantes de dissociação três vezes menores que as indicadas pela simulação dos dados de diálise de fluxo tanto para o sítio II como para o sítio I “pós”. No entanto ambas indicam que o sítio I “pós” tem afinidade de duas a três vezes menor que a afinidade do sítio II. A simulação da sTnC (não mostrada) indica valores de $K_{d21} = K_{d12} = 2 \cdot 10^{-5}$ M. No entanto esses valores devem ser vistos ainda com mais cautela, pois não podem ser apoiados por valores correspondentes de ensaios de fluorescência.

- Conclusões

Tentou-se mostrar aqui que apesar de se ter escolhido para o ajuste dos dados de

fluorescência e diálise de fluxo a equação de Hill (com a exceção dos dados de fluorescência do mutante F29ZW), e que desse ajuste os parâmetros de cooperatividade e constantes de afinidade terem sido preditos (**Resultados**), modelos alternativos fornecem ajustes de qualidade semelhante, apesar de as premissas e, obviamente, os parâmetros obtidos serem radicalmente diferentes.

Os dados apresentados indicam que a posição 29 influencia a afinidade por Ca^{2+} dos sítios N terminais da TnC. Os sítios N terminais do mutante F29W têm afinidade maior que os sítios da sTnC, enquanto que a adição de 5-HW reverte esse aumento. A incorporação de 7-ZW, resulta numa afinidade intermediária dos sítios N terminais, entre as afinidades da F29W e sTnC. Os dados de ligação direta de Ca^{2+} aos mutantes D/A sugerem que o sítio I é não funcional sem a ligação prévia do Ca^{2+} ao sítio II. Juntamente com os dados de fluorescência, os dados de ligação direta indicam que as diferenças entre as afinidades dos sítios N terminais da sTnC e F29's podem ser consequência das diferenças de afinidade entre os sítios I "pós", com possíveis reflexos na afinidade do sítio II. Os dados provenientes das titulações de Ca^{2+} seguidas por fluorescência apóiam as conclusões acima. Os dados de fluorescência dos mutantes F29W e F29HW

podem ser explicados assumindo uma ligação sequencial do Ca^{2+} (primeiro ao sítio II) com a ligação do Ca^{2+} ao sítio I sendo a causa do aumento de fluorescência. A forma bimodal da variação de fluorescência provocada pela ligação de Ca^{2+} ao mutante F29ZW é devido a um aumento da fluorescência associado à ligação de Ca^{2+} ao sítio II e um subsequente decréscimo de fluorescência associado à ligação de Ca^{2+} ao sítio I “pós”. Os dados apresentados aqui, obtidos por diálise de fluxo e/ou por titulações acompanhadas por fluorescência são essenciais para permitir uma comparação direta entre proteínas tipo selvagem e mutantes que servem como sondas fluorescentes, e, principalmente, por permitir a relação de dados indiretos com diferentes níveis de saturação de ligante.

PÁGINA
EM
BRANCO

BIBLIOGRAFIA

- Barlati, S. e Ciferri, O. (1970). Incorporation of 5-methyl- and 5-hydroxy-tryptophan into the protein of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **101**, 166-172.
- Chandra, M., da Silva, E. F., Sorenson, M. M., Ferro, J. A., Pearlstone, J. R., Nash, B. E., Borgford, T., Kay, C. M., e Smillie, L. B. (1994). The effects of N helix deletion and mutant F29W on the Ca^{2+} binding and functional properties of chicken skeletal muscle troponin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14988-14994.
- Chandra, M., McCubbin, W. D., Oikawa, K., Kay, C. M., e Smillie, L. B. (1994)a. Ca^{2+} , Mg^{2+} , and troponin I inhibitory peptide binding to a Phe-154 to Trp mutant of chicken skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* **33**, 2961-2969.
- Da Silva, A. C., de Araujo, A. H., Herzberg, O., Moulton, J., Sorenson, M., e Reinach, F. C. (1993). Troponin-C mutants with increased calcium affinity. *Eur. J. Biochem* **213**, 599-604.
- De La Cruz, E., M., Mandinova, A., Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Aebi, U. e Pollard, T. D. (2000). Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J. Mol. Biol.* **295**, 519-526.
- Drapeau, G. R., Brammar, W. J., e Yanofsky, C. (1968). Amino acid replacements of the glutamic acid residue at position 48 in the tryptophan synthetase A protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol* **35**, 357-367.
- Ellis, P. D., Marchetti, P. S., Strang, P., e Potter, J. D. (1988). Cadmium-substituted skeletal troponin C metal binding investigations and sequence assignment of the cadmium-113 resonances. *J. Biol. Chem.* **263**, 10284-10288.

- Farah, C. S., Miyamoto, C. A., Ramos, C. H., da Silva, A. C., Quaggio, R. B., Fujimori, K., Smillie, L. B., e Reinach, F. C. (1994). Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.* **269**, 5230-5240.
- Farah, C. S. e Reinach, F. C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* **9**, 755-767.
- Farah, C. S. e Reinach, F. C. (1999). Regulatory properties of recombinant tropomyosins constaining 5-hydroxytryptophan: Ca²⁺-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. *Biochemistry* **38**, 10543-10551.
- Foote, J., Ikeda, D. M., e Kantrowitz, E. R. (1980). The role of tryptophan in aspartate transcarbamylase. *J. Biol. Chem.* **255**, 5154-5158.
- Fredricksen, R. S. e Swenson, C. A. (1996). Relationship between stability and function for isolated domains of troponin C. *Biochemistry* **35**, 14012-14026.
- Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moulton, J., e Reinach, F. C. (1990). Probing the calcium-induced conformational transition of troponin C with site-directed mutants [see comments]. *Nature* **345**, 182-184.
- Gagne, S. M., Tsuda, S., Li, M. X., Smillie, L. B., e Sykes, B. D. (1995). Structures of the troponin C regulatory domains in the apo and calcium-saturated states. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 784-789.
- Gagne, S. M., Li, M. X. e Sykes, B. D. (1997). Mechanism of direct coupling between binding and induced structural change in regulatory calcium binding proteins. *Biochemistry* **36**, 4386-4392.
- Golosinska, K., Pearlstone, J. R., Borgford, T., Oikawa, K., Kay, C. M., Carpenter, M. R., e Smillie, L. B. (1991). Determination of and

- corrections to sequences of turkey and chicken troponins-C. Effects of Thr-130 to Ile mutation on Ca^{2+} affinity. *J. Biol. Chem.* **266**, 15797-15809.
- Gordon, A. M., Homsher, E. e Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* **80**, 853-924.
- Grabarek, Z. e Gergely, J. (1983). Appendix. On the applicability of Hill type analysis to fluorescence data. *J. Biol. Chem.* **258**, 14103-14105.
- Grabarek, Z., Grabarek, J., Leavis, P. C., e Gergely, J. (1983). Cooperative binding to the Ca^{2+} -specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.* **258**, 14098-14102.
- Grabarek, Z., Leavis, P. C., e Gergely, J. (1986). Calcium binding to the low affinity sites in troponin C induces conformational changes in the high affinity domain. A possible route of information transfer in activation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **261**, 608-613.
- Grabarek, Z., Tan, R. Y., Wang, J., Tao, T., e Gergely, J. (1990). Inhibition of mutant troponin C activity by an intra-domain disulphide bond [see comments]. *Nature* **345**, 132-135.
- Griffiths, P. J., Potter, J. D., Coles, B., Strang, P., e Ashley, C. C. (1984). Fluorescence changes from single striated muscle fibres injected with labelled troponin C (TnCDANZ). *FEBS Lett.* **176**, 144-150.
- Gusev, N. B., Grabarek, Z., e Gergely, J. (1991). Stabilization by a disulfide bond of the N-terminal domain of a mutant troponin C (TnC48/82). *J. Biol. Chem.* **266**, 16622-16626.
- Guth, K. e Potter, J. D. (1987). Effect of rigor and cycling cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca^{2+} affinity of the Ca^{2+} -specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J. Biol. Chem.* **262**, 13627-13635.

- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- Heidorn, D. B. e Trewheella, J. (1988). Comparison of the crystal and solution structures of calmodulin and troponin C. *Biochemistry* **27**, 909-915.
- Herzberg, O. e James, M. N. (1985). Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature* **313**, 653-659.
- Herzberg, O. e James, M. N. (1988). Refined crystal structure of troponin C from turkey skeletal muscle at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **203**, 761-779.
- Herzberg, O. Moulton, J. e James, M. N. (1986). A model for the Ca²⁺-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **261**, 2638-2644.
- Heyduk, E. e Heyduk, T. (1993). Physical studies on interaction of transcription activator and RNA- polymerase: fluorescent derivatives of CRP and RNA polymerase. *Cell Mol. Biol Res.* **39**, 401-407.
- Hogue, C. W., Rasquinha, I., Szabo, A. G., e MacManus, J. P. (1992). A new intrinsic fluorescent probe for proteins. Biosynthetic incorporation of 5-hydroxytryptophan into oncomodulin. *FEBS Lett.* **310**, 269-272.
- Hogue, C. W. e Szabo, A. G. (1993). Characterization of aminoacyl-adenylates in *B. subtilis* tryptophanyl- tRNA synthetase, by the fluorescence of tryptophan analogs 5- hydroxytryptophan and 7-azatryptophan. *Biophys. Chem.* **48**, 159-169.
- Houdusse, A., Love, M. L., Dominguez, R., Grabarek, Z. e Cohen, C. (1997). Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily. *Structure* **5**, 1695 - 1701.

- Huxley, H. (1998). Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 84-87.
- Iida, S. (1988). Calcium binding to troponin C. II. A Ca^{2+} ion titration study with a Ca^{2+} ion sensitive electrode. *J. Biochem.* **103**:482-486.
- Jahnke, U. e Heilmeyer, L. M. Jr (1980). Comparison of the Mg^{2+} and Ca^{2+} binding properties of troponin complexes P1-TI2C and TI2C. *Eur. J. Biochem.* **111**, 325-332.
- Johnson, J. D., Collins, J. H., e Potter, J. D. (1978). Dansylaziridine-labeled troponin C. A fluorescent probe of Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} -specific regulatory sites. *J. Biol. Chem.* **253**, 6451-6458.
- Keleti, D., Rao, V. G., Su, H., Akella, A. B., Ding, X. L., e Gulati, J. (1994). Disparate contributions of Tyr10 and Tyr109 to fluorescence intensity of rabbit skeletal muscle troponin C identified using a genetically engineered mutant. *FEBS Lett.* **354**, 135-139.
- Kretsinger, R. H. e Nockolds, C. E (1973). Carp muscle calcium-binding protein: II. structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* **248**, 3313-3326.
- Leavis, P. C., Rosenfeld, S. S., Gergely, J., Grabarek, Z., e Drabikowski, W. (1978). Proteolytic fragments of troponin C. Localization of high and low affinity Ca^{2+} binding sites and interactions with troponin I and troponin T. *J. Biol. Chem.* **253**, 5452-5459.
- Li, M. X., Chandra, M., Pearlstone, J. R., Racher, K. I., Trigo-Gonzalez, G., Borgford, T., Kay, C. M., e Smillie, L. B. (1994). Properties of isolated recombinant N and C domains of chicken troponin C. *Biochemistry* **33**, 917-925.

- Li, M. X., Gagne, S. M., Tsuda, S., Kay, C. M., Smillie, L. B., e Sykes, B. D. (1995). Calcium binding to the regulatory N-domain of skeletal muscle troponin C occurs in a stepwise manner. *Biochemistry* **34**, 8330-8340.
- Li, M. X., Gagne, S. M., Spyrapoulos, L., Kloks, P. A. M. C., Audette, G., Chandra, M., Solaro, R. J., Smillie, L. B., e Sykes, B. D. (1997). NMR studies of Ca^{2+} binding to the regulatory domains of cardiac and E41A skeletal muscle troponin C reveal the importance of site I to energetics of the induced structural changes. *Biochemistry* **36**, 12519-12525.
- Moncrieffe, M. C., Eaton, S., Bajzer, Haydock, C., Potter, J. D., Laue, T. M., e Prendergast, F. G. (1999). Rotational and Translational Motion of Troponin C. *J. Biol. Chem.* **274**, 17464-17470.
- Pearlstone, J. R., McCubbin, W. D., Kay, C. M., Sykes, B. D., e Smillie, L. B. (1992). Spectroscopic analysis of a methionine-48 to tyrosine mutant of chicken troponin C. *Biochemistry* **31**, 9703-9708.
- Pearlstone, J. R., Borgford, T., Chandra, M., Oikawa, K., Kay, C. M., Herzberg, O., Moulton, J., Herklotz, A., Reinach, F. C., e Smillie, L. B. (1992). Construction and characterization of a spectral probe mutant of troponin C: application to analyses of mutants with increased Ca^{2+} affinity. *Biochemistry* **31**, 6545-6553.
- Perry, S. V., Cole, H. A., Head, J. F., e Wilson, F. J. (1972). Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **37**, 251-262.
- Potter, J. D. e Gergely, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **250**, 4628-4633.
- Potter, J. D., Robertson, S. P., e Johnson, J. D. (1981). Magnesium and the regulation of muscle contraction. *Fed. Proc.* **40**, 2653-2656.

- Pratt, E. A. e Ho, C. (1975). Incorporation of fluorotryptophans into proteins of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **14**, 3035-3040.
- Reinach, F. C. e Karlsson, R. (1988). Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* **263**, 2371-2376.
- Rosenfeld, S. S. e Taylor, E. W. (1985). Kinetic studies of calcium and magnesium binding to troponin C. *J. Biol. Chem.* **260**, 242-251.
- Ross, J. B., Senear, D. F., Waxman, E., Kombo, B. B., Rusinova, E., Huang, Y. T., Laws, W. R., e Hasselbacher, C. A. (1992). Spectral enhancement of proteins: biological incorporation and fluorescence characterization of 5-hydroxytryptophan in bacteriophage lambda cI repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 12023-12027.
- Ross, J. B., Szabo, A. G., e Hogue, C. W. (1997). Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: fluorescence spectroscopy of protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Methods Enzymol.* **278**, 151-190.
- Slupsky, C. M. e Sykes, B. D. (1995). NMR solution structure of calcium-saturated skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* **34**, 15953-15964.
- Soumillion, P., Jespers, L., Vervoort, J., e Fastrez, J. (1995). Biosynthetic incorporation of 7-azatryptophan into the phage lambda lysozyme: estimation of tryptophan accessibility, effect on enzymatic activity and protein stability. *Protein Eng.* **8**, 451-456.
- Strynadka, N. C., Cherney, M., Sielecki, A. R., Li, M. X., Smillie, L. B., e James, M. N. (1997). Structural details of a calcium-induced molecular switch: X-ray crystallographic analysis of the calcium-saturated N-terminal domain of troponin C at 1.75 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **273**, 238-255.

- Studier, F. W. e Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., e Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Teleman, O., Drakenberg, T., Forsen, S., e Thulin, E. (1983). Calcium and cadmium binding to troponin C. Evidence for cooperativity. *Eur. J. Biochem.* **134**, 453-457.
- Tobacman, L. S. (1996). Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 447-481.
- Trigo-Gonzalez, G., Racher, K., Burtnick, L., e Borgford, T. (1992). A comparative spectroscopic study of tryptophan probes engineered into high- and low-affinity domains of recombinant chicken troponin C. *Biochemistry* **31**, 7009-7015.
- Wang, C. K., Liao, R., e Cheung, H. C. (1993). Rotational dynamics of skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* **268**, 14671-14677.
- Wang, C. L., Tao, T., e Gergely, J. (1982). The distance between the high affinity sites of troponin-C measured by interlanthanide ion energy transfer. *J. Biol. Chem.* **257**, 8372-8375.
- Wang, C. L., Leavis, P. C., e Gergely, J. (1983). Kinetics of Ca^{2+} release shows interactions between the two classes of sites of troponin-C. *J. Biol. Chem.* **258**, 9175-9177.
- Wong, C. Y. e Eftink, M. R. (1997). Biosynthetic incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: effect of 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan on structure and stability. *Protein Sci.* **6**, 689-697.

- Wong, C. Y. e Eftink, M. R. (1998). Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease: stability toward thermal and guanidine-HCl induced unfolding. *Biochemistry* **37**, 8947-8953.
- Yu, A., Ballard, L., Smillie, L., Pearlstone, J., Foguel, D., Silva, J., Jonas, A., e Jonas, J. (1999). Effects of high pressure and temperature on the wild-type and F29W mutant forms of the N-domain of avian troponin C. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 53-63.
- Zot, A. S. e Potter, J. D. (1987). The effect of $[Mg^{2+}]$ on the Ca^{2+} dependence of ATPase and tension development of fast skeletal muscle. The role of the Ca^{2+} -specific sites of troponin C. *J. Biol. Chem.* **262**, 1966-1969.
- Zot, A. S. e Potter, J. D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 535-559.
- Zot, A. S. e Potter, J. D. (1989). Reciprocal coupling between troponin C and myosin crossbridge attachment. *Biochemistry* **28**, 6751-6756.
- Zot, H. G., Guth, K., e Potter, J. D. (1986). Fast skeletal muscle skinned fibers and myofibrils reconstituted with N- terminal fluorescent analogues of troponin C. *J. Biol. Chem.* **261**, 15883-15890.

Bibliografia relativa às estruturas cristalográficas ou de RMN utilizadas para as figuras da Introdução e Discussão:

figuras	referências
11, 13, 17, 27 e 31	Herzberg & James, 1985
12	Slupsky & Sykes, 1995
15, 16, e 28	Strynadka et al., 1997
20, 29, 30 e 32	Herzberg & James, 1985 e Strynadaka et al., 1997
18	Herzberg & James, 1985 e Houdusse et al., 1997