UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

EXPRESSÃO DO COMPLEXO TROPONINA EM *E.coli* E MAPEAMENTO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA TROPONINA T

BETTINA MALNIC

Tese de doutoramento submetida ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Orientador: Fernando C. Reinach

SÃO PAULO

1995

"EXPRESSÃO DO COMPLEXO TROPONINA EM E.*COLI* E MAPEAMENTO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA TROPONINA T"

BETTINA MALNIC

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)

Prof. Dr. Sérgio Verjovski de Almeida
IQ-USP

Prof. Dr. Roy Edward Larson
FM-RP-USP

Prof. Dr. Glaucius Oliva
IF-SC-USP

Prof. Dr. Paulo Lee Ho
IB

SÃO PAULO
01 DE AGOSTO DE 1995

Aos meus pais Margit e Gerhard

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Fernando, pela orientação segura, ensinamentos, críticas objetivas e oportunidade preciosa de aprender com a sua coerência e objetividade;

Ao Sandro, pelo carinho, companheirismo e incentivo constante.

A todo o pessoal do laboratório, Carlos, Kumie, Patrícia, Chuck, Catarina, Martin, Michael, Tharin, Ricardo, Ana Cláudia e Ronaldo, pela amizade e solidariedade ao longo destes anos; em especial agradeço à Kumie pela padronização da expressão e purificação da troponina T no laboratório, o que me poupou muitíssimo trabalho, e ao Chuck, pelas frequentes e produtivas discussões a respeito da troponina e pelo fornecimento dos mutantes de troponina I.

Ao Dr. Jesus Aparecido Ferro, preparação da tropomiosina de galinha e auxílio na introdução dos ensaios de ATPase no laboratório;

A todos os outros laboratórios do Departamento de Bioquímica, especialmente ao Dr. Bianchi pelo empréstimo do densitômetro a ao Paulo Ribolla pelo auxílio prestado na utilização do mesmo;

Ao CNPq e à FAPESP pelos auxílios prestados.

ÍNDICE

ABREVIAÇÕES 1
SUMMARY 2
RESUMO 3
INTRODUÇÃO GERAL 4
1-A estrutura muscular 4
2-O modelo de impedimento estérico 6
3-O complexo troponina 11
a) A estrutura do filamento fino e o complexo troponina 11
b) O papel do complexo troponina na regulação da contração muscular esquelética 12
c) As subunidades do complexo troponina e suas funções 12
d) A troponina T 14
i) O papel da troponina T na cooperatividade da resposta ao Ca^{2+} 14
ii) Interação com a tropomiosina 15
iii) Interação com a Troponina C 17
iv) Interação com a Troponina I 17
RESULTADOS OBTIDOS 20
1-Projeto I-Expressão do Complexo Troponina em *Escherichia coli* 21
a) Introdução 22
b) Materiais e Métodos 24
c) Resultados e Discussão 27
d) Figuras 31
2-Projeto II- Mapeamento dos domínios Funcionais da Troponina T 36
a) Introdução 37
b) Materiais e Métodos 40
c) Resultados 40

i) Mutantes de deleção da TnT..... 43
ii) Reconstituição dos complexos troponina..... 44
iii) Incorporação dos complexos troponina ao filamento fino.... 44
iv) Incorporação do complexo binário TnC/TnT ao filamento fino 46
v) Incorporação dos complexos troponina contendo mutantes de TnI ao filamento fino..... 47
vi) Incorporação do fragmento $TnT_{157-263}$ ao filamento fino..... 48
vii) Um modelo estrutural derivado dos estudos de co-sedimentação 49
viii) Regulação da atividade ATPásica da acto-miosina pelos mutantes de TnT..... 50
ix) O efeito de razões crescentes dos complexos troponina sobre a actina e a tropomiosina na atividade ATPásica da acto-miosina..... 52
x) A TnT e a ativação da atividade ATPásica da acto-miosina..... 54
d) Figuras..... 56
e)Discussão..... 65
i) Interações insensíveis ao Ca^{2+}..... 65
ii) Interações sensíveis ao Ca^{2+}..... 67
DISCUSSÃO GERAL..... 71
BIBLIOGRAFIA..... 76
CURRICULUM VITAE..... 89

ABREVIAÇÕES

ADP = adenosina bifosfato

ATP = adenosina trifosfato

CM = carbóxi metil

DEAE = dietilaminoetil

D.O. = densidade óptica

DTT = ditiotreitol

EDTA = ácido etileno-diamino- tetracético

EGTA = ácido etileno-glicol-bis (β- amino-éter) - N, N, N', N' -tetracético

IPTG = isopropil- β- D- tiogalactopiranosídeo

PAGE = gel de acrilamida

pCa = -log [Ca^{2+}]

Pi = fosfato inorgânico

pI = ponto isoelétrico

psi = "pounds per square inch"

S1 = subfragmento 1 da miosina

Tn = troponina

TnC = troponina C

TnI = troponina I

TnT = troponina T

SUMMARY

The contraction of skeletal muscle is regulated by troponin and tropomyosin in a Ca^{2+} dependent manner. The troponin complex consists of three subunits: troponin C (TnC), troponin I (TnI) and troponin T (TnT). Troponin C is the Ca^{2+} binding subunit, TnI is the inhibitory subunit and TnT binds tightly to tropomyosin.

TnI and TnT are highly insoluble proteins at low ionic strengths, unless they are complexed with TnC. The troponin complex can be reconstituted "in vitro" from the isolated subunits simply by mixing the subunits at equimolar ratios in urea, which is then removed by dialysis. In the first part of this work a vector for the co-expression of TnC, TnI and TnT in *E.coli* was constructed. Using this vector we were able to produce a functional troponin complex assembled "in vivo" in the *E.coli* cytoplasm.

The presence of TnT is required for the Ca^{2+} dependent regulation of the skeletal muscle contraction. The role of TnT in conferring full Ca^{2+} sensitivity to the ATPase activity of acto-myosin was analyzed. Deletion mutants of TnT were constructed by site-directed mutagenesis and expressed in *E.coli*. Troponin complexes containing the TnT deletion mutants and/or TnI deletion mutants, were reconstituted and analyzed in thin filament binding assays and in ATPase activity assays. Based on these studies, TnT was subdivided into three domains: the activation domain (comprised of aminoacids 1-157), the inhibitory domain (comprised of aminoacids 157-216) and the TnC/TnI dimer anchoring domain (aminoacids 216-263). We demonstrated that the TnC/TnI is anchored to the thin filament through interaction between the amino-terminal domain of TnI and the region comprised of aminoacids 216-263 of TnT. A model for the role of TnT in the Ca^{2+} dependent regulation of muscle contraction is proposed.

RESUMO

A contração muscular esquelética é regulada pelo complexo troponina/tropomiosina de maneira dependente de Ca^{2+}. O complexo troponina consiste de três subunidades: a troponina C (TnC), a troponina I (TnI) e a troponina T (TnT). A troponina C é a subunidade que liga Ca^{2+}, a TnI é a subunidade inibitória e a TnT liga-se fortemente à tropomiosina.

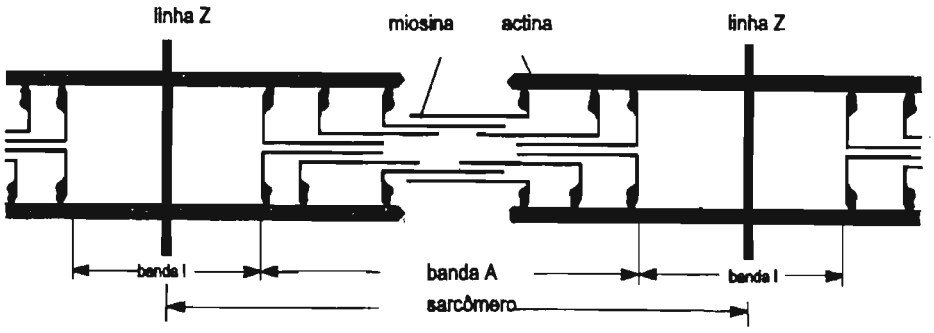
A TnI e a TnT são altamente insolúveis a baixas forças iônicas, a não ser que estejam complexadas com a TnC. O complexo troponina pode ser reconstituído "in vitro" a partir das subunidades isoladas simplesmente misturando-se as subunidades em razões equimolares em uréia, que depois é removida através de diálise. Na primeira parte deste trabalho um vetor para a co-expressão da TnC, TnI e TnT em *E.coli* foi construído. Utilizando este vetor nós produzimos um complexo troponina funcional montado no citoplasma de *E.coli*.

A presença da TnT é requerida para regulação dependente de Ca^{2+} da contração muscular esquelética. O papel da TnT em conferir sensibilidade ao Ca^{2+} à atividade ATPásica da acto-miosina foi analisado. Mutantes de deleção da TnT foram construídos através de mutação sítio-dirigida e expressos em *E.coli*. Complexos troponina contendo os mutantes de TnT e/ou mutantes de TnI foram reconstituídos e analisados em ensaios de ligação ao filamento fino e ensaios de atividade ATPásica. Baseado nestes resultados a TnT foi subdividida em três domínios: o domínio ativatório (aminoácidos 157-216), o domínio inibitório (aminoácidos 157-216) e o domínio de ancoragem do dímero TnC/TnI (aminoácidos 216-263). Nós demonstramos que o dímero TnC/TnI está ancorado ao filamento fino através da interação entre a região amino-terminal da TnI e da região carbóxi-terminal da TnT (aminoácidos 216-263). Um modelo para o papel da TnT na regulação da contração muscular dependente de Ca^{2+} é proposto.

INTRODUÇÃO GERAL

1-A ESTRUTURA MUSCULAR

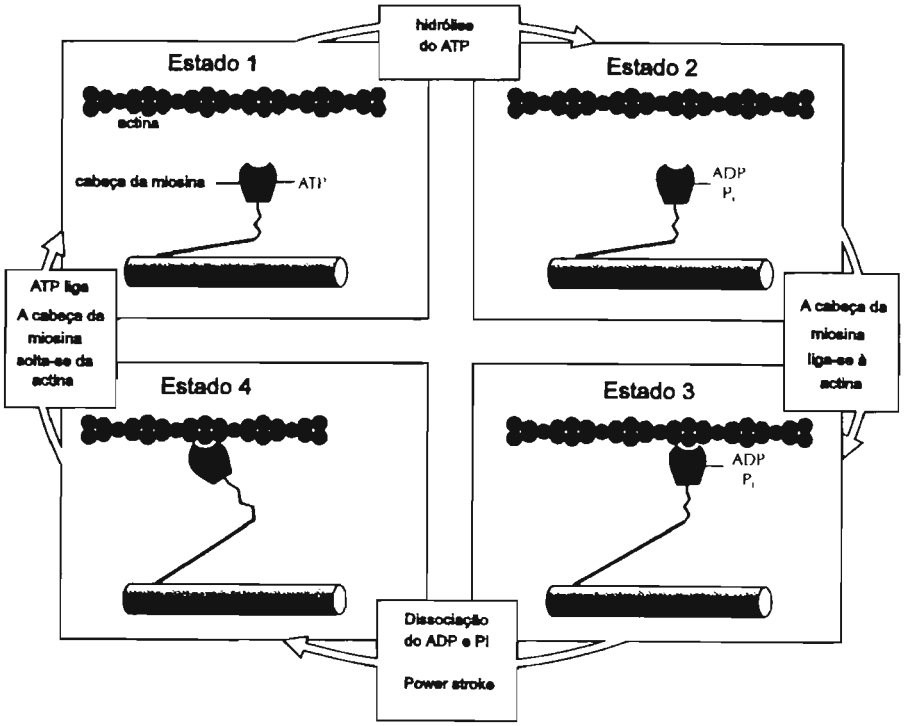
Os músculos estriados (esqueléticos e cardíacos) consistem de arranjos paralelos de fibras musculares. Cada fibra muscular é composta de miofibrilas que por sua vez são compostas por dois tipos de filamentos: os filamentos finos, constituídos predominantemente de actina e os filamentos grossos, constituídos predominantemente de miosina. No músculo estriado estes filamentos estão organizados em unidades de contração denominadas sarcômeros (esquema 1).



Esquema 1- Diagrama mostrando a organização dos filamentos finos e grossos no músculo estriado.

O deslizamento dos filamentos finos em relação aos grossos em direção ao centro do sarcômero causa o encurtamento do sarcômero durante a contração muscular (Huxley, 1972). A força entre os filamentos, que causa o deslizamento, é gerada pelas pontes cruzadas que são as cabeças de miosina que se projetam para fora do filamento grosso e interagem ciclicamente com as actinas do filamento fino. A cabeça da miosina possui atividade Mg^{2+}-ATPásica que é ativada pela

actina (para revisão ver Adelstein e Eisenberg, 1980). No músculo relaxado, a hidrólise do Mg^{2+}-ATP pela miosina é lenta, sendo a liberação dos produtos da hidrólise, o Mg^{2+}-ADP e Pi, o passo limitante. Durante a contração, a actina causa o deslocamento dos produtos de hidrólise ADP e Pi da cabeça da miosina e assim ativa a atividade ATPásica da miosina aproximadamente em 100 vezes. O modelo padrão da contração muscular está representado no esquema 2, abaixo.



Esquema 2- Modelo da contração muscular. A figura mostra parte de um filamento fino (composto de actina) e parte de um filamento grosso (composto de miosina). Após a ligação do ATP à cabeça da miosina, esta se solta da actina (estado 1, miosina-ATP). A hidrólise do ATP ocorre gerando o estado 2 (miosina-ADP-Pi). A cabeça da miosina pode então ligar-se à actina gerando o estado 3 (acto-miosina-ADP-Pi). A liberação dos produtos de hidrólise da cabeça da miosina gera alterações conformacionais na miosina que causam o "power stroke" (estado 4, acto-miosina). O ATP pode ligar-se novamente à miosina, dissociando-a da actina e iniciando um novo ciclo.

No músculo estriado este ciclo é regulado pelo Ca^{2+} através do complexo troponina/tropomiosina. Um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} desencadeia a ligação da miosina-ADP-Pi à actina estimulando a contração muscular. O retículo sarcoplasmático dos músculos esqueléticos é extremamente desenvolvido podendo causar rápidos aumentos ou diminuições das concentrações intracelulares de Ca^{2+}, permitindo assim um controle preciso dos movimentos musculares (Gauthier, 1983).

O músculo liso apresenta várias diferenças em relação ao esquelético. Os filamentos finos e grossos não apresentam o mesmo arranjo espacial que o dos sarcômeros. O retículo sarcoplasmático não é tão desenvolvido como nos músculos estriados, e as mudanças nos níveis intracelulares de Ca^{2+} são muito mais lentas (na ordem de segundos a minutos), portanto permitindo respostas contráteis lentas. A contração muscular lisa é regulada diferentemente por Ca^{2+}. Os músculos lisos apresentam tropomiosina mas não troponina. Nestes músculos, a cadeia leve da miosina, que está ligada à cabeça da miosina, inibe a atividade ATPásica regulada pela actina. Quando os níveis intracelulares de Ca^{2+} se elevam, o Ca^{2+} liga-se à calmodulina, e o complexo Ca^{2+}-calmodulina ativa a proteína quinase da cadeia leve da miosina. A fosforilação da cadeia leve da miosina por esta quinase, remove a inibição sobre a atividade ATPásica, gerando a contração muscular (para revisão ver Somlyo e Somlyo, 1994).

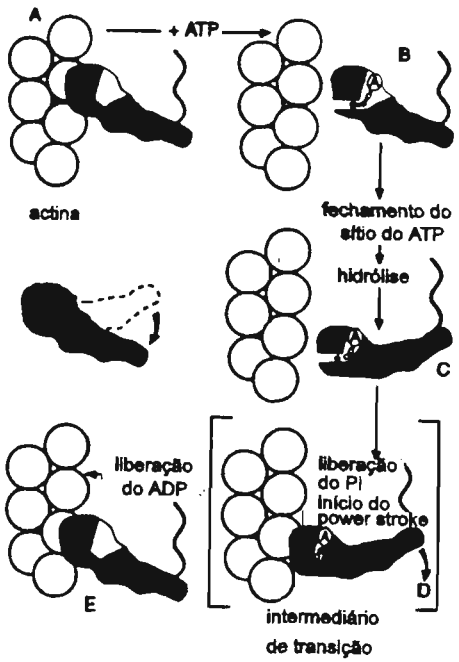
2-O MODELO DE IMPEDIMENTO ESTÉRICO

A interação entre a actina e a miosina que resulta na contração muscular esquelética é regulada através da ligação do Ca^{2+} ao complexo troponina/tropomiosina que juntamente com a actina constitue o filamento fino. Há mais de 20 anos, o modelo de impedimento estérico desta regulação foi proposto (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972). Neste modelo, em baixas concentrações de Ca^{2+} a tropomiosina adotaria uma posição "off", na qual ela bloquearia fisicamente a ligação da miosina com a actina. Em concentrações maiores, o Ca^{2+} ligaria-se ao complexo troponina causando

uma alteração na posição da tropomiosina para a posição "on", na qual o sítio para ligação da miosina na actina estaria exposto. Este modelo amplamente citado baseou-se principalmente nas diferenças dos padrões de difração de raio X em músculos relaxados e contraídos (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972; Parry e Squire, 1973).

O modelo de impedimento estérico prediz que na ausência de Ca^{2+} a interação da actina com a miosina deve ser bloqueada. No entanto, estudos bioquímicos realizados por diferentes grupos não se mostraram compatíveis com o modelo. Chalovich e Eisenberg (1982) por exemplo, demonstraram que em baixas forças iônicas a ligação do Ca^{2+} à troponina regula a atividade ATPásica da miosina mas não altera o grau de associação entre a miosina e a actina, como seria esperado. Este trabalho representou um dos principais desafios ao modelo de impedimento estérico, pois sugeria que a tropomiosina não controlaria a atividade ATPásica através da regulação da interação da actina com a miosina, mas através da regulação do passo limitante que é a liberação do Pi da cabeça da miosina. Neste caso, não seria a ligação "per se" mas a transição da miosina de um estado fracamente ligado para um estado produtor de força fortemente ligado que seria modulado pela tropomiosina em resposta a um aumento nas concentrações de Ca^{2+}. Mc Killop e Geeves (1991; 1993) propuseram um modelo segundo o qual haveria dois estados de interação entre a actina e a miosina, um estado fraco (estado A) e um estado forte (estado R). O estado R seria necessário para a ativação da atividade ATPásica e produção da força mecânica. A tropomiosina controlaria o passo de isomerização entre estes dois estados.

Recentemente as estruturas cristalográficas da actina (Kabsch et al., 1990) e do subfragmento 1 da miosina (S1) (Rayment et al., 1993) foram determinadas a uma resolução de 2.8Å. O subfragmento S1 ou cabeça da miosina corresponde ao domínio motor da miosina e contém os 840 aminoácidos amino-terminais da cadeia pesada da miosina mais as duas cadeias leves da miosina. A estrutura de S1 mostra que a cabeça da miosina apresenta duas fendas, uma que liga actina e outra que liga ATP (Rayment et al., 1993). Rayment e colegas (1993) propuseram um modelo atômico para o ciclo contrátil da acto-miosina a partir da combinação destas estruturas cristalográficas com reconstituições tridimensionais de baixa resolução de filamentos de actina decorados com S1 (Milligan et al., 1990). O modelo está representado no esquema 3 a seguir.



Esquema 3- Modelo para o ciclo contrátil da cabeça da miosina (Rayment et al., 1993). O sítio para actina está representado por uma abertura horizontal perpendicular ao eixo do filamento de actina. Este sítio comunica-se com o sítio para o ATP através de uma fenda. Segundo este modelo o fechamento da fenda que liga actina afetaria a ligação do nucleotídeo ao seu sítio e vice-versa. Na ausência de ATP, a miosina formaria um forte complexo com a actina (A), pois a fenda que liga actina estaria fechada. A ligação de ATP à miosina causaria a abertura desta fenda que romperia o sítio de interação forte da miosina com a actina, permitindo apenas a interação fraca (B). A hidrólise do ATP e o fechamento do sítio para a ligação do ATP causariam uma alteração conformacional na miosina (C). A miosina complexada com os produtos da hidrólise, ADP e Pi ligaria-se primeiro fracamente à actina através do sítio estéreo específico e em seguida fortemente, causando um fechamento da fenda de ligação à actina, que por sua vez diminuiria a afinidade do Pi pela molécula. O Pi seria liberado causando o início do "power stroke" (D). Isto resultaria na reabertura do sítio de ligação ao ATP e consequentemente fechamento do sítio de ligação à actina, e o estado de rigor (E), fechando o ciclo.

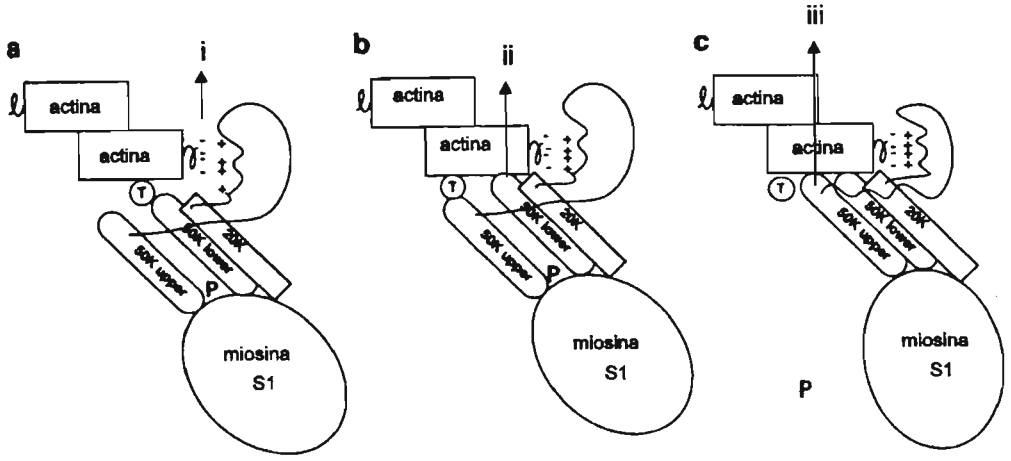
Três tipos de interações da cabeça da miosina com a actina foram detectadas por Rayment e colegas (1993): (i) uma interação iônica envolvendo uma alça flexível, que poderia ser detectada

apenas em baixas forças iônicas, (ii) uma interação fraca, que seria estéreo específica e envolveria aminoácidos hidrofóbicos, (iii) uma interação, forte, que resultaria do fortalecimento da anterior devido ao recrutamento de alças hidrofóbicas adicionais. Portanto a tropomiosina poderia bloquear um destes sítios e ainda assim permitir a formação (improdutiva) do complexo acto-miosina, o que explicaria os dados de Chalovich e Eisenberg (1982).

Se o modelo do impedimento estérico é correto, a tropomiosina deveria bloquear fisicamente pelo menos uma das interações da acto-miosina descritas acima. Durante muito tempo as evidências obtidas a partir de microscopia eletrônica eram inconclusivas devido à confusão a respeito das posições relativas da actina, tropomiosina e miosina. Dados recentes obtidos por Lehman e colegas (1994) a partir da reconstituição tridimensional da estrutura dos filamentos finos do caranguejo *Limulus* na presença e ausência de Ca^{2+} esclareceram pela primeira vez o efeito do Ca^{2+} na posição da tropomiosina. A reconstituição tridimensional do filamento fino de *Limulus* mostra que a posição "off" da tropomiosina, na ausência de Ca^{2+}, é aproximadamente centrada no sítio de ligação da miosina na actina, onde ela pode efetivamente bloquear a ligação com a miosina; na presença de Ca^{2+}, a tropomiosina move-se aproximadamente 25^0 ao redor do filamento de actina para a posição "on", descobrindo completamente o sítio de ligação à miosina. A posição adotada pela tropomiosina no estado "off" dos filamentos finos de *Limulus* coincide com o sítio de interação estéreo específico entre a actina e a miosina descrito por Rayment e colegas (1993). Lehman e colegas sugerem que a tropomiosina no estado "off" poderia bloquear esta interação e desta forma interferir na transição da ligação fraca para forte da acto-miosina. Estes resultados fornecem portanto suporte direto para a importância dos efeitos estéricos na ativação da contração muscular.

Holmes (1995) propôs um modelo para a regulação da interação acto-miosina pela tropomiosina que combina as informações estruturais obtidas através do modelo atômico de Rayment e colegas (1993) com as informações a respeito das posições da tropomiosina no filamento fino (Milligan et al., 1990; Lehman et al., 1994; Poole et al., 1995) assim como os estudos bioquímicos de McKillop e Geeves (1991; 1993). Segundo este modelo, a tropomiosina apresentaria três possíveis posições no filamento fino (Esquema 4). No estado "off" (Esquema 4a), a tropomiosina impediria a interação estéreo específica da cabeça da miosina com a actina (ii), mas ainda permitiria a ligação iônica (i). No estado "on" (Esquema 4b), na presença de Ca^{2+}, a tropomiosina permitiria a interação

estéreo específica (ii) entre a actina e a miosina, mas ainda impediria que a região superior do fragmento 50k da miosina aproxime-se da região inferior do fragmento 50k (este seria o fechamento da fenda proposto por Rayment e colegas) para formar o sítio de forte interação entre a actina e a miosina (iii). Neste estado, as cabeças da miosina ligariam fracamente mas de maneira estéreo específica à actina, o que representaria o complexo "pré-powerstroke". Para haver a ligação forte entre a acto-miosina (iii, rigor, Esquema 4c), a tropomiosina deveria afastar-se ainda mais um pouco, permitindo que a fenda da miosina se feche e ligue na actina. De fato, observou-se que a posição da tropomiosina em rigor parece estar 5Å mais deslocada para longe do sítio de ligação à miosina do que na presença de Ca^{2+} (Holmes, 1995). Este afastamento adicional seria resultante da ligação de uma ou duas cabeças da miosina à actina por comprimento de tropomiosina.



Esquema.4- Modelo de regulação da interação entre a actina e miosina proposto por Holmes (1995). Os três tipos de interações identificados por Rayment e colegas (1993) estão indicados (i,ii e iii). a) Estado "off"; a tropomiosina inibe a interação estéreo específica fraca. b) Estado "on"; a tropomiosina impede que o domínio superior do fragmento 50k da miosina se junte ao domínio inferior e portanto o sítio de interação forte não pode ser formado. c) Um afastamento adicional da tropomiosina permite que a fenda entre os domínios inferior e superior do fragmento 50k se feche gerando o sítio de interação forte entre a actina e miosina e consequentemente o "powerstroke". T, tropomiosina.

Apesar de ainda não estar claro exatamente como a tropomiosina regula a interação da actina com a miosina, as informações estruturais recentes sugerem que o modelo de impedimento estérico deve estar correto, ou seja, que o Ca^{2+} é necessário para a ligação inicial da miosina na actina em condições fisiológicas, mas ao mesmo tempo, a transição do estado fracamente ligado para o fortemente ligado também pode ser influenciado pela tropomiosina. Desta maneira a regulação pela tropomiosina poderia envolver tanto aspectos de impedimento estérico como aspectos alostéricos. A função da tropomiosina, por sua vez, é regulada pelo complexo troponina de maneira Ca^{2+} dependente.

3-O COMPLEXO TROPONINA

a) A estrutura do filamento fino e o complexo troponina.

O filamento fino é composto de actina, tropomiosina e troponina numa proporção molar de 7:1:1 (Yates e Greaser, 1983; Potter, 1974). Os monômeros de actina polimerizam para formar uma hélice dupla fita ao longo da qual as moléculas elongadas de tropomiosina se polimerizam de forma que cada tropomiosina estende-se sobre 7 actinas (ver Esquema 5). As moléculas de tropomiosina consistem de duas alfa-hélices paralelas em "coiled coil" e apresentam uma sobreposição de suas extremidades amino e carbóxi-terminal quando polimerizadas sobre o filamento de actina (Smillie, 1979). O complexo troponina, consistindo das subunidades C, I e T, liga-se à uma região específica de cada tropomiosina (próximo à sua cisteína 190), e está localizado a intervalos de 38 nm no filamento fino (Ohtsuki, 1979). Estudos de "rotary shadowing" indicam que o complexo troponina apresenta um domínio globular e um domínio em forma de bastão (Flicker et al., 1982). A TnC e a TnI representam a maior parte do domínio globular, enquanto que a TnT corresponde principalmente à porção da cauda, como indicado no Esquema 5. White e colaboradores (1987) demonstraram que a extremidade amino-terminal da TnT se extende por sobre a sobreposição das extremidades carbóxi

e amino-terminal da tropomiosina e que a região globular da troponina se liga próximo aos resíduos 150-180 da tropomiosina.

b) O papel do complexo troponina na regulação da contração muscular esquelética.

A contração muscular esquelética é iniciada por um aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} de aproximadamente 1μM para 100μM. No músculo estriado, o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} é produzido pela liberação do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. A regulação da contração muscular se dá através da ligação do Ca^{2+} ao complexo troponina. A ligação do Ca^{2+} à troponina gera alterações conformacionais nas subunidades do complexo troponina e tropomiosina que resultam na interação entre a actina e a miosina, no aumento da atividade ATPásica e consequentemente na contração. Da mesma maneira, estas alterações conformacionais são revertidas quando os níveis intracelulares de Ca^{2+} diminuem, a atividade ATPásica é inibida e o músculo relaxa (para revisão ver Zot e Potter, 1987; Ohtsuki et al., 1986).

Evidências estruturais como o fato de que cada troponina regula as interações de sete unidades de actina com a miosina, indicam que a ação do Ca^{2+} sobre o complexo troponina é transmitido para a actina através da tropomiosina (Zot e Potter, 1987). No entanto, como descrito acima, ainda não está totalmente claro se as alterações conformacionais produzidas na troponina e tropomiosina regulam a contração muscular através de um mecanismo estérico, cinético ou através de uma combinação de ambos.

c) As subunidades do complexo troponina e suas funções.

O complexo troponina é constituído de três subunidades: a troponina C (TnC), a troponina I (TnI) e a troponina T (TnT). A troponina C é a subunidade ligante de Ca^{2+}, a TnI liga-se à actina e inibe a atividade ATPásica da acto-miosina e a TnT liga-se fortemente à tropomiosina (Zot e Potter,

1987; Ohtsuki et al., 1986). De todas as subunidades da troponina, a TnC é a única cuja estrutura cristalográfica já foi resolvida (Herzberg e James, 1985; Sundaralingam et al., 1985). A estrutura da TnC apresenta dois domínios distintos, um contendo dois sítios específicos para Ca^{2+} de baixa afinidade ($K=10^5 M^{-1}$, amino-terminal), e o outro contendo dois sítios Ca^{2+}/Mg^{2+} de alta afinidade ($K=10^7 M^{-1}$, carbóxi-terminal). Os sítios de alta afinidade também podem ligar Mg^{2+} ($K=5x10^3 M^{-1}$) (Potter e Gergely, 1975). Estes domínios são separados por uma alfa-hélice de 9 voltas (Herzberg e James, 1985; Sundaralingam et al., 1985). Em concentrações intracelulares de Ca^{2+} (inferiores a 1 μM), os sítios de baixa afinidade estão vazios (Potter e Gergely, 1975). Quando as concentrações aumentam para aproximadamente 100 μM, estes sítios são ocupados, gerando alterações conformacionais na TnC (Herzberg,et al., 1986), que são propagadas através dos outros componentes do filamento fino, resultando na remoção da inibição sobre a atividade ATPásica da acto-miosina (para revisão ver Zot e Potter,1987).

A TnI é a subunidade que inibe a atividade ATPásica da acto-miosina (Perry et al., 1973; Syska et al., 1976). Na ausência de Ca^{2+} a TnI liga-se à actina e tropomiosina inibindo a interação contrátil entre a actina e miosina. Na presença de Ca^{2+}, a TnC remove a TnI do filamento fino, e consequentemente a inibição (Zot e Potter, 1987). É importante ressaltar que isto ocorre apenas com o dímero TnC/TnI, na ausência da TnT. Recentemente um estudo detalhado das funções das regiões amino e carbóxi-terminal da TnI foi realizado em nosso laboratório (Farah et al., 1994). Neste estudo foi demonstrado que a TnI está organizada em regiões estruturais e regulatórias que interagem de maneira anti-paralela com as regiões estruturais e regulatórias correspondentes na TnC (domínios carbóxi e amino-terminal, respectivamente). Os aminoácidos 1-98 (TnI_{1-98}) são necessários para a incorporação da TnT no complexo ternário. A região dos aminoácidos 103-182 ($TnI_{103-182}$) apresenta a capacidade de se ligar à acto-tropomiosina e de regular a atividade ATPásica de maneira dependente de Ca^{2+} (para revisão ver Farah e Reinach, 1995).

A TnT é o componente que mais fortemente liga tropomiosina (Zot e Potter, 1987). Esta subunidade interage também com a TnI e a TnC, ancorando-as ao filamento fino (Mak e Smillie, 1981). Diferentemente da TnC e TnI, a TnT ainda não apresenta nenhum papel específico na contração muscular, mas é necessária para a regulação dependente de Ca^{2+}. As três subunidades da troponina são necessárias para que a regulação Ca^{2+} dependente seja funcional (Greaser e Gergely,

1973; Hitchcock et al., 1973). A presença da TnT é necessária para que haja regulação da atividade ATPásica da acto-miosina de forma dependente de Ca^{2+} nas concentrações fisiológicas de actina, tropomiosina e troponina (7:1:1) (Hitchcock et al., 1973; Malnic e Reinach, 1994). Isto significa que a TnT é responsável pela integração da função fisiológica do complexo troponina ao filamento fino. É provável que a TnT, com sua forma elongada, controle a posição da tropomiosina no filamento fino (Flicker et al., 1982).

d) A troponina T

i) O papel da TnT na cooperatividade da resposta ao Ca^{2+}.

A regulação da contração muscular esquelética requer a ligação do Ca^{2+} aos sítios de baixa afinidade da TnC, o que permite interações fortes da miosina com a actina dentro de uma unidade funcional do filamento fino (uma unidade funcional é composta de um complexo troponina, uma tropomiosina e sete monômeros de actina). As unidades funcionais adjacentes do filamento fino interagem cooperativamente entre si em resposta à concentrações crescentes de Ca^{2+} (para revisão ver Moss, 1991). A extração parcial de TnC de fibras musculares descascadas, originando lacunas na integridade das unidades funcionais, reduz a cooperatividade ao longo do filamento fino, devido à presença de unidades funcionais permanentemente inativas (Brandt et al., 1984; Brandt et al., 1987; Moss et al., 1985). Grabarek e colegas (1983) observaram que o Ca^{2+} se liga cooperativamente ao filamento fino, devido à cooperatividade entre complexos troponina no filamento fino. Outros tipos de fenômenos cooperativos foram observados em fibras reconstituídas. S1, na ausência de Mg^{2+}ATP, liga-se cooperativamente ao filamento fino (Greene e Eisenberg, 1980; Lehrer e Morris, 1982), e aumenta a afinidade do complexo troponina pelo Ca^{2+} (Bremel e Weber, 1972).

Esta resposta cooperativa à concentrações crescentes de Ca^{2+} poderia ser mediada através da sobreposição entre as tropomiosinas de duas unidades funcionais, ou da interação da cauda da TnT

com a tropomiosina da unidade vizinha. Walsh e colegas (1984), no entanto, não observaram alterações na cooperatividade da resposta da atividade ATPásica ao Ca^{2+} quando interromperam a comunicação entre as tropomiosinas adjacentes. Pan e colegas (1989), por outro lado, verificaram que a remoção da sobreposição entre as tropomiosinas afeta a cooperatividade da ligação de S1-ADP à actina.

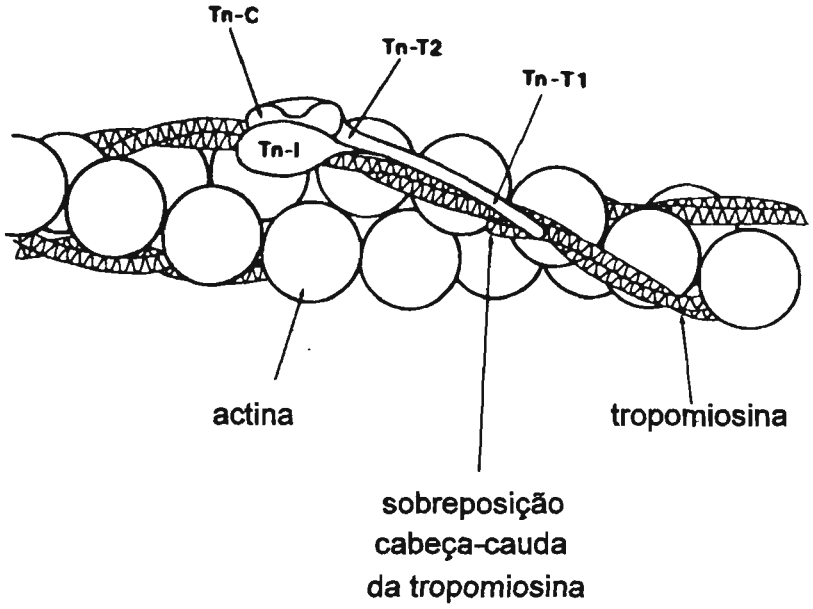
A troponina T apresenta várias isoformas, geradas a partir de "splicing" alternativo (Breitbart et al., 1985). Estas isoformas são reguladas ao longo do desenvolvimento e são específicas para diferentes tipos de tecidos musculares (Dhoot e Perry, 1979a, 1979b, 1980; Matsuda et al., 1981; Wilkinson et al.,1984). Grande parte das isoformas é gerada a partir do "splicing" alternativo dos pequenos exons da extremidade amino-terminal da troponina T. O papel das diferentes isoformas da TnT ainda não é claro. Schachat e colegas (Schachat et al., 1987) demonstraram que fibras musculares expressando diferentes isoformas de TnT apresentam diferenças na resposta cooperativa ao Ca^{2+}. A interação da região variável amino-terminal da TnT com a região de sobreposição entre as tropomiosinas (Esquema 5) deveria portanto apresentar um papel importante. No entanto, outros trabalhos indicam que a deleção da extremidade amino-terminal da TnT não diminui a cooperatividade da ligação da tropomiosina ao filamento fino (Hill et al., 1992; Willadsen et al., 1992) e não alteram a resposta cooperativa ao Ca^{2+} da atividade ATPásica (Pan et al., 1991).

Os resultados descritos acima demonstram a importância da cooperatividade entre as unidades funcionais do filamento fino na modulação Ca^{2+} dependente da contração muscular. Se esta cooperatividade é mediada pela sobreposição entre as tropomiosinas, da TnT, pela ligação cooperativa da miosina à actina ou através de uma somatória destas interações, ainda não está claro.

ii) Interação com a tropomiosina

A clivagem da TnT com quimiotripsina resulta em dois fragmentos denominados T_1 e T_2, de respectivamente 26 e 13 kD (Ohtsuki, 1979). T_1 é o fragmento amino-terminal (o domínio em forma de bastão da troponina) e T_2 é o fragmento carbóxi-terminal (que fica no domínio globular da troponina) (esquema 2, Flicker et al., 1982). Estudos de cromatografia de afinidade indicaram que

T_1 liga-se fortemente à tropomiosina independentemente de Ca^{2+} (Pearlstone e Smillie, 1982). O fragmento de brometo de cianogênio (CB2), presente dentro do fragmento T_1, apresenta um alto conteúdo de alfa-hélice é responsável pela alta afinidade que T_1 apresenta pela tropomiosina (Pearlstone e Smillie, 1977). O fragmento T_2 interage com a tropomiosina de maneira dependente de Ca^{2+} na presença da TnC, ou seja, é capaz de ligar-se à tropomiosina mas é removido pela TnC na presença de Ca^{2+} (Pearsltone e Smillie, 1983). T_2 interage também com TnI e TnC (Tanokura et al., 1983; Pearsltone e Smillie, 1983). Baseando-se nas característica dos fragmentos T_1 e T_2 Pearlstone e Smillie (1983) propuseram um modelo onde o complexo troponina seria ancorado no filamento fino via T_1, que se liga à tropomiosina independentemente de Ca^{2+}, enquanto que o domínio globular da troponina (que contém o fragmento T_2 , a TnC e a TnI) ligaria-se no filamento de maneira Ca^{2+} dependente.



Esquema 5- Modelo da organização molecular da troponina e tropomiosina no filamento fino do músculo esquelético (Heeley et al., 1987). A TnT interage com a região da sobreposição entre as tropomiosinas através da região amino-terminal de T_1, e com a tropomiosina, TnC e TnI através da região T_2.

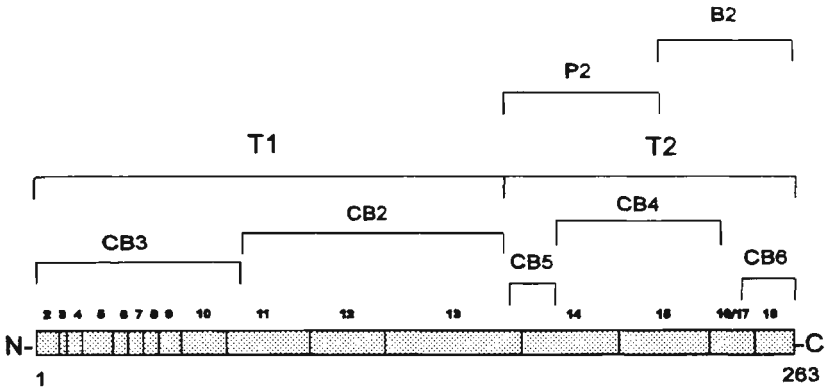
iii) Interação com TnC

A importância da interação entre a TnT e a TnC no complexo troponina é ainda incerto. Vários estudos utilizando metodologias diferentes demonstraram a formação de um complexo binário entre a TnT e a TnC (Pearlstone e Smillie, 1978; Grabarek et al., 1981; Tanokura et al., 1983; Eyk et al., 1986; Tao et al., 1986; Malik et al., 1987). As condições necessárias para a formação do complexo variam de estudo para estudo: alguns trabalhos indicam que altas concentrações de Ca^{2+} são necessárias para a interação da TnT com a TnC (Pearlstone e Smillie, 1978), enquanto que outros indicam que o Ca^{2+} não é importante para a estabilização deste complexo (Grabarek et al., 1981; Tanokura et al., 1983). Estudos de fluorescência não detectaram grandes diferenças na afinidade da TnT pela TnC na presença de Ca^{2+} ou na presença de Mg^{2+} (Eyk et al., 1986; Malik et al., 1987). Apesar de existirem muitas evidências para a interação entre a TnT e a TnC nos complexos binários, não se sabe até que ponto a TnT interage diretamente com a TnC no complexo ternário ou no filamento fino e que significado funcional esta interação apresenta.

iv) Interação com a TnI

O estudo da interação da TnT com a TnI sempre foi dificultado devido à suas baixas solubilidades em baixas forças iônicas. Apesar disto a interação entre a TnT e a TnI foi demonstrada por vários grupos (Horwitz et al., 1979; Pearlstone e Smillie, 1980; Hitchcock et al., 1981; Hitchcock, 1982; Pearlstone e Smillie, 1985). Vários trabalhos indicam que o sítio de interação da TnI com a TnT reside na região amino-terminal da TnI (Chong e Hodges, 1982a; Hitchcock, 1982; Farah et al., 1994; Potter et al., 1995).

As interações dos diferentes fragmentos proteolíticos da TnT (Pearlstone e Smillie, 1982; Pearlstone e Smillie, 1978; Pearlstone e Smillie, 1980; Chong e Hodges, 1982a) com a tropomiosina, TnT e TnI está resumida no esquema 6 abaixo.



	Tmy	TnC	TnI	Referências
T1	+	-	-	Pearlstone e Smillie, 1982, 1985
T2	+	+	+	Pearlstone e Smillie, 1982, 1985, 1977; Tanokura et al., 1983
B2	+/-	+	-	Pearlstone e Smillie, 1978, 1980, 1981
P2		+	+	Pearlstone e Smillie, 1978, 1980
CB2	+	-	-	Pearlstone e Smillie, 1977, 1985
CB3	-	-	-	Pearlstone e Smillie, 1978, 1982, 1985
CB4		+	+	Pearstone e Smillie, 1978, 1985; Chong e Hodges, 1982a; Hitchcock et al., 1981
CB5		-	+/-	Pearstone e Smillie, 1978, 1980, 1985
CB6		+	+/-	Pearlstone e Smillie, 1978, 1985

Esquema 6- Representação esquemática da estrutura secundária da TnT. Os exons estão numerados. A localização dos fragmentos proteolíticos está indicada, e as suas interações com a tropomiosina (Tmy), TnC e TnI estão resumidas na tabela. A presença (+) ou ausência (-) de interações, assim como interações fracas (+/-) estão indicadas.

Os dados obtidos a partir dos fragmentos proteolíticos (Esquema 6) indicam que o sítio para ligação da TnC deve ser composto por uma ampla região de T_2, já que fragmentos abrangendo diferentes regiões de T_2 são capazes de ligar TnC. Indicam também que o sítio para TnI parece residir na metade amino-terminal do fragmento T_2.

O mecanismo através do qual a TnT confere sensibilidade ao Ca^{2+} ao complexo troponina ainda não está claro. Um modelo de dois sítios de ligação da troponina ao filamento fino foi proposto para explicar o funcionamento da troponina (Hitchcock et al., 1973; Mak e Smillie, 1981). Segundo este modelo, há dois tipos de sítios para a troponina no filamento fino, um Ca^{2+} sensível, que apenas existe na ausência de Ca^{2+}, e o outro Ca^{2+} insensível, que está sempre presente. A ligação do complexo troponina ao filamento fino seria portanto diferente na presença ou ausência de Ca^{2+}, e a sensibilidade ao Ca^{2+} seria uma consequência direta da existência destes dois estados.

RESULTADOS OBTIDOS

O presente trabalho de doutoramento consiste de dois projetos distintos, porém relacionados. Os dois projetos apresentam como objeto de estudo o complexo troponina. O primeiro projeto tem como objetivo a construção de um vetor para a produção do complexo troponina em *E.coli*. Neste projeto as propriedades físicas de cada uma das subunidades da troponina, assim como os problemas relacionados à sua expressão em *E.coli* são analisados. Os resultados obtidos neste primeiro projeto mostraram que para produzir um complexo funcional a presença da TnT é fundamental.

O objetivo do segundo projeto deste trabalho é investigar como as interações Ca^{2+} dependentes ou independentes da TnT com a tropomiosina, TnC e TnI estão relacionadas à sua função. Pretende-se portanto mapear na TnT as regiões envolvidas na propagação da atividade regulatória do complexo troponina para a tropomiosina e consequentemente para a actina.

Os resultados deste trabalho estão divididos em duas partes, projeto I e projeto II. Como os projetos são independentes entre si serão apresentados aqui na forma de dois manuscritos. Os resultados obtidos no projeto I estão publicados (Malnic e Reinach, 1994) e sua tradução será apresentada. O segundo manuscrito está sendo submetido para publicação. Cada projeto contém uma introdução, materiais e métodos, resultados e discussão. A bibliografia citada nestes manuscritos está combinada à bibliografia da tese, no final deste volume.

1-PROJETO I

EXPRESSÃO DO COMPLEXO TROPONINA FUNCIONAL EM *Escherichia coli*

Tradução do trabalho: "Assembly of Functional Skeletal Muscle Troponin Complex in *Escherichia coli* , Bettina Malnic e Fernando C. Reinach, Eur. J. Biochem. 222, 49-54 (1994)

Resumo

A produção de proteínas multiméricas de origem eucariótica em *Escherichia coli* geralmente é realizada a partir da expressão isolada de cada subunidade e montagem do complexo multimérico "in vitro". Aqui nós descrevemos a construção e caracterização de plasmídeos capazes de co-expressar as três subunidades do complexo troponina de músculo esquelético de galinha em *E.coli*. Nós demonstramos que as subunidades da troponina associam-se no citoplasma de *E.coli* produzindo um complexo funcional. O complexo troponina foi purificado até a sua homogeneidade em grandes quantidades. Quando incorporado ao filamento fino, o complexo montado "in vivo" foi capaz de regular a atividade ATPásica da miosina apresentando uma dependência a Ca^{2+} idêntica à do complexo reconstituído "in vitro". Estes resultados demonstram que a co-expressão das subunidades de um complexo proteico pode evitar o acúmulo de proteínas denaturadas em corpos de inclusão.

a) Introdução

O complexo troponina consiste de três subunidades e se localiza periodicamente ao longo do filamento de actina no músculo esquelético. Juntamente com a actina e a tropomiosina, o complexo troponina regula a contração muscular (Zot e Potter, 1987). O Ca^{2+} liga-se à TnC, induz uma alteração conformacional que remove o efeito inibitório da TnI (Da Silva e Reinach, 1991). A troponina T liga-se à tropomiosina e está provavelmente envolvida na transmissão desta alteração conformacional para a tropomiosina e actina. Os filamentos finos de vertebrados contêm actina, troponina e tropomiosina na razão molar de 7:1:1 (Zot e Potter, 1987).

As três subunidades do complexo troponina apresentam propriedades físicas e funcionais diferentes. A TnC é altamente solúvel e acídica (pI=4.4) (Johnson et al., 1980). Quando expressa em *E. coli* a TnC é encontrada nas frações solúveis após a lise das bactérias (Reinach e Karlsson, 1988). A TnI é uma proteína básica (pI=9.3), altamente insolúvel (Johnson et al., 1980), encontrada em corpos de inclusão quando expressa em *E. coli* (Quaggio et al., 1993). A isoforma 3 da TnT contém uma alta porcentagem de resíduos carregados (Smillie et al., 1988) mas apresenta um pI quase neutro (pI=6.5). "In vitro" a TnI e a TnT tendem a precipitar em baixas forças iônicas, a não ser que estejam complexadas à TnC. O complexo troponina pode ser isolado a partir de músculo esquelético mas a purificação das subunidades isoladas da troponina pode ser efetuado apenas na presença de agentes denaturantes já que a afinidade entre as subunidades é muito alta (Greaser e Gergely, 1971; Greaser and Gergely, 1973; Eisenberg e Kielley, 1974). Dímeros TnC/TnI são estáveis em 6M uréia na presença de Ca^{2+} mas podem ser dissociados na presença de 6M uréia se o Ca^{2+} e o Mg^{2+} são quelados por EDTA (Head e Perry, 1974). Já foi demonstrado que as três subunidades da troponina renaturam e que um complexo troponina funcional pode ser reconstituído "in vitro" (Greaser e Gergely, 1971). Isto é efetuado misturando-se razões molares iguais das três subunidades em uréia, que depois é removida gradualmente através de diálises sucessivas. O complexo resultante é capaz de regular a atividade ATPásica da acto-miosina de maneira Ca^{2+} dependente (Greaser e Gergely, 1971). Pouco é conhecido a respeito dos mecanismos de renaturação e montagem do complexo troponina "in vivo".

Já foi demonstrado que chaperonas de *E.coli* podem facilitar a renaturação "in vitro" de

proteínas heterólogas (Hartl et al., 1992), mas há poucos exemplos de montagem de proteínas multiméricas recombinantes funcionais "in vivo" no citoplasma de *E. coli.*. A montagem das cadeias pesadas e leves da miosina ocorre em *E. coli*, mas esta proteína não foi totalmente caracterizada (McNally et al., 1988). As duas subunidades da hemoglobina foram co-expressas em *E. coli* e renaturaram em um complexo funcional tetramérico (Hoffman et al., 1990; Shen et al., 1993). A super expressão de chaperonas em *E.coli* expressando procolagenase humana resulta em um aumento no acúmulo e solubilidade desta proteína no citoplasma, mas não está claro se esta proteína é funcional (Lee e Olins, 1992). Skerra e Plückthun (1988) obtiveram um anticorpo funcional em *E. coli*, através da co-expressão dos domínios variáveis das cadeias pesada e leve de uma IgA de camundongo.

Neste trabalho nós demonstramos que as três subunidades do complexo troponina (TnC, TnI and TnT) renaturam e associam-se formando um complexo funcional quando co-expressas em *E.coli.* Nós também demonstramos que a expressão da TnC causa o acúmulo da TnI em um complexo solúvel impedindo a formação de corpos de inclusão.

b) Materiais e métodos

Plasmídeos: Vectores construídos para expressar TnC, TnI or TnT-3 de músculo esquelético de galinha (pET-TnC, pET-TnI e pET-TnT) separadamente foram construídos em nosso laboratório (Quaggio et al., 1993; Da Silva et al., 1993; Farah et al., 1994). Estes vetores foram utilizados para construir plasmídeos capazes de co-expressar as diferentes subunidades da troponina. A estrutura dos plasmídeos está apresentada na Fig. 1. Os nomes dos vetores indicam a combinação das subunidades expressas e a ordem dos cDNAs nos vetores: por exemplo pET-IC contém os cDNAs para TnI e TnC nesta ordem. Todos os plasmídeos foram construídos em pET3a (Studier et al., 1990). Para a construção de pET-CI (TnC/TnI) o maior fragmento BamHI-EcoRV de pET-TnC (que contém a origem de replicação) foi ligado ao fragmento BglII-EcoRV de pET-TnI. Para a construção de pET-IC (TnI/TnC) o maior fragmento BamHI-EcoRV de pET-TnI foi ligado ao fragmento BglII-EcoRV de pET-TnC. Nestes plasmídeos cada um destes dois cDNAs é precedido por um promotor T7 mas há apenas um terminador (Tϕ) após o segundo cDNA. Para a construção de pET-CIT (TnC/TnI/TnT) e pET-TCI (TnT/TnC/TnI), o sítio para EcoRI de pET-TnT foi modificado para um sítio BamHI através da digestão com EcoRI e ligação com o oligonucleotídeo 5'AATTGGGATCCC3' às extremidades terminais coesivas. Este novo plasmídeo foi denominado de pET-TnT*. O fragmento BglII-BamHI de pET-TnT* foi então clonado no sítio único para BamHI de pET-CI, produzindo pET-CIT. Alternativamente o mesmo fragmento foi clonado no sítio BglII de pET-CI, produzindo pET-TCI. Nestes vetores cada gene contém seu próprio promotor T7 mas há um único terminador após o terceiro gene. Um plasmídeo que confere resistência à tetraciclina e capaz de expressar TnT também foi construído. O fragmento BglII-EcoRI de pET-TnT foi clonado no sítio ScaI de pBR322, produzindo pBR-TnT.

Expressão em *E.coli*: Culturas de *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Studier, 1991) contendo os diferentes plasmídeos foram induzidas com IPTG (0,4 mM final) em fase semi-logarítmica (DO_{600}=0,8) e incubadas por 3hr à 37°C. Para testar a expressão, as bactérias foram recuperadas através de centrifugação e lisadas por fervura em Tris-Cl pH 6.8 50 mM, β-mercaptoethanol 100 mM, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,1 %, glicerol 10 %. Os extratos proteicos foram analisados em SDS-PAGE

15%.

Purificação do complexo troponina nativo produzido em *E.coli:* A expressão de pET-CIT foi induzida em larga escala (4 litros) como descrito acima. As bactérias foram recuperadas através de centrifugação a 3.000 x g (15 minutos), ressuspendidas em 100 ml de Tris-HCl pH8,0 50 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM e β-mercaptoethanol 2 mM e lisadas em French Press a 16.000 psi. O extrato foi centrifugado a 15.000 x g (60 minutos) e sulfato de amônio sólido (40 % de saturação) foi adicionado ao sobrenadante. A mistura foi agitada em gelo por 30 minutos e centrifugada (10.000 x g, 30 minutos). Sulfato de amônio sólido (até 50 % de saturação) foi adicionado ao sobrenadante e a mistura foi agitada por mais 30 min em gelo antes de ser centrifugada (10.000 x g 30 minutos). O precipitado foi ressuspendido no mesmo tampão contendo PMSF 0,1 mM (phenylmethylsulfonil fluoride). Esta fração de 40-50% de sulfato de amônio foi dialisada contra o mesmo tampão e primeiro aplicada a uma coluna DEAE-Sepharose Fast-Flow XK 16/70 (Pharmacia) para a remoção dos ácidos nucléicos através de cromatografia de deslocamento. O complexo troponina eluído no volume de exclusão foi aplicado a uma segunda coluna com as mesmas características. As proteínas então foram eluídas utilizando-se um gradiente de 0 a 500 mM de NaCl. A TnC, TnI e TnT co-eluíram em aproximadamente 300 mM de NaCl. O mesmo procedimento foi utilizado para a purificação do complexo TnC/TnI produzido pelo vetor pET-CI, exceto que este complexo foi precipitado entre 30 e 60 % de saturação com sulfato de amônio. As amostras para os géis de uréia contém uréia 6 M e $CaCl_2$ 5 mM ou EDTA 5 mM (Head e Perry, 1974).

Reconstituição do complexo troponina a partir das subunidades: As subunidades da troponina (20 μM final) foram misturadas na razão molar 1:1:1 em uréia 6 M, KCl 1 M, $CaCl_2$ 50 μM, β-mercaptoethanol 25 mM, imidazol 20 mM pH7.0. Diálises sucessivas (4°C, 12 hr cada) contra o mesmo tampão contendo uréia 4.6 M; uréia 2 M; sem uréia; KCl 100 mM e sem KCl foram utilizadas para reduzir gradualmente a uréia e as concentrações salinas.

Gel filtração do complexo troponina: Gel filtração em uma coluna Superose 12 (1 cm x 30 cm) foi realizada em um sistema de FPLC (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH8,0,

NaCl 50 mM, PMSF 0,1 mM, β-mercaptoethanol 2 mM e $CaCl_2$ 0,1 mM. Aproximadamente 150 μg de troponina ou de complexo TnC/TnI foram aplicados à coluna e eluídos com 50 ml de tampão. A velocidade do fluxo foi de 0,8 ml/min e frações de 0,5 ml foram coletadas. As frações foram liofilizadas, ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE e analisadas em SDS-PAGE 15 %.

Ensaio da atividade ATPásica da acto-miosina: A actina foi preparada a partir de músculo esquelético de galinha como descrito (Pardee e Spudich, 1982). A miosina (Reinach et al., 1982) e tropomiosina (Smillie, 1982) também foram preparadas utilizando-se métodos padrão. Para um volume final de 200 μl de reação os componentes do ensaio foram adicionados na seguinte ordem e concentração final: 4 μM de actina, 1,18 μM de tropomiosina, 1,71 μM de troponina ou de complexo TnC/TnI, 0,2 μM de miosina e 20 μl de 10x tampão de ATPase (Imidazol 20 mM pH7,0, $MgCl_2$ 35 mM, EGTA 5 mM, NaN_3 0,1%, KCl 65 mM). Um volume variável de uma solução contendo KCl 1 M, Tris-Cl 50 mM pH 7,5 e $MgCl_2$ 1 mM foi adicionado para se obter uma concentração final de 60 mM KCl. Uma solução $CaCl_2$ 6 mM foi utilizada para se obter o pCa desejado ($K_{EGTA\text{-}Ca} = 1.9 \times 10^{-7}$M). Os tubos de reação foram então transferidos para um banho a 25°C por 10 minutos e a reação foi iniciada através da adição de 20 μl de Na_2ATP 20 mM pH 7.0. Após 15 minutos a reação foi interrompida e a atividade ATPásica foi determinada através de um ensaio colorimétrico para a detecção de fosfato (Heinomen e Lahti, 1981).

c) Resultados e discussão

Os cDNAs para TnC e TnI foram clonados "in tandem" em um vetor pET. Construções contendo a TnC à montante de TnI (pET-CI), ou TnI à montante de TnC (pET-IC) foram analisadas (Fig.1). A transcrição de cada gene é regulada por um promotor T7 separado e um único terminador foi mantido após o segundo gene (Fig.1). Ambos os vetores foram capazes de expressar altos níveis de TnC e TnI após indução com IPTG (Fig.2). O acúmulo de TnI foi maior nas bactérias co-expressando TnC que nas expressando apenas TnI (Quaggio et al., 1993). Nenhuma diferença foi observada na razão de TnC/TnI ou no nível total de expressão quando pET-CI foi comparado com pET-IC, demonstrando que a ordem dos cDNAs no plasmídeo não influenciam o acúmulo final das proteínas (Fig.2). A TnI, que acumula-se em corpos de inclusão e torna o plasmídeo instável (Quaggio et al., 1993), permaneceu em solução quando co-expressa com a TnC, o que seria esperado se a TnI e a TnC estivessem interagindo.

O complexo TnC/TnI produzido "in vivo" foi purificado utilizando-se condições não denaturantes e comparado com complexos formados "in vitro". Durante a purificação toda a TnC e TnI foram recuperadas nas frações contendo o complexo, confirmando que as duas proteínas foram expressas na razão estequiométrica aproximada de 1:1. Para verificar se o complexo TnC/TnI é de alta afinidade, a dissociação do complexo em 6 M uréia foi estudada. O complexo produzido "in vivo" apresentou uma associação Ca^{2+} dependente em 6 M uréia semelhante ao complexo formado "in vitro" (Fig.3A), indicando que a associação da TnC e TnI no complexo formado "in vivo" é semelhante ao formado "in vitro".

Nós utilizamos pET-CI e pET-TnT para construir dois vetores designados para co-expressar as três subunidades da troponina. Para isto nós introduzimos o cDNA da TnT antes ou depois do cassete TnC/TnI com o objetivo de verificar se existe algum efeito posicional nos níveis de expressão da TnT (Fig.1). O mesmo princípio de utilizar promotores T7 individuais para cada cDNA foi utilizado e um único terminador foi utilizado nestas construções (Fig.1). Altos níveis de expressão TnC, TnI e TnT foram obtidos utilizando pET-CIT ou pET-TCI. No entanto, os níveis de acúmulo de TnT nas bactérias foram menores que os níveis de TnC e TnI (Fig.2). Os níveis de TnT obtidos

utilizando-se pET-TnT são consistentemente mais baixos que os níveis de TnC e TnI obtidos com pET-TnC ou pET-TnI. A observação inesperada foi que os níveis de TnT obtidos com pET-CIT ou pET-TCI foram também reduzidos quando comparados com os níveis obtidos com pET-TnT (Fig.2). Este menor acúmulo de TnT poderia se decorrente da interferência entre os três promotores presentes no mesmo plasmídeo ou de alguma forma de competição das três mensagens por um pool limitado da maquinaria de tradução. Para testar estas possibilidades um vetor resistente à tetraciclina contendo o cDNA para a TnT sob o controle do promotor T7 foi construído (pBR-TnT, Fig.1). Experimentos iniciais demonstraram que pBR-TnT expressa TnT tão bem quanto pET-TnT (dados não apresentados). Este vetor foi co-transformado com pET-CI em BL-21(DE3) pLysS selecionadas para resistência à ampicilina e tetraciclina. Os níveis de expressão de TnT obtidos a partir de bactérias contendo os dois plasmideos (pET-CI e pBR-TnT) foram similares aos níveis obtidos com pET-CIT ou pET-TCI (Fig.2), demonstrando que a síntese de TnC e TnI na mesma bactéria, apesar de produzida por plasmídeos diferentes, é suficiente para reduzir a expressão da TnT a partir de um plasmídeo independente (Fig.2). Estas observações sugerem que o menor acúmulo de TnT na presença de expressão de TnI/TnC não resulta de algum problema na transcrição dos cDNAs a partir de pET-CIT ou pET-TCI.

Para examinar se as três subunidades produzidas por pET-CIT montam "in vivo" em um complexo troponina funcional, purificamos o complexo em condições não denaturantes. A análise dos extratos proteicos totais das culturas induzidas indicou que as bactérias acumularam um excesso de TnI/TnC sobre TnT. Como observado para pET-CI e pET-IC toda a TnI foi encontrada na fração solúvel, sugerindo que estava complexada com a TnC (Fig.3B, linha a). O fracionamento do lisado total com sulfato de amônio resultou em uma fração contendo toda a TnT e praticamente toda a TnC e TnI. Como esperado, um excesso de TnC e TnI sobre TnT estava presente neste ponto da purificação (Fig 3B, linha b). As proteínas foram fracionadas em dois picos principais utilizando-se uma coluna de troca iônica. O primeiro pico continha complexo TnC/TnI puro, sem TnT e eluíu nas mesmas condições que o complexo TnC/TnI isolado de pET-IC. O segundo pico, que eluíu mais tarde no gradiente, continha quantidades equimolares das três subunidades da troponina (Fig.3B, linha c). A análise densitométrica destas frações mostrou uma razão molar de troponina T/troponina I/troponina C de 1:1,5:0,7, razões molares semelhantes foram obtidas para o complexo troponina

reconstituído (1:1,4:0,8) de acordo com determinações anteriores utilizando métodos semelhantes (yates e Greaser, 1983). O rendimento final do complexo troponina foi alto e suficiente para a maioria das aplicações (5 mg de complexo troponina puro por litro de cultura). A observação de que estas frações continham TnI, que não se liga à colunas trocadoras de ânion sugeriu que as proteínas estavam complexadas. Para confirmar se as três subunidades associaram-se em um complexo e não foram apenas co-purificadas, o complexo foi analisado em uma coluna de gel filtração. Os perfis de eluição estão apresentados na Fig.4. O complexo eluíu como um único pico e com um peso molecular aparente maior do que o complexo TnC/TnI utilizado como marcador. A análise dos picos em SDS-PAGE indicou que a razão molar de TnC:TnI:TnT foi a mesma em todas as frações, como esperado para uma preparação homogênea. Estes resultados demonstram que quando co-expressas em *E. coli*, as três subunidades da troponina associam-se em um complexo ternário. Os resultados mostram também que devido à uma menor expressão da TnT nem todos os dímeros TnC/TnI estavam associados com uma molécula de TnT. No entanto, toda a TnT presente nestas bactérias foi encontrada associada à TnC e TnI. Esta observação sustenta a idéia de que o rendimento final do complexo trimérico é limitado pelos baixos níveis de expressão de TnT.

Com o objetivo de se verificar se o complexo montado em *E. coli* é funcional, comparamos o complexo montado "in vivo" com um complexo produzido através da renaturação das subunidades isoladas em uréia. Para isto ambos os complexos foram utilizados com actina e tropomiosina para reconstituir filamentos finos regulados. O complexo produzido em *E.coli* foi capaz de conferir regulação Ca^{2+} dependente à atividade ATPásica da acto-miosina da mesma maneira que o complexo reconstituído "in vitro" (Fig.5A). A extensão da regulação e o ponto médio da resposta ao Ca^{2+} foram idênticos para os dois complexos. Os complexos binários TnC/TnI produzido em *E.coli* e o reconstituído "in vitro" não são capazes de conferir sensibilidade ao Ca^{2+} quando utilizados nas mesmas concentrações (Fig.5B), demonstrando que a TnT presente no complexo é funcional.

Os resultados demonstram a possibilidade de expressar e montar um complexo troponina trimérico e funcional em *E.coli*. Deve ser ressaltado que a montagem do complexo troponina funcional pode ser obtida "in vitro", mas altos níveis de complexo totalmente funcionais podem apenas ser obtidos a partir das três subunidades denaturadas em uréia (Greaser e Gergely, 1971). Isto se deve provavelmente ao caráter altamente insolúvel da TnT e TnI. Nós não determinamos se algum

componente bacteriano está involvido na montagem do complexo em *E. coli*, mas é evidente que a co-expressão das três subunidades evita o acúmulo de TnI nos corpos de inclusão.

Tem sido uma observação frequente que várias proteínas eucarióticas acumulam em corpos de inclusão quando expressas em *E. coli*. Isto representa uma grande preocupação na seleção de vetores para altos níveis de expressão para a produção de proteínas recombinantes funcionais (Mitraki et al., 1991; Frankel et al., 1991). Nossos resultados com as subunidades da troponina demonstram que quando expressas com os parceiros apropriados pelo menos algumas das proteínas eucarióticas que normalmente se acumulariam em corpos de inclusão podem ser apropriadamente enoveladas e montadas no citoplasma procarioto. Esta abordagem poderá ser útil no estudo dos mecanismos envolvidos na montagem de proteínas recombinantes multiméricas.

d) Figuras

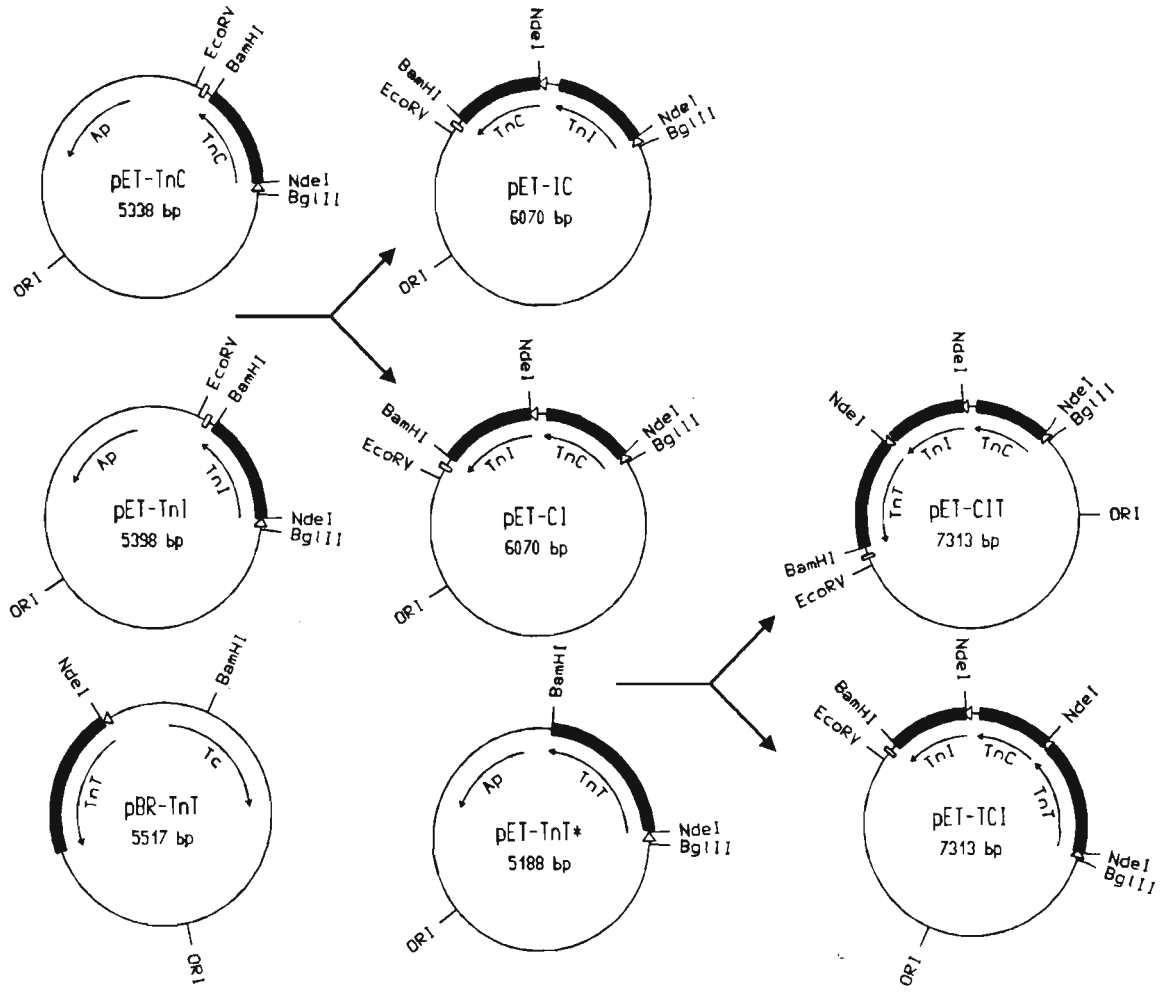


Fig. 1. **Estrutura dos plasmídeos de expressão**. Para a construção de pET-CI (TnC/TnI) o fragmento BglII-EcoRV de pET-TnI foi clonado em pET-TnC pré-digerido com BamHI/EcoRV. Para a construção de pET-IC (TnI/TnC) o fragmento BglII-EcoRV de pET-TnC foi clonado em pET-TnI pré-digerido com BamHI/EcoRV. Para a construção de pET-CIT (TnC/TnI/TnT) e pET-TCI (TnT/TnC/TnI) o fragmento BglII-BamHI de pET-TnT* foi clonado no sítio BamHI de pET-CI, produzindo pET-CIT, ou no sítio BglII de pET-CI, produzindo pET-TCI. Em todas as construções, cada cDNA é precedido por um promotor T7 (△). O terminador de transcrição (□) está também indicado. O plasmídeo pBR-TnT que expressa TnT e confere resistência à tetraciclina (Tc) foi construído através da clonagem do fragmento BglII-EcoRI de pET-TnT no sítio ScaI de pBR322.

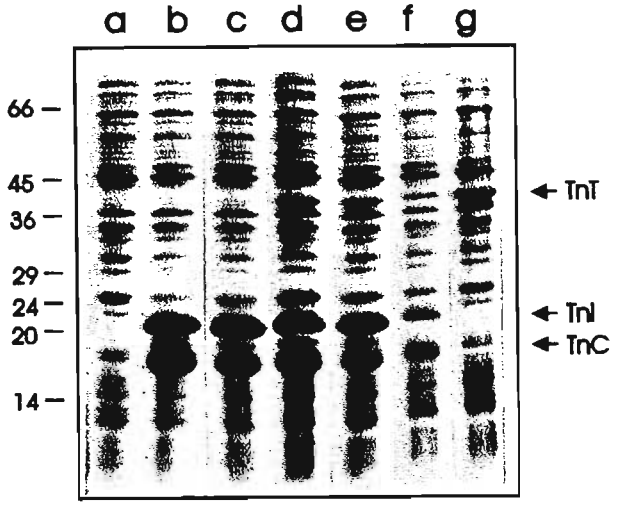


Fig.2. **Expressão das subunidades da troponina**. *E.coli* BL-21(DE3) pLysS transformadas com os diferentes plasmídeos foram induzidas com IPTG e os lisados totais foram analisados em SDS-PAGE 15%. Linhas: a- não induzido; b- pET-CI induzido; c- pET-IC induzido ; d- pET-CIT induzido; e- pET-TCI induzido; f- pET-CI + pBR-TnT induzido (pET-CI e pBR-TnT foram co-transformados e selecionados para resistência à ampicilina e tatraciclina); g- pET-TnT induzido. As posições dos pesos moleculares, de TnT, TnI e TnC estão indicadas.

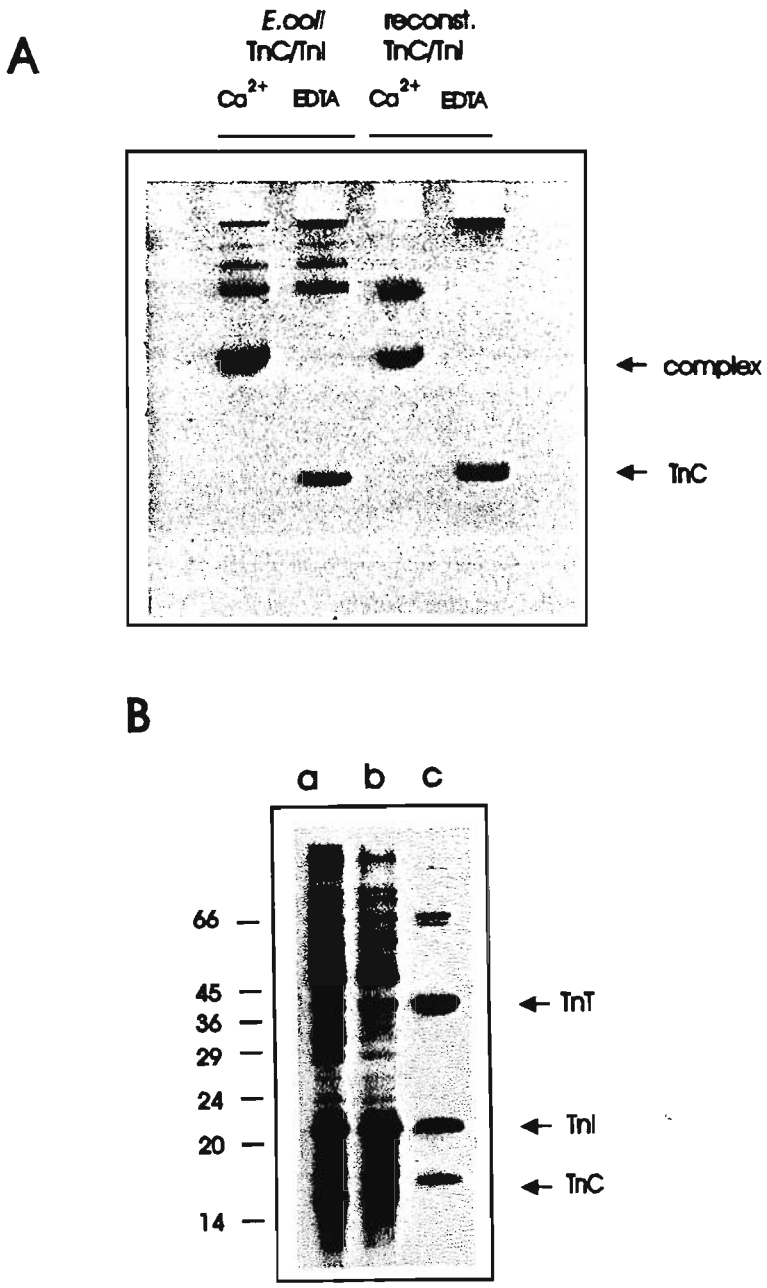


Fig.3. - A. **Associação Ca^{2+} dependente dos complexos TnC/TnI produzidos em *E. coli* ou reconstituídos "in vitro".** O complexo TnC/TnI é observado nos géis de uréia na presença de Ca^{2+}. Na presença de EDTA o complexo é dissociado e apenas a TnC pode ser observada. A TnI não entra no gel. - B. **Purificação do complexo TnC/TnI/TnT produzido "in vivo".** Linhas: a- Fração solúvel após lise das *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com pET-CIT; b- Proteínas que precipitam na fração 40-50% de sulfato de amônio; c- O complexo trimérico após purificação na coluna de DEAE-Sepharose. A posição dos marcadores de peso molecular e da TnT, TnI e TnC estão indicadas.

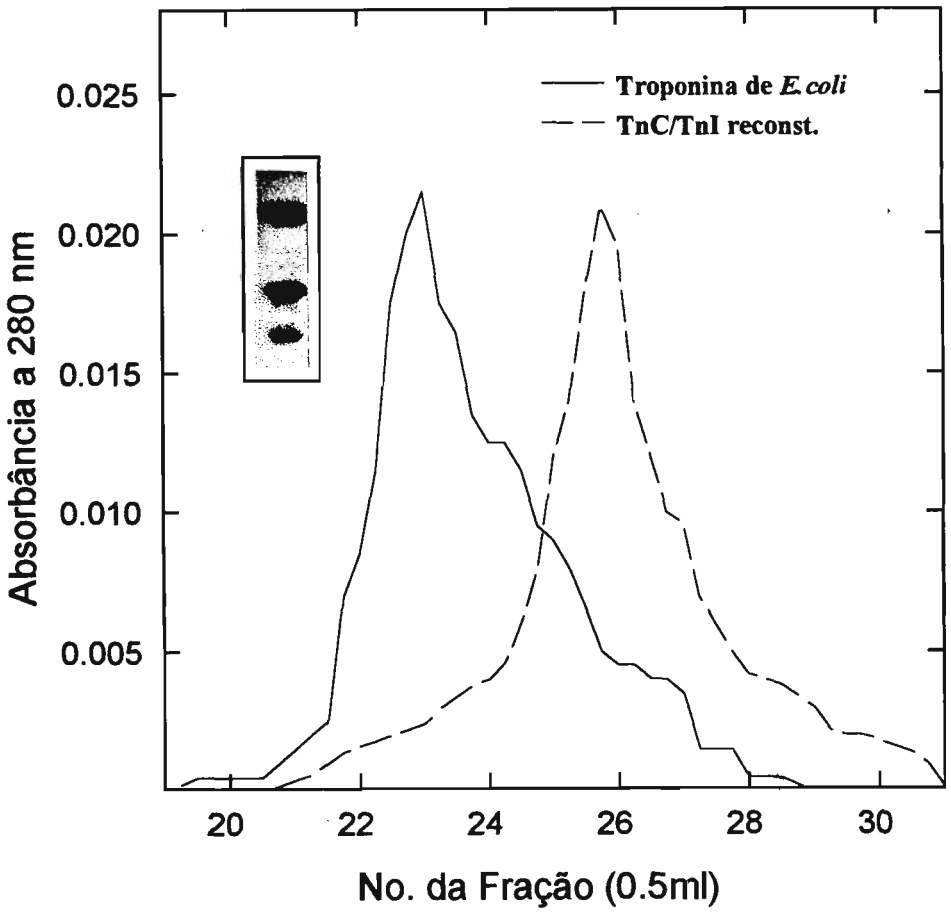


Fig.4. **Fracionamento em gel filtração do complexo troponina produzido "in vivo".**

O complexo troponina trimérico purificado de *E.coli* foi analisado em uma coluna de gel filtração. As três subunidades co-eluíram em um único pico (linha sólida) indicando que formam um complexo estável. O inserto apresenta um SDS-PAGE do complexo troponina de *E. coli* eluído na fração 23 mostrando as três subunidades. Como controle o complexo dimérico foi fracionado na mesma coluna e este apresentou um menor peso molecular (linha descontínua).

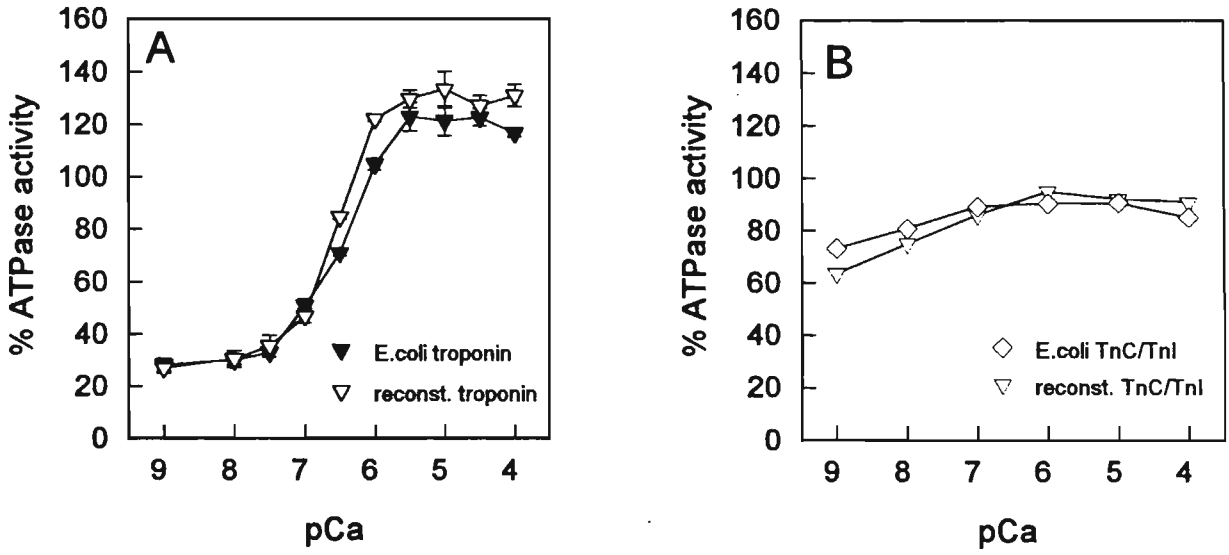


Fig.5. **Regulação dependente de Ca^{2+} da atividades ATPásica da acto-miosina pela troponina de *E.coli*.** O complexo troponina produzido in *E.coli* (triângulos cheios) e o complexo troponina reconstituído a partir das subunidades isoladas (triângulos vazios) foram comparados quanto à sua habilidade em regular a atividade ATPásica da acto-miosina em função da concentração de Ca^{2+}. A- Quando reconstituído com actina e tropomiosina, o complexo de *E. coli* foi capaz de conferir sensibilidade ao Ca^{2+} à atividade ATPásica da acto-miosina, inibindo a ATPase a baixas concentrações de Ca^{2+} e ativando-a a altas concentrações de Ca^{2+}. Os dados estão apresentados como médias ± S.E.M (n=4). B- O complexo TnC/TnI produzido em *E.coli* e o complexo TnC/TnI reconstituído "in vitro" não são capazes de conferir sensibilidades ao Ca^{2+} ao sistema quando utilizados nas mesmas razões molares, demonstrando que a TnT presente no complexo trimérico é funcional. A atividade ATPásica foi expressa como porcentagem da atividade observada na ausência de troponina.

2-PROJETO II

MAPEAMENTO DOS DOMÍNIOS FUNCIONAIS DA TROPONINA T

Tradução do manuscrito: "Mapping of the Functional Domains of Troponin T" B. Malnic, C.S. Farah and F.C. Reinach, a ser submetido para publicação.

Resumo

O complexo troponina regula a contração muscular de maneira dependente de Ca^{2+}. A presença da troponina T é necessária para que o complexo troponina confira à atividade ATPásica da acto-miosina sensibilidade ao Ca^{2+} nas condições fisiológicas. Neste trabalho nós produzimos mutantes de deleção de TnT e utilizamos mutantes de deleção de TnI com o objetivo de estudar as interações entre as diferentes regiões da TnT e os outros componentes do filamento fino, na presença e ausência de Ca^{2+}. O papel funcional destas interações foi analisado através de ensaios de atividade ATPásica. Através dos resultados obtidos foi possível dividir a TnT em três domínios: o domíno ativatório (aminoácidos 1-157), o domínio inibitório (aminoácidos 157-216) e o domínio que ancora o dímero TnC/TnI ao filamento fino. Demonstramos que a ancoragem do dímero TnC/TnI ao filamento fino através da interação da região amino-terminal da TnI (aminoácidos 1-98) com a região carbóxi-terminal da TnT (aminoácidos 216-263) é necessária para que ocorra a ativação da atividade ATPásica na presença de Ca^{2+}. Baseado nos resultados obtidos um modelo para as mudanças conformacionais induzidas pelo Ca^{2+} no complexo troponina é proposto.

a) Introdução

A troponina e a tropomiosina mediam a regulação dependente de Ca^{2+} da contração muscular. Estas proteínas estão presentes no filamento fino em uma razão molar de 7:1:1 (actina:tropomiosina:troponina) (Ebashi et al., 1973; Potter, 1974; Yates e Greaser, 1983). Cada tropomiosina consiste de um dímero de dois polipeptídeos em alfa-hélice associados em uma estrutura "coiled-coil" (Smillie, 1979). As moléculas de tropomiosina estão polimerizadas cabeça-cauda sobre o filamento de actina, de forma que uma tropomiosina cobre 7 actinas. O complexo troponina, que consiste de três subunidades, TnC, TnI e TnT, está regularmente localizado a dois terços da distância entre a região amino-terminal e a região carbóxi-terminal de cada tropomiosina (Zot e Potter, 1987).

A TnI isolada liga-se aos filamentos de acto-tropomiosina e inibe a atividade ATPásica da acto-miosina (Greaser e Gergely, 1971; Greaser e Gergely, 1973; Perry et al., 1972; Syska et al., 1976). A TnC, na presença de Ca^{2+}, liga-se fortemente à TnI removendo-a do filamento fino, restaurando a atividade ATPásica da acto-miosina (Farah et al., 1994). No entanto, o complexo binário TnC/TnI confere pequena sensibilidade ao Ca^{2+} à atividade ATPásica da acto-miosina em razões fisiológicas de actina para troponina e é incapaz de ativar a atividade ATPásica em altas concentrações de Ca^{2+} (Malnic e Reinach, 1994).

Já foi amplamente demonstrado que em razões molares fisiológicas de actina:troponina a presença da TnT é necessária para que haja regulação dependente de Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina (Greaser e Gergely, 1971; Hitchcock et al., 1973; Malnic e Reinach, 1994; Potter et al., 1995). A TnT é portanto requerida não apenas para inibição total, mas também para a ativação da atividade ATPásica da acto-miosina.

A TnT liga-se aos outros componentes do complexo troponina e à tropomiosina e portanto é responsável pela ancoragem do dímero TnC/TnI ao filamento fino (Mak e Smillie, 1981; Hitchcock, 1975). Estudos de microscopia eletrônica mostraram que o complexo troponina isolado apresenta um domínio globular e um domínio em bastão (Flicker et al., 1982). A TnT é uma proteína de forma alongada e corresponde principalmente ao domínio em bastão do complexo troponina. Acredita-se que o domínio globular inclui aTnI, a TnC e uma parte da metade carbóxi-terminal da TnT (Flicker

et al., 1982). A forma da TnT sugere que ela deve interagir com uma extensa porção do comprimento da tropomiosina.

Dois sítios distintos de ancoragem da TnT à tropomiosina foram identificados. O primeiro sítio está presente próximo à região da sobreposição cabeça-cauda das moléculas de tropomiosina ao longo do filamento fino (Mak e Smillie, 1981). Esta região interage com o fragmento T_1 da TnT (Fig.1a). Como a região T_1 corresponde à região amino-terminal da TnT esta está posicionada sobre o filamento fino de maneira anti-paralela em relação à tropomiosina. Esta interação é independente de Ca^{2+} (Pearlstone e Smillie, 1982).

O segundo sítio de interação está presente no fragmento T_2 da TnT (Fig.6a) que se liga próximo aos resíduos 150-180 da tropomiosina (Mak e Smillie, 1981; White et al., 1987). Este fragmento da TnT, que também interage com a TnC e a TnI "in vitro", liga-se à tropomiosina de maneira sensível ao Ca^{2+} na presença da TnC (Pearlstone e Smillie, 1982).

Vários laboratórios demonstraram que "in vitro" existe uma interação sensível ao Ca^{2+} entre a TnT e a TnC (Van Eerd e Kawasaki, 1973; Pearlstone e Smillie, 1978; Grabarek et al., 1981; Tanokura et al., 1983). Os sítios na TnT que interagem com a TnC ainda não foram claramente identificados. Vários peptídeos que cobrem a sequência da região T_2 da TnT são capazes de ligar TnC de maneira dependente de Ca^{2+}: os fragmentos P2, B2, CB4 e CB6 (Fig.6a) (Pearlstone e Smillie, 1978). Pan e Potter (1992) demonstraram que duas isoformas diferentes do fragmento T_2, diferindo na sequência dos exons 16/17 (Fig.6a), apresentam afinidades diferentes pela TnC e alteram diferentemente a afinidade ao Ca^{2+} da TnC. Baseado nestes resultados, uma região relativamente ampla de T_2 parece estar envolvida na interação com a TnC. Estudos anteriores demonstraram que a região amino-terminal da TnC deve conter o sítio de interação com a TnT (Grabarek et al., 1981). Recentemente, Potter et al (1995) demonstraram que a combinação da TnT ao complexo binário TnC/TnI resulta na ativação da atividade ATPásica da acto-miosina. Utilizando um mutante de TnI (que apresenta deleção dos aminoácidos 1 a 57) que não interage diretamente com a TnT eles mostraram que esta ativação resulta de um efeito direto da TnC sobre a TnT e não de um efeito indireto da TnC sobre a TnI que é transmitido para a TnT.

A interação entre a TnT e a TnI também já foi demonstrada, apesar das dificuldades associadas à baixa solubilidade destas subunidades. Pearlstone e Smillie (1980) mostraram através

de ensaios de gel filtração que o fragmentos B2 (Fig.6a) não se liga à TnI, enquanto que CB4, CB5 e P2 (Fig.6a) se ligam. Chong e Hodges (1982a) demonstraram através de estudos de ligação cruzada que a região amino-terminal da TnI está próxima à região amino-terminal do fragmento CB4 (Fig.6a) e à região carbóxi-terminal do fragmento CB2 (Fig.6a) da TnT. Concordantemente, Hitchcock et al (1981; 1982) demonstraram através de um ensaio de proteção contra a marcação com anidrido acético que lisinas na região amino-terminal de CB4 são protegidas pela TnI e que lisinas na região amino-terminal da TnI são protegidas pela TnT. Nós demonstramos que a região amino-terminal da TnI (aminoacidos 1-98) é necessária para a incorporação da TnT em um complexo troponina estável (Farah et al., 1994). Potter et al (1995) mostraram que a deleção dos aminoácidos 1-57 da TnI abole a interação com a TnT nos complexos binários TnT/TnI. Todos estes resultados indicam que o sítio na TnT para interação com a TnI reside provavelmente na região amino-terminal do fragmento T_2, e que a região amino-terminal da TnI é o sítio de ligação para a TnT.

Neste trabalho nós produzimos mutantes de deleção da TnT com o objetivo de mapear as regiões envolvidas na interação com os outros componentes do filamento fino e para compreender o papel destas interações na capacidade da TnT em conferir sensibilidade ao Ca^{2+} à atividade ATPásica da acto-miosina.

b) Materiais e métodos

Proteínas- Actina (Pardee e Spudich, 1982) e miosina (Reinach et al., 1982) foram preparadas de músculo peitoral de galinha. α-tropomiosina (Smillie, 1982) foi preparada a partir de músculo cardíaco de galinha. TnC e TnI recombinantes foram isoladas como descrito (Fujimori et al., 1990; Quaggio et al., 1993). Os mutantes de deleção de TnI foram preparados como descrito anteriormente (Farah et al., 1994).

Construção dos mutantes de deleção de TnT - O cDNA da isoforma 3 de TnT de músculo esquelético de galinha, clonado em M13mp18 (Smillie et al., 1988), foi utilizado como molde para mutagênese sítio-dirigida (Kunkel et al., 1987). Previamente um sítio de NdeI havia sido inserido no codon MetI (Farah et al., 1994). M13mp18-TnT-3 foi mutado com o oligonucleotídeo 5'-GTTATACCAGTAGCAGACTGA-3' para mudar o codon Leu^{217} para um stop codon (sublinhado), com o oligonucleotídeo 5'-GGCGCAAGTAATTGAACATTGA-3' para mudar o codon Pro^{192} para um codon stop e o oligonucleotido 5'-AGGCGCAAGCATATGAACATTGACC-3' foi utilizado para introduzir um sítio para NdeI (sublinhado) nos codons 192 e 193. O vetor de expressão pET, baseado no promotor T7, foi utilizado para expressar os mutantes de deleção (Studier et al., 1990). O fragmento NdeI-EcoRI de M13mp18-TnT-3 contendo um stop codon na posição 192 ou 217 foram clonados nos mesmos sítios do vetor pET-3a. Estes vetores expressam respectivamente os fragmentos TnT_{1-216} (os primeiros 216 aminoácidos da TnT) e TnT_{1-191} (os primeiros 191 aminoácidos da TnT). O fragmento pequeno NdeI-EcoRI (produzido pelo segundo sítio para NdeI, inserido nas posições 192 e 193) foi subclonado nos mesmos sítios de pET-3a, produzindo um vetor para a expressão do fragmento $TnT_{194-263}$ (aminoácidos 194-263). Para a produção do fragmento $TnT_{157-263}$, o inserto NcoI-BamHI do vetor de expressão pET-TnT* (Malnic e Reinach, 1994) foi subclonado nos mesmos sítios de pET-3d (Studier et al., 1990), da mesma maneira que descrito por Pan e Potter, 1992.

Expressão e purificação dos fragmentos recombinantes de TnT - *E.coli* BL21(DE3) pLysS (Studier et al., 1990) foi utilizada para expressar TnT selvagem, TnT_{1-216}, TnT_{1-191}, $TnT_{157-263}$ e TnT_{194-}

$_{263}$. Culturas (4 litros) de *E.coli* contendo os diferentes plasmídeos foram induzidas com IPTG (0,4mM final) em A_{600}=0,8 e incubadas por 3 h a 37^{0}C. Para a purificação da TnT selvagem, TnT_{1-216}, TnT_{1-191} e $TnT_{157-263}$ as bactérias foram recuperadas por centrifugação a 3.000 x g (15 minutos), ressuspendidas em 100 ml de Tris-Cl 50 mM pH8,0, EDTA 1 mM, uréia 6 M, β-mercaptoethanol 1,4 mM e lisadas na French Press a 16.000 psi. O extrato foi centrifugado a 109.200 x g (40 minutos) e o sobrenadante foi primeiro aplicado à uma coluna de DEAE-Sepharose Fast-Flow XK16/70 equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas foram retidas na coluna e eluídas com um gradiente de 0-600 mM NaCl. As frações contendo as proteínas foram separadas e dializadas contra acetato de sódio 50 mM pH5.0, EDTA 1 mM, uréia 6 M, β-mercaptoethanol 1,4 mM e aplicadas à uma coluna de CM-Sepharose Fast-Flow XK16/40 equilibrada com o mesmo tampão. Proteínas foram eluídas com um gradiente de 0-600 mM NaCl. As proteínas purificadas foram dialisadas contra Tris-HCl 50 mM pH8,0, EDTA 1 mM, KCl 1 M, DTT 1 mM e armazenadas a -20^{0}C. Para a purificação de $TnT_{194-263}$ as células de *E.coli* foram ressuspendidas em Tris-HCl 50 mM pH8,0, EDTA 1 mM, β-mercaptoethanol 1,4 mM e lisadas na French Press a 16.000 psi. O extrato foi centrifugado a 75.800 x g (40 minutos) e o sobrenadante foi aplicado à uma coluna de CM-Sepharose Fast-Flow XK16/40 equilibrada com o mesmo tampão. A proteína foi eluída com um gradiente de 0-500 mM NaCl, dialisada contra Tris-HCl 50 mM pH8,0, uréia 6 M, β-ME 1,4 mM e aplicada à uma coluna de DEAE-Sepharose Fast-Flow XK16/70 . A proteína foi eluída no volume de exclusão, dialisada contra Tris-HCl 50 mM pH8,0, EDTA 1 mM, KCl 1 M, DTT 1 mM e armazenada a -20^{0}C. Todas as concentrações proteicas foram determinadas através do método de Hartree, 1972. Quando analisados em SDS-PAGE 15 % os fragmentos de deleção apresentaram os pesos moleculares esperados: 25.5 kD (TnT_{1-216}), 22.5 kD (TnT_{1-191}), 12.5 kD ($TnT_{157-263}$) e 8.5 kD ($TnT_{194-263}$).

Reconstituição do complexo troponina - TnT, TnI e TnC (20 μM final cada) foram combinadas em uma razão molar de 1:1:1 e submetidas a uma série de diálises sucessivas (como descrito nos métodos do projeto I). Após as diálises, os complexos foram centrifugados (12,000 x g, 10 min) e os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados a -70^{0}C. Complexos contendo os mutantes TnI_{1-98} e $TnI_{103-182}$ (Farah et al., 1994) no lugar de TnI selvagem também foram reconstituídos desta maneira.

Ensaios da atividade ATPásica da acto-miosina- A atividade ATPásica da acto-miosina foi medida da mesma maneira como descrito nos materiais e métodos do projeto I.

Ensaios de co-sedimentação- A ligação do complexo troponina à acto-tropomiosina foi analisada através de um método de ultracentrifugação. Actina (20 μM), tropomiosina (2,86 μM) e troponina (2,86 μM) foram combinadas em imidazol 20 mM pH7,0, NaCl 60 mM, $MgCl_2$ 3 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM, β-mercaptoethanol 2 mM (+ Ca^{2+}) ou no mesmo tampão com EGTA 0,5 mM ao invés de $CaCl_2$ (- Ca^{2+}). As misturas foram homogeneizadas e centrifugadas a 315.000 x g por 10 minutos a 4^0C em uma centrífuga Beckman-Optima TLX. Os precipitados foram lavados com tampão e ressuspendidos no volume original utilizando o mesmo tampão. Volumes iguais da mistura antes da centrifugação, dos sobrenadantes e dos precipitados foram analisados em SDS-PAGE 15 % ou em Tricina- SDS-PAGE 12,5 % (Schaegger e von Jagow, 1987) no caso dos fragmentos pequenos $TnT_{194-263}$ e $TnT_{157-263}$. A quantificação densitométrica foi realizada utilizando-se um densitômetro Shimadzu CS-9000 a 550 nm.

Eletroforese em gel não-denaturante- Eletroforese em poliacrilamida em Tris 25 mM/glicina 80 mM foi realizada como descrito por Head and Perry (1974). Amostras foram preparadas em soluções contendo Tris 25 mM, glicina 80 mM (pH 8,6), DTT 1,3 mM, azul de bromofenol 0,013 %, glicerol 10 %, KCl 200 mM e $CaCl_2$ 5 mM (+$CaCl_2$) e EGTA 5 mM (-$CaCl_2$), e foram processadas para eletroforese em géis de poliacrilamida 8 %.

c) Resultados

i) Mutantes de deleção de TnT - Uma representação esquemática da TnT está apresentada na Fig.6a. Os fragmentos quimiotrípticos T_1 , T_2 (Ohtsuki, 1979), os fragmentos de brometo de cianogênio (CB) (Pearlstone e Smillie, 1977) e os subfragmentos de T_2 (Pearlstone e Smillie, 1978) estão indicados. Duas regiões altamente conservadas em TnTs de diferentes espécies (de *Drosophila melanogaster* até homem) estão representadas por quadrados preenchidos. A primeira destas regiões corresponde à CB2, que é uma região com estrutura de alfa-hélice e o sítio de interação do fragmento T_1 com a tropomiosina (Pearlstone e Smillie, 1977). O segundo, presente dentro de T_2, coincide com uma região contendo uma série de "heptad repeats", típicos de uma estrutura em coiled-coil (Pearlstone e Smillie, 1981). Os fragmentos proteolíticos que interagem com a TnC (CB4 e CB6) (Pearlstone e Smillie, 1978) e com a TnI (P2 e CB4) (Pearlstone e Smillie, 1980; 1985) indicam que uma ampla região de T_2 está provavelmente envolvida na interação com a TnC e a TnI. As observações de que B2 não é capaz de ligar TnI enquanto que P2 é (Pearlstone e Smillie, 1980), e que a TnI pode sofrer ligação cruzada com a região carbóxi-terminal de CB2 e com a região amino-terminal de CB4 (Chong e Hodges, 1982a), sugerem que o sítio de ligação para a TnI na TnT reside na metade amino-terminal de T_2.

Deleções foram produzidas na região carbóxi-terminal da TnT com o objetivo de mapear os sítios de interação com a TnC, a TnI e com a tropomiosina dentro de T_2 . Os dois primeiros mutantes TnT_{1-216} e TnT_{1-191} contém o fragmento T_1 inteiro. TnT_{1-216} contém aproximadamente metade da região T_2 deletada, enquanto em que TnT_{1-191} uma porção maior de T_2 foi deletada. Os sítios precisos para a localização dos stop codons foram escolhidos de forma que as alfa-helices preditas (também indicadas na Fig.6a) não seriam interrompidas. Os mutantes de deleção $TnT_{157-263}$ e $TnT_{194-263}$ não contém a região T_1. O fragmento $TnT_{194-263}$ é complementar à TnT_{1-191}.

Estes fragmentos foram expressos em *E.coli* utilizando-se o sistema pET como proteínas não-fusão e purificados. Os rendimentos finais de TnT selvagem, TnT_{1-216}, TnT_{1-191}, $TnT_{157-263}$ e $TnT_{194-263}$ purificados foram ~ 12,5 mg, 15 mg, 7 mg, 15 mg e 5 mg por litro de cultura induzida. Como a TnT selvagem, os mutantes de deleção são insolúveis em baixas forças iônicas (100mM), exceto TnT_{1-191}

que é solúvel a 60mM NaCl.

ii) Reconstituição dos complexos troponina- Complexos troponina contendo TnC selvagem, TnI selvagem e TnT selvagem ou os mutantes de deleção de TnT foram reconstituídos a partir dos componentes isolados (Fig.6b). O complexo binário TnC/TnI também foi reconstituído como controle. Após a reconstituição, os mutantes de TnT tornaram-se solúveis em baixas forças iônicas, indicando que foram incorporados em complexos troponina estáveis (isto não é necessariamente verdadeiro para TnT_{1-191}, que é solúvel por si só). Quando analisados em coluna de gel filtração na presença de Ca^{2+}, todos os complexos eluíram como picos únicos, inclusive o complexo contendo TnT_{1-191} (dados não apresentados). Na ausência de Ca^{2+}, TnT_{1-216} foi dissociado do complexo ternário e precipitou após centrifugação (dados não apresentados). Apesar de que o mesmo comportamento era esperado para TnT_{1-191}, não se observou precipitação deste mutante devido à sua maior solubilidade. Estes resultados indicam que todos os mutantes de TnT formaram complexos ternários na presença de Ca^{2+} e que a região dos aminoácidos 216-263 da TnT é necessária para a incorporação da TnT no complexo na ausência de Ca^{2+}.

Complexos contendo TnC, TnT selvagem ou $TnT_{157-263}$ e os mutantes de TnI TnI_{1-98} ou $TnI_{103-182}$ também foram reconstituídos. TnI_{1-98} contém a região amino-terminal da TnI e $TnI_{103-182}$ contém o peptídeo inibitório mais a região carbóxi-terminal da TnI (Farah et al., 1994). A análise através de gel filtração indicou que TnI_{1-98} forma complexos ternários estáveis, enquanto que $TnI_{103-182}$ forma complexos com TnC que não incorporam TnT (Farah et al., 1994). No entanto, observamos que uma remoção gradual e lenta do KCl através de diálise com uma pequena razão área/volume na presença de Ca^{2+} resulta em uma mistura de $TnI_{103-182}$, TnC e TnT onde a maior parte da TnT permanece solúvel.

iii) Incorporação dos complexos troponina no filamento fino- A ligação dos diferentes complexos à acto-tropomiosina foi analisada utilizando-se um método qualitativo de sedimentação. Os complexos foram combinados com actina e tropomiosina na presença ou ausência de Ca^{2+} e ultracentrifugados. Como Mg^{2+} estava presente nas duas condições assumimos que todos os efeitos

do Ca^{2+} são mediados pelos sítios I e II da TnC. Quantidades iguais da mistura antes da centrifugação, dos sobrenadantes e dos preciptados foram analisadas em eletroforese. Como esperado (Hitchcock, 1975; Potter e Gergely, 1974), o complexo binário TnC/TnI é parcialmente retido no filamento fino na ausência de Ca^{2+}, mas permanece solúvel na presença de Ca^{2+} (Fig.7a). O sítio de ligação ao filamento fino presente no complexo binário TnC/TnI na ausência de Ca^{2+} reside entre os aminoácidos 103-182 da TnI (Farah et al., 1994). Quando a TnT selvagem está presente, todos os três componentes permanecem associados ao filamento fino, tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} (Fig.7b). A TnT é portanto requerida para ancorar o complexo TnC/TnI ao filamento fino na presença de Ca^{2+}.

Para determinar qual região da TnT é responsável pela ancoragem do complexo binário TnC/TnI ao filamento fino as propriedades de ligação dos complexos ternários contendo os mutantes de deleção da TnT foram comparados ao complexo contendo a TnT selvagem. Quando os complexos contendo TnT_{1-216} e Tn_1T_{191} foram incubados com acto-tropomiosina estes dois mutantes permaneceram associados ao filamento fino na presença ou ausência de Ca^{2+} (Fig.7c e d) mas foram incapazes de reter o dímero TnC/TnI no filamento fino na presença de Ca^{2+} (Fig.7c e d). Este resultado mostra que a região carbóxi-terminal da TnT (resíduos 216-263; Fig.6a) contém o principal sítio de interação entre o dímero TnC/TnI e o filamento fino na presença de Ca^{2+}. Na ausência de Ca^{2+} a ligação mediada através deste sítio da TnT é mascarada pelo sítio presente no dímero TnC/TnI (Potter e Gergely, 1974; Hitchcock, 1975).

Em contraste aos mutantes de TnT contendo deleções na região carbóxi-terminal, a $TnT_{194-263}$ está sempre associada com o dímero TnC/TnI e as três subunidades movem-se juntas do precipitado para o sobrenadante de maneira Ca^{2+} sensível (Fig. 7e). Nestes experimentos um excesso de 3 vezes do complexo contendo $TnT_{194-263}$ foi utilizado para se poder visualizar a banda correspondente ao mutante $TnT_{194-263}$ nos géis. Consequentemente, um excesso do complexo é observado nos sobrenadantes na Fig.7e.

Finalmente, o complexo trimérico contendo $TnT_{157-263}$ permaneceu no filamento fino na ausência de Ca^{2+}, e foi parcialmente removido na presença de Ca^{2+} (Fig.7f). Este resultado está de acordo com as observações de Pearlstone e Smillie (1982) utilizando T_2 obtido por proteólise. É importante enfatizar que na presença de Ca^{2+} o fragmento $TnT_{157-263}$ ainda é capaz de reter uma fração

considerável de TnI e TnC no filamento fino, o que não é observado com o dímero TnC/TnI na ausência de TnT (Fig.7a). Isto implica que $TnT_{157-263}$ liga-se ao filamento fino. Quando comparado ao complexo contendo $TnT_{157-263}$, a afinidade total do complexo contendo $TnT_{194-263}$ pelo filamento fino é muito reduzida (Fig.7 e, f). Na presença de Ca^{2+}, apesar de uma concentração 3 vezes maior do complexo $TnT_{194-263}$/TnC/TnI ter sido utilizada, o complexo não foi precipitado com o filamento fino (Fig.7e). Isto significa que o sítio de ligação ao filamento fino reside na metade amino-terminal de $TnT_{157-263}$.

Os resultados da Fig.7 demonstraram que o complexo troponina apresenta três sítios diferentes para ligação ao filamento fino. O primeiro, presente no dímero TnC/TnI, existe apenas na ausência de Ca^{2+}. Os outros dois sítios estão presentes na TnT: o primeiro está contido na região T_1 e ancora o complexo troponina no filamento fino na presença de Ca^{2+} e contribui para a ancoragem (junto com o sítio presente em TnC/TnI) do complexo na ausência de Ca^{2+}. Este sítio é portanto insensível ao Ca^{2+}. O segundo sítio, presente na região amino-terminal de $TnT_{157-263}$ é sensível ao Ca^{2+}.

Os resultados indicam também que os resíduos 216-263 são necessários para a retenção do dímero TnI/TnC no filamento fino (Fig.7c,d). Em seguida procuramos determinar os papéis da TnC e TnI nesta interação.

iv) Incorporação do complexo binário TnC/TnT ao filamento fino- Tendo determinado que os últimos 50 aminoácidos da TnT estão envolvidos na ancoragem de TnC/TnI à TnT no filamento fino, nós determinamos em seguida qual o sítio presente no dímero TnC/TnI que interage com a TnT. Como já havia sido demonstrado que a TnC isolada é capaz de interagir com a TnT na presença de Ca^{2+} (Fig.8a, Pearlstone e Smillie, 1978; Grabarek et al., 1981), a ligação do complexo binário TnC/TnT selvagem (sem TnI) à acto-tropomiosina foi analisada na presença de Ca^{2+} para investigar até que ponto a TnT é capaz de ancorar a TnC ao filamento fino na presença de Ca^{2+}. Quando complexos contendo uma razão de 1:1 TnT:TnC foram incubados com o filamento fino, uma pequena fração de toda a TnC foi encontrada associada ao precipitado, enquanto que toda a TnT permaneceu associada ao filamento fino (Fig.8b). Isto indica que quando a TnT se liga à acto-tropomiosina a TnC dissocia-se da TnT e permanece em solução. A quantidade de TnC associada ao filamento fino foi medida em função da TnC total adicionada. Para se obter aproximadamente uma razão de 1:1 de

TnC:TnT ligado ao filamento fino na ausência de TnI, um excesso de 10 vezes de TnC precisou ser utilizado no ensaio de sedimentação (Fig. 8b). Na presença de TnI praticamente toda a TnC permanece ligada ao filamento fino (Fig.8b). Isto implica que apesar de a TnT e a TnC poderem interagir na presença de Ca^{2+}, esta interação é fraca e a TnC é deslocada da TnT pela acto-tropomiosina na ausência de TnI.

Baseado nestes resultados concluímos que existem dois sítios diferentes de interação entre a TnC e o filamento fino na presença de Ca^{2+}: o primeiro, através da ligação com a TnI que por sua vez está ligada na TnT, é um sítio forte. O segundo, através da interação direta com a TnT, é um sítio fraco e depende da presença de Ca^{2+}. Como não é possível fazer uma medida direta da interação entre a TnI e a TnT devido à insolubilidade destas duas subunidades na ausência de TnC, mutantes de TnI foram utilizados para determinar o sítio de interação entre a TnT e a TnI.

v) Incorporação de complexos troponina contendo os mutantes de deleção de TnI ao filamento fino- Já foi demonstrado anteriormente que a TnC e a TnI estão organizadas de uma maneira anti-paralela, com a região animo-terminal da TnI (resíduos 1-98) interagindo com o domínio carbóxi-terminal da TnC e o peptídeo inibitório mais a região carbóxi-terminal da TnI (resíduos 103-182) interagindo com o domínio amino-terminal da TnC (Farah et al., 1994). Enquanto que a TnI_{1-98} não é capaz de se ligar ao filamento fino, a $TnI_{103-182}$ liga-se ao filamento fino e é removida pela TnC na presença de Ca^{2+} (Farah et al., 1994). Para determinar que região da TnI está envolvida na interação com a TnT nós analisamos a ligação à acto-tropomiosina dos complexos TnI_{1-98}/TnC e $TnI_{103-182}$/TnC com ou sem TnT selvagem.

A Fig.9a mostra que o complexo binário TnC/TnI_{1-98} permanece solúvel na ausência de TnT independentemente da concentração de Ca^{2+}. Por outro lado, os complexos contendo TnC/TnI_{1-98}/TnT selvagem estão sempre associados ao filamento fino (Fig.9b), demonstrando que a região amino-terminal da TnI é necessária para a interação com a TnT. Como os mutantes TnT_{1-216} e TnT_{1-191} não contém a região carbóxi-terminal (aminoácidos 216-263) que interage com o complexo binário TnC/TnI (Fig.7c e d), esperávamos que eles fossem incapazes de reter TnI_{1-98}/TnC no filamento fino. Complexos ternários contendo TnI_{1-98} e o mutante TnT_{1-216} ou TnT_{1-191} foram analisados. Estes

mutantes de TnT foram incapazes de reter TnI_{1-98} no filamento fino, confirmando nossas predições (Fig.9c,d).

As figuras 9e e 9f mostram que o comportamento do mutante $TnI_{103-182}$ não foi influenciado pela presença da TnT. Ele está associado ao filamento fino na ausência de Ca^{2+}, e parcialmente removido na presença de Ca^{2+}. Isto era esperado já que na ausência de Ca^{2+} ele liga-se à actina "via" o peptídeo inibitório (Farah et al., 1994) e não está associado à TnC. A TnC é apenas capaz de interagir com $TnI_{103-182}$ na presença Ca^{2+}, quando ela remove este fragmento de TnI do filamento (Farah et al., 1994).

Estes resultados confirmam que a região amino-terminal da TnI interage fortemente com a TnT e que este representa o principal sítio de ancoragem do complexo binário TnI/TnC ao filamento fino na presença de Ca^{2+}. O fato de que os mutantes TnT_{1-216} e TnT_{1-191} são incapazes de conectar TnI_{1-98} ao filamento fino (Fig.9c,d) indica novamente que a região dos aminoácidos 216-263 da TnT constitui o principal sítio de ancoragem para a TnI. A possibilidade de que existam outras interações mais fracas entre a TnI e regiões adicionais da TnT não pode ser excluída. Os resultados da Fig.9e e 9f também mostram que o peptídeo inibitório mais a região carbóxi-terminal da TnI (aminoácidos 103-182) não interagem diretamente com a TnT, como esperado já que eles interagem principalmente com o domínio amino-terminal da TnC (Farah et al., 1994).

vi) Incorporação do fragmento $TnT_{157-263}$ ao filamento fino- A observação de que o complexo ternário contendo a $TnT_{157-263}$ é apenas parcialmente removido do filamento fino na presença de Ca^{2+} (Fig.7f) indica que a região entre os aminoácidos 157-263 liga-se ao filamento fino. A ausência da região T_1 no mutante $TnT_{157-263}$ permitiu-nos explorar a interação deste mutante com o filamento fino e a sua relação com a ligação do complexo binário TnC/TnI na presença e ausência de Ca^{2+}.

O efeito da TnC, TnI_{1-98} e $TnI_{103-182}$ na ligação do fragmento $TnT_{157-263}$ ao filamento fino foi investigado. Os complexos $TnT_{157-263}$/TnC, $TnT_{157-263}/TnI_{1-98}$/TnC e $TnT_{157-263}/TnI_{103-182}$/TnC foram reconstituídos e a sua incorporação ao filamento fino foi analisada. Quando o complexo $TnT_{157-263}$/TnC foi incubado com o filamento fino na ausência de Ca^{2+}, a $TnT_{157-263}$ foi incorporada no filamento fino enquanto que a TnC permaneceu em solução (Fig.10a). Este resultado demonstra que

$TnT_{157-263}$ é capaz de se ligar ao filamento fino por si só. Na presença de Ca^{2+} as duas subunidades permaneceram em solução (Fig.10a) indicando que a TnC é capaz de remover a $TnT_{157-263}$ do filamento fino na presença de Ca^{2+}. Em outras palavras, a ligação de Ca^{2+} à TnC aumenta a afinidade de $TnT_{157-263}$ pela TnC e reduz sua afinidade pelo filamento fino.

Utilizando os mutantes de TnI, nós investigamos se a TnI poderia alterar a interação da $TnT_{157-263}$ com a TnC e o filamento fino. A incorporação do complexo trimérico $TnT_{157-263}/TnI_{1-98}/TnC$ ao filamento fino foi analisada. Este complexo foi sempre encontrado no sobrenadante independentemente das concentrações de Ca^{2+} (Fig.10b), indicando que a interação entre a TnI_{1-98} e a TnT, na presença de TnC, impede a incorporação de $TnT_{157-263}$ ao filamento fino. Quando este mesmo experimento foi repetido na ausência de TnC apenas $TnT_{157-263}$ foi incorporado ao filamento fino na presença de TnI_{1-98}, indicando que apenas o dímero TnC/TnI_{1-98} impede a incorporação de $TnT_{157-263}$ ao filamento fino (Fig.10c).

Finalmente o complexo trimérico $TnT_{157-263}/TnI_{103-182}/TnC$ foi analisado. $TnI_{103-182}$ e $TnT_{157-263}$ foram incorporados ao filamento fino na ausência de Ca^{2+} enquanto que a TnC permaneceu em solução. As três subunidades permaneceram solúveis na presença de Ca^{2+} (Fig.10d) indicando que a ligação de Ca^{2+} à TnC causa a remoção de $TnI_{103-182}$ e $TnT_{157-263}$ do filamento fino.

Concluindo, este grupo de experimentos indica que na presença de Ca^{2+} apenas a presença da TnC é suficiente para remover $TnT_{157-263}$ do filamento fino. Na ausência de Ca^{2+} tanto a TnC quanto a região amino-terminal da TnI são necessárias.

vii) Um modelo estrutural derivado dos estudos de co-sedimentação- Todos os resultados obtidos a partir dos ensaios de co-sedimentação podem ser resumidos em um modelo estrutural que incorpora nosso modelo para o dímero TnC/TnI (Farah et al., 1994) e os resultados obtidos com os mutantes de deleção de TnT (Fig.14).

A TnT é divida em três domínios: (1) o domínio T_1, que interage com o filamento fino independentemente de Ca^{2+}. Os mutantes de TnT que contém a região T_1 ligaram-se ao filamento fino tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} (Fig.7c e d); (2) a metade amino-terminal de $TnT_{157-263}$, que interage com o filamento fino de maneira Ca^{2+} sensível. O fato de que o complexo contendo

$TnT_{157-263}$ liga-se ao filamento fino (Fig.7f) e o complexo contendo $TnT_{194-263}$ não (Fig.7e) demonstra que a metade amino-terminal de $TnT_{157-263}$ contém o sítio de ligação de $TnT_{157-263}$ ao filamento.Este sítio é sensível à Ca^{2+} quando a TnC está presente (Fig.7f e Fig.10a); (3) a metade carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$, que não interage com o filamento fino mas interage fortemente com o dímero TnC/TnI. Os mutantes que apresentam esta região deletada são incapazes de manter o dímero TnC/TnI no filamento fino (Fig.7c e d) enquanto que os mutantes que apresentam esta região estão sempre associados à TnC/TnI (Fig.7e, f).

A ancoragem do dímero TnC/TnI à esta região da TnT é mediada através da interação com a região amino-terminal da TnI (Fig.9b). A TnC é retida no filamento fino através da interação de seu domínio carbóxi-terminal com a região amino-terminal da TnI (TnI_{1-98}) (Farah et al., 1994). Na ausência de Ca^{2+} a região carbóxi-terminal da TnI está ligada ao filamento fino e na presença de Ca^{2+} esta região desliga-se do filamento fino e passa a interagir com o domínio carbóxi-terminal da TnC (Farah et al., 1994).

Além das interações descritas acima, existem interações fracas entre a TnC e a TnT (Fig.8). O sítio preciso da TnT que interage com a TnC não pode ser determinado mas a observação de que TnT_{1-216} é capaz de formar complexos ternários estáveis na presença de Ca^{2+} (como descrito no segundo item do resultados) apesar de não interagir diretamente com a TnI (Fig.9 c,d), sugere fortemente que ele provavelmente interage com a TnC (Fig.14).

viii) Regulação da atividade ATPásica da acto-miosina pelos mutantes de deleção da TnT- A TnT é necessária para a regulação dependente de Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina. Nós analisamos as propriedades regulatórias dos complexos ternários contendo os mutantes de TnT com o objetivo de determinar o papel das interações descritas acima na regulação da atividade ATPásica da acto-miosina. Razões molares fisiológicas de actina, tropomiosina e troponina (7:1:1) foram utilizadas. Como já demonstrado anteriormente (Hitchcock et al., 1973; Malnic and Reinach, 1994) o complexo binário TnI/TnC não mostrou sensibilidade ao Ca^{2+} (Fig.11a). O complexo ternário contendo a TnT selvagem foi capaz de conferir sensibilidade ao Ca^{2+} à atividade ATPásica da acto-miosina, inibindo-a no pCa 9.0 e ativando-a no pCa 4 (100% corresponde à atividade ATPásica da

acto/tropomiosina/miosina).

Os mutantes de TnT foram divididos em três grupos distintos de acordo com as suas capacidades regulatórias (Fig.11a): um grupo que não confere à atividade ATPásica da acto-miosina sensibilidade ao Ca^{2+} ($TnT_{194-263}$), um grupo que retém parte da capacidade inibitória mas que é incapaz de ativar a atividade ATPásica (TnT_{1-216} e $TnT_{157-263}$) e um grupo que perdeu a capacidade inibitória mas é capaz de ativar a atividade ATPásica (TnT_{1-191}).

O complexo contendo $TnT_{194-263}$ não conferiu sensibilidade ao Ca^{2+}, um comportamento semelhante ao do complexo binário TnI/TnC (Fig.11a). Este resultado é compatível com o fato de que apesar de a $TnT_{194-263}$ interagir com o dímero TnC/TnI, ele não o ancora ao filamento fino na presença de Ca^{2+} (Fig.7f).

Quando comparados com o complexo contendo TnT selvagem, os complexos contendo TnT_{1-216} e $TnT_{157-263}$ (que apresentam diferentes regiões deletadas, Fig.6a) comportaram-se de maneira muito semelhante: ambos retiveram parte da capacidade inibitória na ausência de Ca^{2+} mas não foram capazes de ativar a atividade ATPásica na presença de Ca^{2+} (Fig.11a). TnT_{1-216} inibe parcialmente a atividade ATPásica apesar de não ancorar o dímero TnC/TnI ao filamento fino (Fig.7c e 9c). O fato de que a $TnT_{157-263}$ retém a mesma capacidade inibitória que TnT_{1-216} indica que a região T_1 da TnT, que está deletada neste mutante (Fig.6a), não está diretamente envolvida na inibição e que a região presente em comum nestes dois mutantes, a metade amino-terminal de $TnT_{157-263}$ (aminoácidos 157-216), deve estar envolvida neste efeito inibitório. Concordantemente, os mutantes que apresentam esta última região rompida ($TnT_{194-263}$ e TnT_{1-191}, Fig.6a) não inibem a atividade ATPásica (Fig.11a). Isto está de acordo com a nossa observação de que a metade amino-terminal da $TnT_{157-263}$, interage com o filamento fino de maneira sensível ao Ca^{2+} (Fig.7e,f).

O complexo contendo TnT_{1-191} perdeu completamente a capacidade inibitória na ausência de Ca^{2+} mas é o unico mutante que foi capaz de ativar a atividade ATPásica (Fig.11a). Deve ser ressaltado que este mutante não interage diretamente com o dímero TnC/TnI. Isto implica que a região T_1 por si só contém a capacidade ativatória da TnT (veja abaixo). O fato de que TnT_{1-216} não é capaz de ativar a atividade ATPásica é esperado porque além de possuir a região ativatória (T_1) possui também a região inibitória da TnT (aminoácidos 157-216). Como os ensaios de co-sedimentação demonstraram que a região dos aminoácidos 216-263 da TnT, que está ausente na

TnT1-216 interage com o dímero TnC/TnI (Fig.7c e 9c), pode-se inferir que a ancoragem do dímero TnC/TnI é requerida para o bloqueamento do efeito inibitório da região dos aminoácidos 216-263 da TnT.

O ponto médio das curvas de ATPase vs. pCa dos complexos mutantes que exibiram regulação parcial (TnT_{1-216} ,$TnT_{157-263}$ e TnT_{1-191}) é idêntico ao obtido na ausência de TnT pelo complexo binário TnC/TnI. Este é deslocado para um pCa 7.2-7.4 do valor pCa 6.4 observado com a TnT selvagem (Fig.11b). Foi demonstrado que nos complexos TnC/TnI, TnC/TnI/TnT e TnC/TnI/TnT/tropomiosina os sítios específicos para Ca^{2+} da TnC exibem uma afinidade 10 a 20 vezes mais alta quando comparada à de TnC isolada (Potter e Gergely, 1975; Quaggio et al., 1993). Esta afinidade é reduzida e se torna igual à da TnC isolada quando o complexo troponina/ tropomiosina é incorporado ao filamento fino (Wnuk et al., 1984). Nossos resultados com os mutantes de deleção mostram que este deslocamento no pCa, decorrente da incorporação do complexo troponina no filamento fino, depende da presença da TnT selvagem.

Portanto, nossos resultados sugerem que a região T_1 contém a função ativatória da TnT, e que o domínio amino-terminal de $TnT_{157-263}$ (resíduos 157-216) contém a função inibitória da TnT.

ix) O efeito de razões crescentes dos complexos troponina sobre actina e tropomiosina na atividade ATPásica da acto-miosina- Funções regulatórias parciais foram observadas para os complexos mutantes (Fig.11a). Para investigar se estes efeitos poderiam ser explicados por uma menor afinidade dos complexos mutantes pelo filamento fino, ensaios de ATPase com concentrações crescentes de complexo troponina sobre uma concentração fixa de actina e tropomiosina foram realizados. Maiores concentrações de complexo troponina permitiriam a saturação dos filamentos finos pelos complexos que porventura apresentassem afinidades reduzidas. Apenas as ATPases nos pCas 9 e 4 foram analisadas. A comparação de cada complexo ternário contendo um mutante de TnT com o complexo contendo a TnT selvagem está apresentada na Fig 12.

O complexo contendo a TnT selvagem ativou a atividade ATPásica em uma razão 7:1 (actina:troponina) na presença de Ca^{2+}, mas razões maiores de troponina tenderam a inibir a atividade ATPásica (para aproximadamente 90% na razão 7:7 actina:troponina, Fig.12a). A inibição da

atividade ATPásica (pCa9) na razão 7:1 foi quase completa e não foi significativamente melhorada em razões maiores de troponina (Fig.12a). O complexo binário TnC/TnI mostrou-se novamente incapaz de inibir ou ativar a atividade ATPásica em razões fisiológicas (7:1), confirmando que a TnT deve estar presente para ativar e inibir a atividade ATPásica (Fig.12a). Em altas concentrações, o efeito inibitório do complexo TnC/TnI foi um pouco melhorado (de 90% na razão 7:1 para 55% na razão 7:7), mas a ativação não foi observada em nenhum ponto (Fig.12a).

Estes resultados obtidos com os complexos contendo os mutantes de TnT estão de acordo com os resultados apresentados na Fig.11a. O complexo contendo $TnT_{194-263}$ comportou-se de maneira semelhante ao complexo TnC/TnI (Fig.12b) como observado anteriormente (Fig.11a), isto é, em maiores concentrações de complexo troponina o efeito inibitório foi um pouco melhorado. Os complexos contendo TnT_{1-216} e $TnT_{157-263}$ foram incapazes de ativar a atividade ATPásica mesmo quando razões crescentes de troponina sobre actina foram utilizadas (Fig.12c,d). No entanto, as capacidades inibitórias destes complexos, que eram apenas parciais na razão 7:1 de actina para troponina, foram melhoradas em razões maiores (Fig.12c,d). Estes resultados indicam que o efeito inibitório total destes mutantes, que contém o domínio inibitório da TnT (aminoácidos 157-216), estava mascarado pela redução de suas afinidades pelo filamento fino.

O complexo contendo TnT_{1-191}, que apresenta o domínio inibitório rompido (Fig.6a), foi capaz de ativar a atividade ATPásica numa razão de 7:1 assim como o complexo contendo a TnT selvagem (Fig.12e) como observado antes (Fig.11a). A capacidade inibitória do complexo contendo TnT_{1-191} também foi melhorada em concentrações maiores de troponina, apesar de que foram necessárias concentrações mais altas que para os complexos contendo TnT_{1-216} e $TnT_{157-263}$ (Fig.12c, d, e).

Baseado nestes resultados de atividade ATPásica propriedades funcionais podem ser atribuídas aos domínios estruturais da TnT que foram derivados dos estudos de co-sedimentação: a região T_1 contém a função ativatória da TnT, a metade amino-terminal de $TnT_{157-263}$ (resíduos 157-216) contém o domínio inibitório da TnT e a metade carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$ (resíduos 216-263) ancora o dímero TnC/TnI.

x) A TnT e a ativação da atividade ATPásica da acto-miosina - Nossos resultados indicam que

dois domínios da TnT são responsáveis pela ativação da atividade ATPásica. Tanto a liberação do efeito inibitório causado pela ligação da região dos aminoácidos 156-216 da TnT ao filamento fino quanto a ação independente de Ca^{2+} da região T1 da TnT são necessárias para a ativação. A liberação do efeito inibitório é sensível ao Ca^{2+} e requer a ancoragem do complexo binário TnC/TnI através da interação entre a região amino-terminal da TnI e a região carbóxi-terminal (aminoácidos 216-263) da TnT.

Uma predição deste modelo é que a TnT selvagem, TnT_{1-216} e as TnTs que não apresentam a região T_1 não devem ser capazes de ativar a atividade ATPásica, enquanto que a TnT_{1-191} deve ser capaz de ativar a atividade ATPásica na ausência de TnC e TnI. A Fig.13a mostra o efeito dos diferentes mutantes de TnT isolados (sem TnC e TnI) na atividade ATPásica da acto-miosina. Como predito, a TnT_{1-191} é capaz de ativar a atividade ATPásica para aproximadamente 120%, enquanto que a TnT selvagem e os mutantes que não tem a região T_1 ($TnT_{157-263}$ e $TnT_{194-263}$) não são. A TnT_{1-216} é capaz de ativar a atividade ATPásica, mas não tão bem quanto a TnT_{1-191}. Deve ser notado que a TnT_{1-216} é incapaz de ativar a atividade ATPásica quando incorporada ao complexo ternário (Fig.11a e Fig.12c).

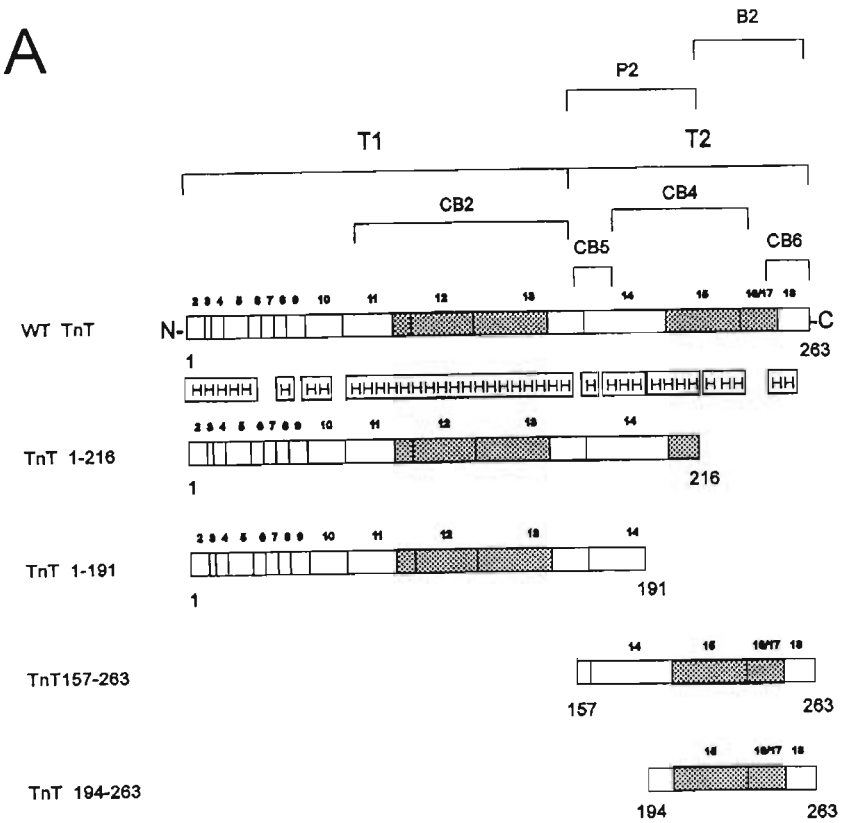
Para verificar se o bloqueio do efeito inibitório do domínio inibitório da TnT depende da ancoragem do dímero TnC/TnI, nós utilizamos o mutante $TnI_{103-182}$, que não se liga à TnT mas liga-se à TnC (Fig.9d), e inibe a atividade ATPásica (Farah et al., 1994). As propriedades regulatórias dos complexos ternários contendo a TnT selvagem e TnI selvagem ou $TnI_{103-182}$ estão apresentadas na Fig.13b. O complexo contendo $TnI_{103-182}$ inibiu a atividade ATPásica como o complexo contendo a TnT selvagem, como esperado (Farah et al., 1994), mas foi incapaz de ativar a atividade ATPásica. Na presença de Ca^{2+} o complexo contendo TnI_{1-98} ativa a atividade ATPásica da mesma maneira que o complexo contendo a TnI selvagem (Fig.13b, Farah et al., 1994). Estes resultados mostram que a ancoragem do dímero TnC/TnI através da interação da metade amino-terminal da TnI com o domínio carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$ é realmente necessária para a ativação da atividade ATPásica.

Nós então analisamos se esta ancoragem através da metade amino-terminal da TnI é suficiente para a ativação da atividade ATPásica, ou se a presença da TnC é também requerida. Filamentos finos foram primeiro reconstituídos com os diferentes mutantes de TnT (numa razão molar de 7:1.5 actina:TnT). A atividade ATPásica dos diferentes mutantes de TnT foi titulada com concentrações

crescentes de TnI_{1-98} na ausência de TnC (Fig.13c). A TnI_{1-98} não alterou o efeito da TnT selvagem nem dos mutantes TnT_{1-216}, TnT_{1-191} e $TnT_{157-263}$ na atividade ATPásica (Fig.13c), indicando que a TnI_{1-98} requer a TnC para produzir a ativação, como observado na Fig.13c. Experimentos controle com a TnI selvagem e a $TnI_{103-182}$ inibiram similarmente a atividade de todos os mutantes de TnT na ausência de TnC (resultados não mostrados). Estes resultados estão de acordo com o fato de que a TnC é necessária, juntamente com a TnI_{1-98} para remover o efeito inibitório da TnT (Fig.10 b,c) e produzir ativação.

Fig.6. A, representação esquemática da estrutura secundária da TnT e dos mutantes de deleção. Os exons estão numerados. Os quadrados cheios correspondem à duas regiões conservadas entre diferentes TnTs, de *Drosophila* ao homem. A localização dos fragmentos proteolíticos T_1, T_2, CB2, CB4, CB5, CB6 , P2 e B2 está indicada. As alfa-hélices preditas estão representadas abaixo da TnT (HHH). B, complexos troponina reconstituídos. 15% SDS-PAGE mostrando os complexos ternários reconstituídos com TnT selvagem ou mutantes. Linha a, complexo selvagem; linha b, complexo com TnT_{1-216}; linha c, complexo com TnT_{1-191}; linha d, complexo com $TnT_{157-263}$; linha e, complexo com $TnT_{194-263}$; linha f, complexo binário TnC/TnI. Os pesos moleculares são: TnT selvagem, Mr 31.142; TnT_{1-216}, Mr 25.629; TnT_{1-191}, Mr 22.493; $TnT_{157-263}$, Mr 12.532; $TnT_{194-263}$, Mr 8.570; TnI selvagem, Mr 21.106; TnC selvagem, Mr 18.256.

d)Figuras


A
B2
P2
T1
T2
CB2
CB4
CB5
CB6
WT TnT
N-
-C
1
263
TnT 1-216
1
216
TnT 1-191
1
191
TnT157-263
157
263
TnT 194-263
194
263

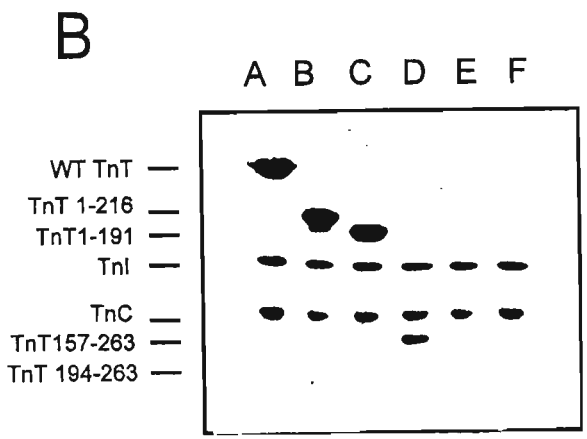
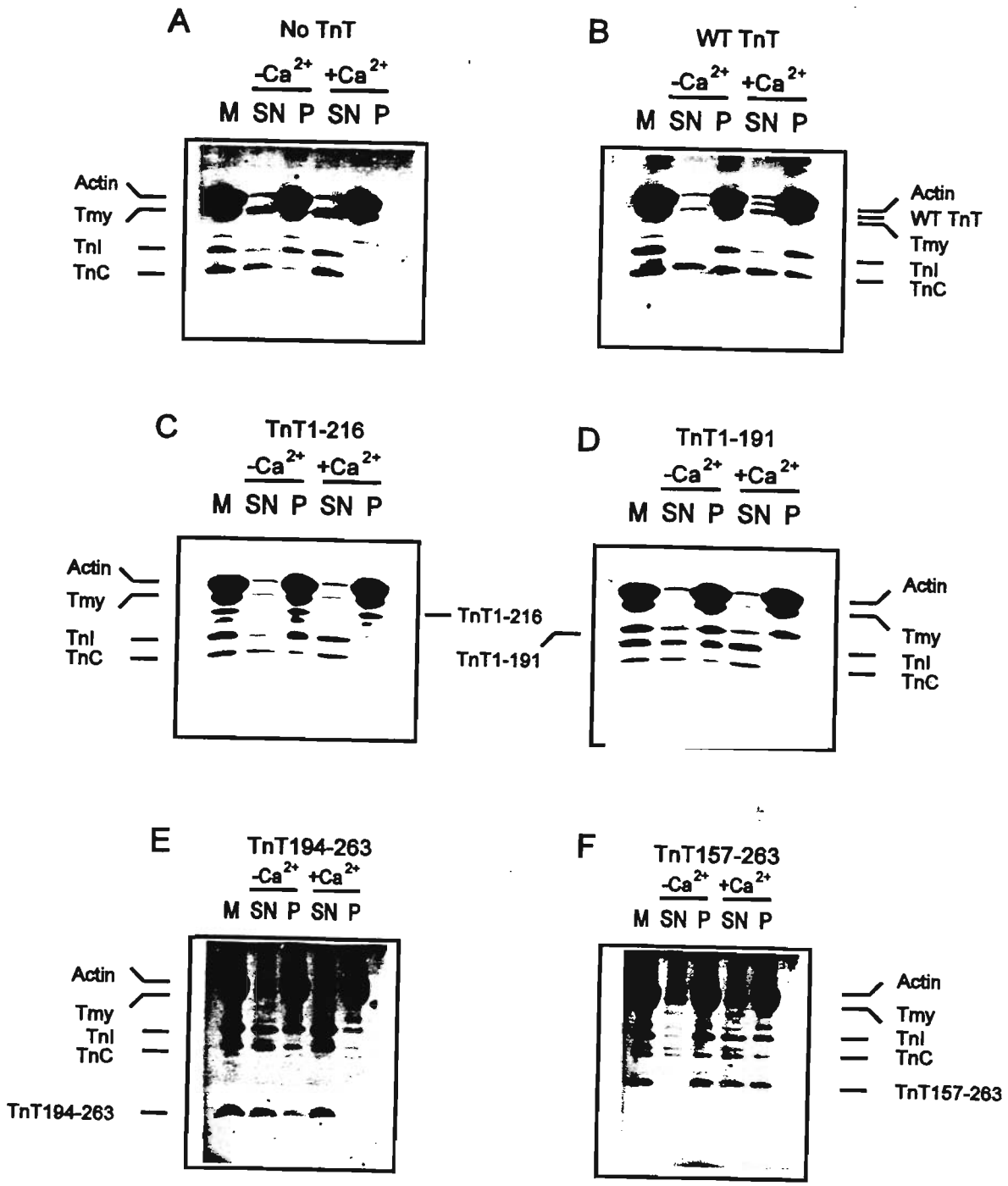

B
A B C D E F
WT TnT
TnT 1-216
TnT1-191
TnI
TnC
TnT157-263
TnT 194-263

Fig.7. Co-sedimentação dos complexos troponina contendo os mutantes de deleção de TnT com a acto-tropomiosina. Actina, tropomiosina e os complexos troponina foram misturados na presença ($+Ca^{2+}$) ou ausência de Ca^{2+} ($-Ca^{2+}$) e ultracentrifugados. Quantidades iguais da mistura (M), dos sobrenadantes (SN) e precipitados (P) foram analisadas em SDS-PAGE 15% (a,b,c,d) ou gel Tricina-SDS 12,5% (e,f). Na ausência de TnT, a TnC e a TnI são encontradas no pellet na ausência de Ca^{2+} mas são removidas para o sobrenadante na presença de Ca^{2+} (a). Na presença de TnT selvagem, a TnC e TnI são retidas no pellet na presença de Ca^{2+} (b). Estes controles demonstram que a TnT ancora o dímero TnC/TnI à acto-tropomiosina na presença de Ca^{2+}. Apesar de que uma razão molar de 1:1:1 das subunidades da troponina foi utilizada para reconstituir os complexos, um excesso de TnC estava presente e foi encontrado nos sobrenadantes. Os mutantes TnT_{1-216} e TnT_{1-191} são incapazes de reter a TnC e a TnI no pellet na presença de Ca^{2+} (c,d). Os mutantes $TnT_{157-263}$ e $TnT_{194-263}$ estão sempre associados com a TnC e TnI (e,f). O complexo contendo $TnT_{157-263}$ é incorporado ao filamento fino na ausência de Ca^{2+} e parcialmente removido na presença de Ca^{2+} (f). O complexo contendo $TnT_{194-263}$ (e) apresenta uma afinidade reduzida pelo filamento fino quando comparado com o complexo contendo $TnT_{157-263}$ (f): na ausência de Ca^{2+} uma fração do complexo está associada ao pellet e na presença de Ca^{2+} o complexo é completamente removido do filamento fino. Um excesso de 3 vezes da troponina contendo $TnT_{194-263}$ foi utilizado para permitir a visualização da banda fraca formada pelo mutante $TnT_{194-263}$, consequentemente um excesso do complexo é observado nos sobrenadantes (f).


A
No TnT
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
Tmy
TnI
TnC
B
WT TnT
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
WT TnT
Tmy
TnI
TnC
C
TnT1-216
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
Tmy
TnI
TnC
TnT1-216
TnT1-191
D
TnT1-191
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
Tmy
TnI
TnC
E
TnT194-263
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
Tmy
TnI
TnC
TnT194-263
F
TnT157-263
-Ca2+ +Ca2+
M SN P SN P
Actin
Tmy
TnI
TnC
TnT157-263

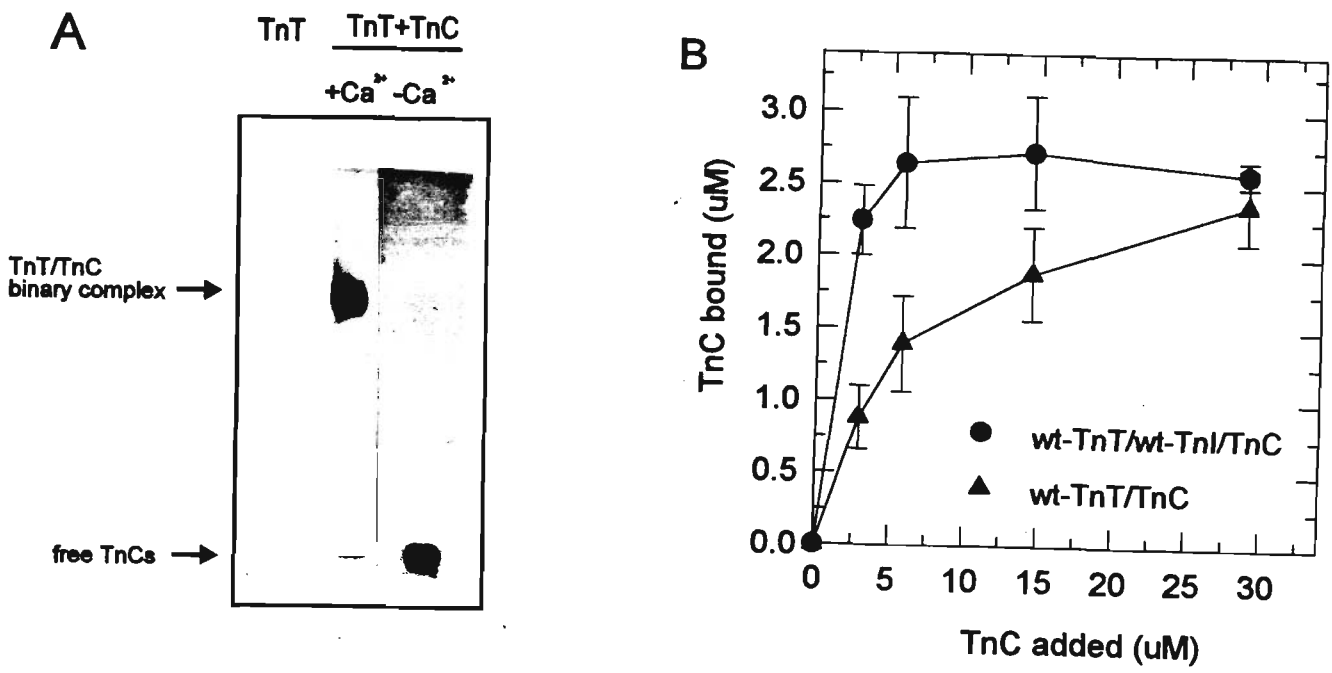


Fig.8. Interação entre a TnC e a TnT. A, formação do complexo binário TnT/TnC foi analisada em gel não denaturante. TnT selvagem foi combinada com TnC (15 μm cada) na ausência ou presença de Ca^{2+} como descrito nos materiais e métodos. 25 μl de cada mistura (TnC+TnT) foram resolvidos em um gel de Tris/glicina 8%. Uma amostra contendo TnT selvagem sem TnC também foi analisada (TnT). A TnT selvagem não entra no gel na ausência da TnC. As TnCs livres são encontradas na parte de baixo do gel. Na presença de TnC, o complexo binário é formado apenas na presença de Ca^{2+}. B, Incorporação da TnC ao filamento fino na ausência de TnI e presença de Ca^{2+}. O ensaio foi realizado como na Fig.7. Filamentos finos foram reconstituídos com o complexo binário TnT selvagem/TnC ou com o complexo ternário TnT selvagem/TnI/TnC (na razão molar 7:1 actina:troponina). Estes complexos foram analisados quanto à sua capacidade de reter a TnC no filamento fino. A quantidade de TnC retida no precipitado em função de concentrações crescentes de TnC adicionadas (indicadas na abcissa) foi quantificada através de densitometria. Os resultados mostram que para reter a mesma quantidade de TnC no precipitado que o complexo ternário (●), um excesso de 10 vezes TnC deve ser adicionado ao complexo binário (▲).

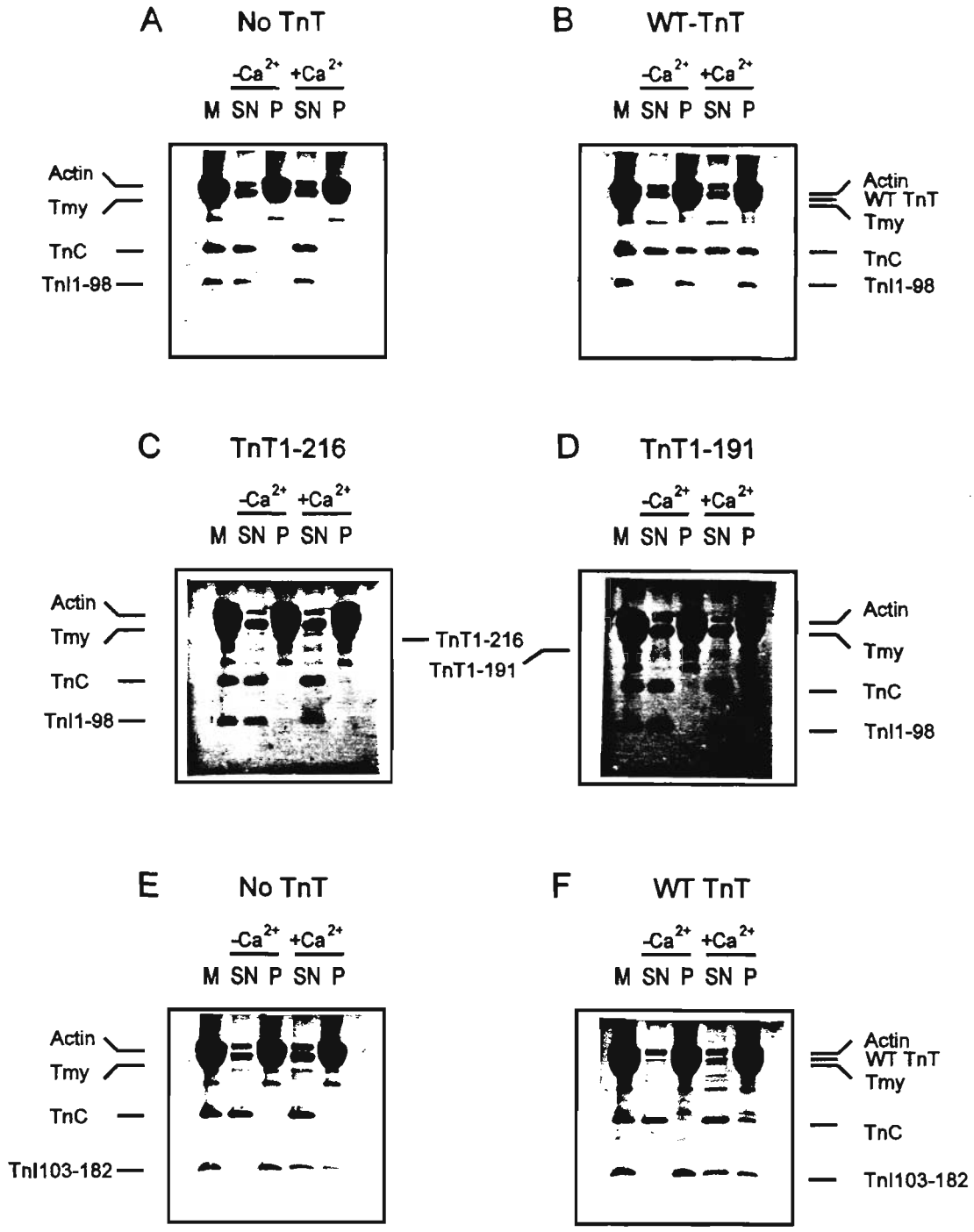


Fig.9. Co-sedimentação dos complexos contendo os mutantes de TnI com a acto-tropomiosina. Actina, tropomiosina e os complexos troponina foram misturados na presença ($+Ca^{2+}$) ou ausência de Ca^{2+} ($-Ca^{2+}$) e ultracentrifugados. Quantidades iguais da mistura (M), dos sobrenadantes (SN) e precipitados (P) foram analisadas em gel de Tricina-SDS 12,5%. O complexo binário TnI_{1-98}/TnC permaneceu sempre no sobrenadante (a). Na presença de TnT selvagem, TnI_{1-98} /TnC são retidos no precipitado, tanto na ausência como na presença de Ca^{2+} (b). Os mutantes TnT_{1-216} e TnT_{1-191} são incapazes de reter o dímero TnI_{1-98}/TnC no filamento fino (c,d). $TnI_{103-182}$ permaneceu associado ao precipitado na ausência de Ca^{2+} e foi parcialmente removido na presença de Ca^{2+}, independentemente da presença de TnT (e,f).

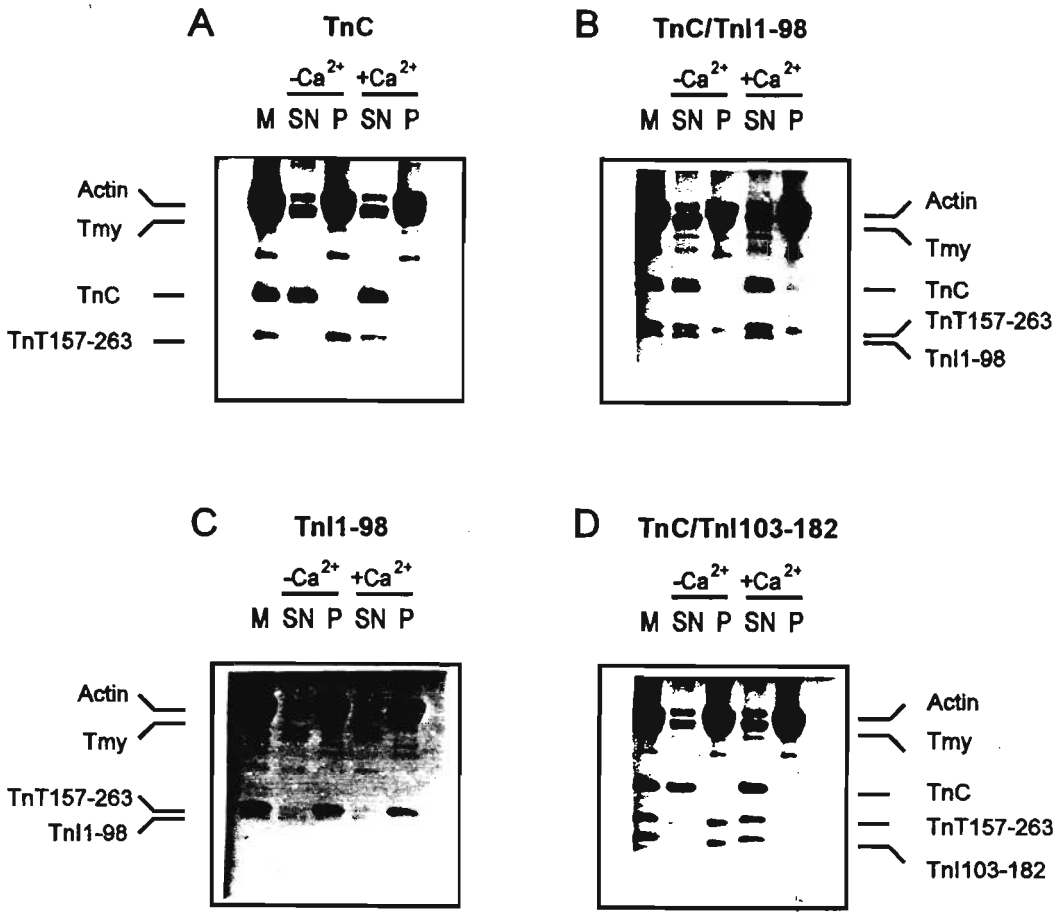


Fig.10. O efeito dos mutantes de TnI e da TnC na co-sedimentação de $TnT_{157-263}$ com a acto-tropomiosina. A incorporação dos complexos $TnT_{157-263}$/TnC, $TnT_{157-263}/TnI_{1-98}$/TnC e $TnT_{157-263}/TnI_{103-182}$/TnC ao filamento fino foi analisada como nas figuras anteriores. A $TnT_{157-263}$ permanece no precipitado na ausência de Ca^{2+} e é removida para o sobrenadante na presença de Ca^{2+} (a). Na presença da TnI_{1-98} e da TnC, a $TnT_{157-263}$ não é incorporada ao filamento fino, mesmo na ausência de Ca^{2+} (b). Na presença de apenas TnI_{1-98} a $TnT_{157-263}$ é incorporada ao filamento fino tanto na ausência como na presença de Ca^{2+} (c). Neste experimento uma fração da TnI_{1-98} é retida no pellet. O comportamento de $TnI_{103-182}$ e $TnT_{157-263}$ é o mesmo quando estes são analisados separadamente: ligam-se ao filamento fino na ausência de Ca^{2+} e são removidos na presença de Ca^{2+} (d).

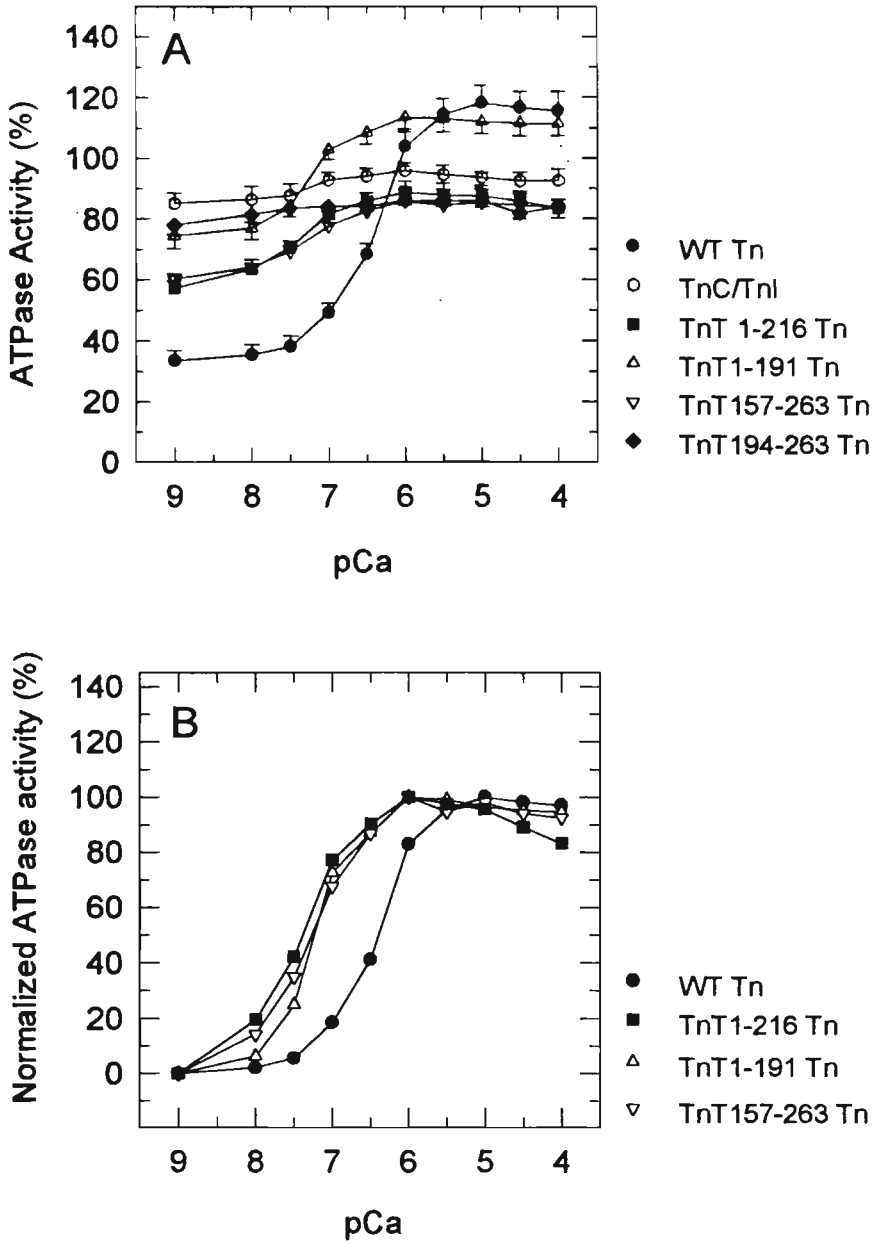


Fig.11. A- Regulação dependente de Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina pelos complexos troponina contendo os mutantes de TnT. O efeito dos complexos troponina contendo os diferentes mutantes de TnT sobre a atividade ATPásica da acto-miosina foi medida em função do pCa (indicado na abcissa). A média ± SE de pelo menos 5 determinações independentes em cada pCa está apresentada. Condições: actina (4μM), tropomiosina (0.57μM), troponina (0.57μM) e miosina (0.2μM). Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade ATPásica da acto/tropomiosina/miosina na ausência de troponina. Experimentos controle foram realizados com o complexo troponina contendo a TnT selvagem e com o complexo binário TnC/TnI. O complexo contendo a TnT selvagem (●) inibiu a atividade ATPásica para 30% no pCa 9 e a ativou para 120% no pCa 4, enquanto que o complexo binário (○) não exibiu sensibilidade ao Ca^{2+}. Ver o texto para descrição dos resultados obtidos com as TnTs mutantes. B- Normalização dos dados dos complexos contendo a TnT_{1-216}, TnT_{1-191} e $TnT_{157-263}$ da Fig.11a (100%= atividade ATPásica máxima para cada complexo, 0% = atividade ATPásica mínima para cada complexo).

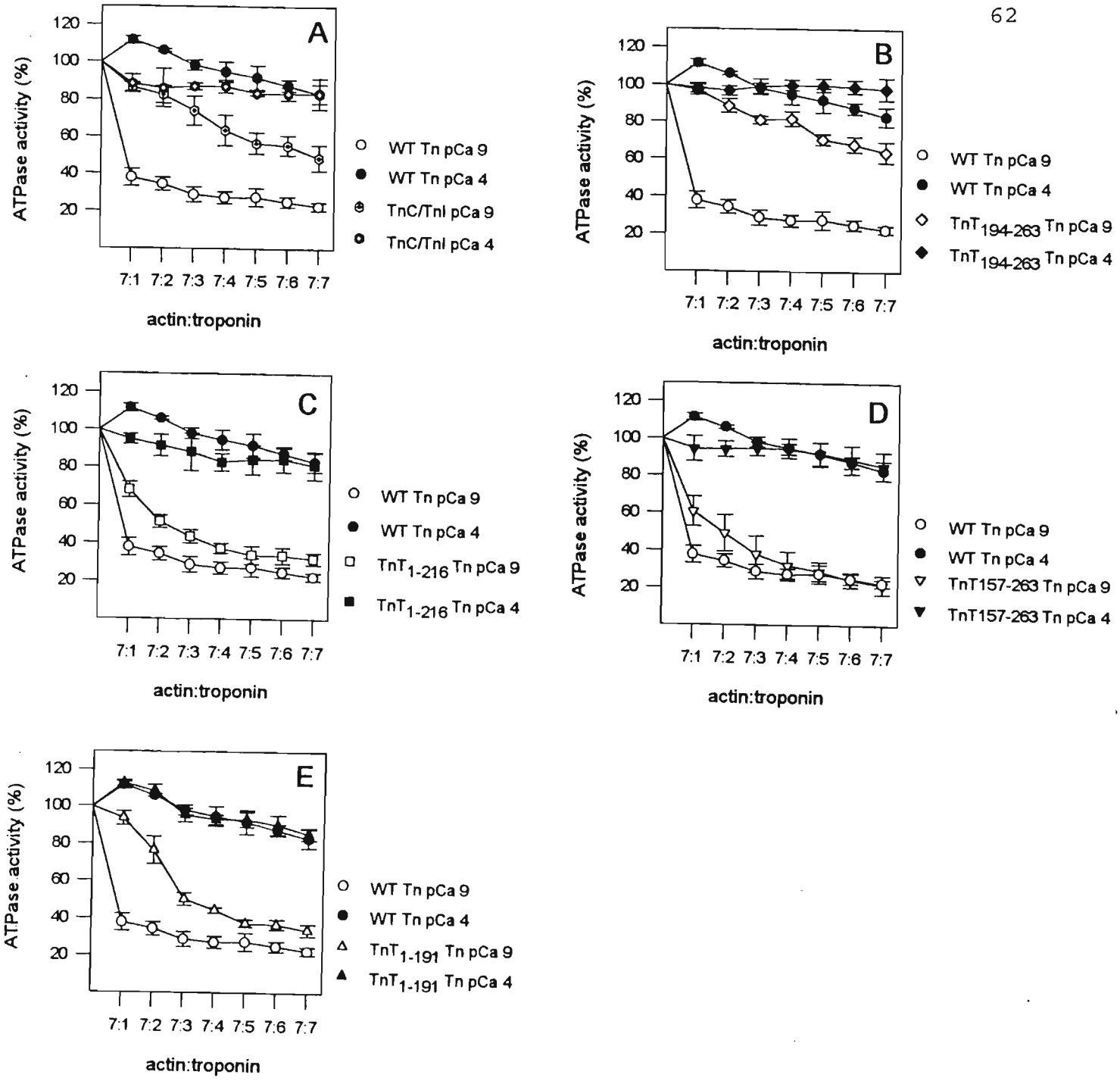


Fig. 12. Titulação da atividade ATPásica da acto-miosina com concentrações crescentes de complexo troponina. Apenas os pCas 9 e 4 foram analisados. As concentrações de proteínas utilizadas foram iguais às da Fig. 11, exceto a da troponina, que variou como indicado na abcissa. Os resultados estão expressos como porcentagem da atividade ATPásica da acto/tropomiosina/miosina na ausência de troponina. Cada complexo contendo um mutante de TnT é comparado ao complexo contendo a TnT selvagem e ao complexo binário TnI/TnC.

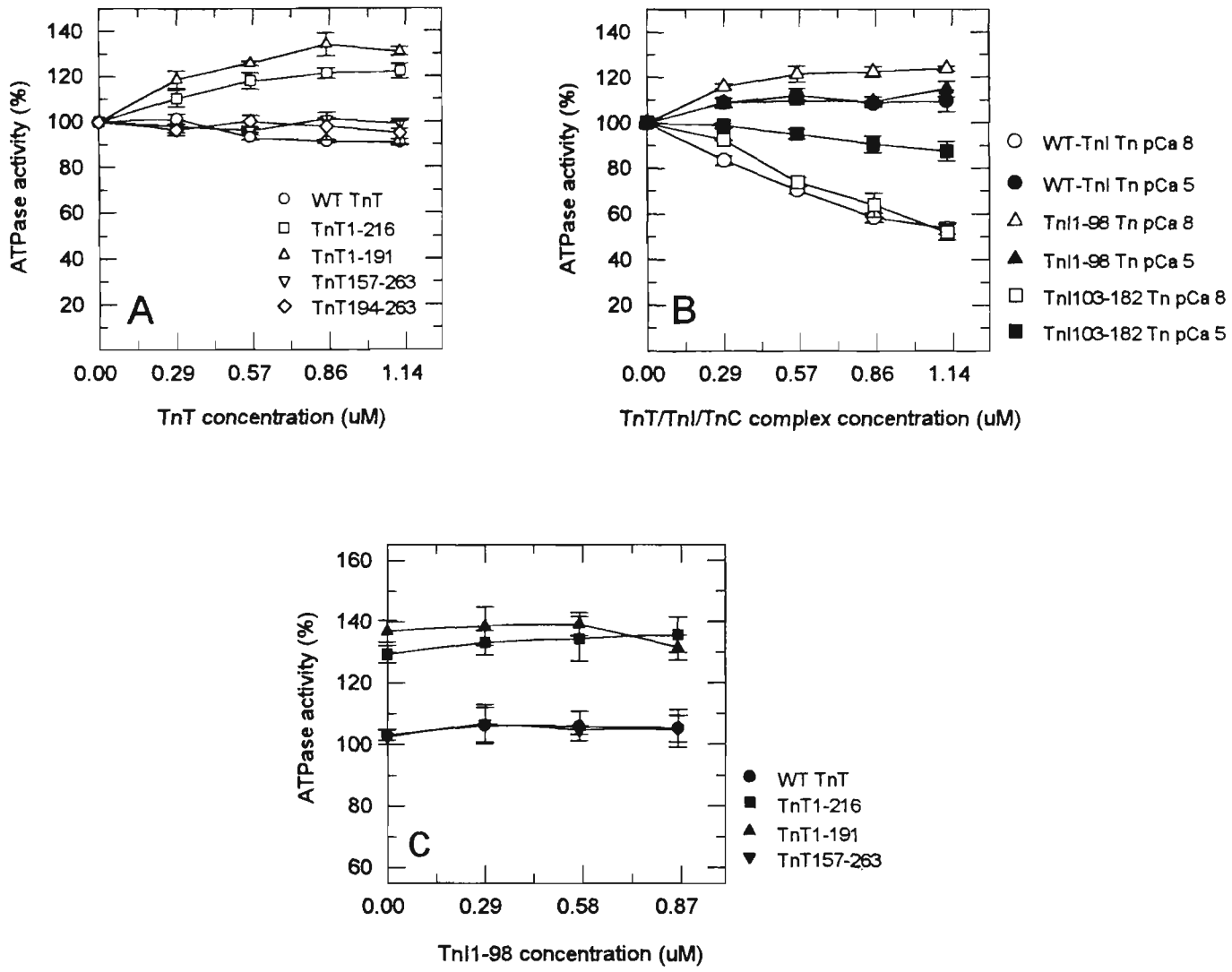


Fig.13. A- O efeito das diferentes TnTs na atividade ATPásica da acto-miosina. A atividade ATPásica da acto-miosina-tropomiosina foi titulada com concentrações crescentes de TnT isolada (indicadas na abcissa). A TnT selvagem, a $TnT_{157-263}$ e a $TnT_{194-263}$ não inibiram nem ativaram a atividade ATPásica da acto-miosina enquanto que os mutantes TnT_{1-191} e TnT_{1-216} a ativaram. B- O efeito dos complexos ternários contendo TnI selvagem, TnI_{1-98} ou $TnI_{103-182}$ na atividade ATPásica da acto-miosina. Apenas os pCas 5 e 8 foram analisados. As concentrações dos complexos utilizadas estão indicadas na abcissa. C- O efeito de TnI_{1-98} sobre as propriedades das TnTs apresentadas em A. A atividade ATPásica de filamentos reconstituídos com as diferentes TnTs (7:1.5 actin:TnT) foi titulada com concentrações crescentes de TnI_{1-98} (indicadas na abcissa).

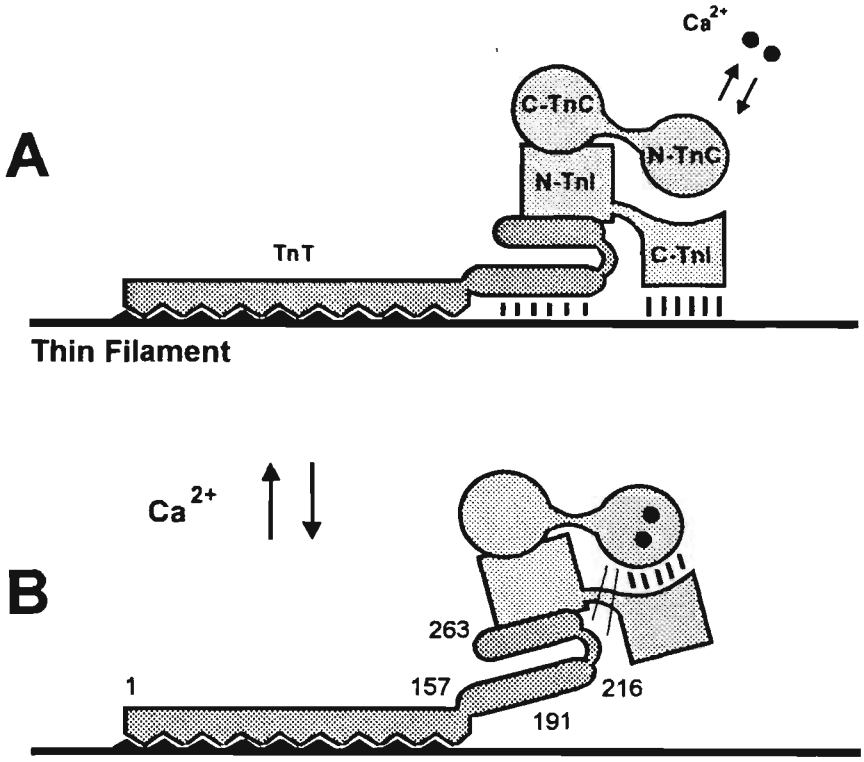


Fig.14- Modelo para as mudanças conformacionais induzidas pelo Ca^{2+} no complexo troponina. A TnT foi dividida em três domínios: o domínio ativatório (aminoácidos 1-157), o domínio inibitório (aminoácidos 157-216) e o domínio de ancoragem da TnC/TnI (aminoácidos 216-263). As interações da região amino-terminal da TnI (N-TnI, aminoácidos 1-98) com ambos, a região carbóxi-terminal da TnC e o domínio carbóxi-terminal da TnT (aminoácidos 216-263), assim como da região T_1 com o filamento fino existem tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} (a,b). As interações sensíveis ao Ca^{2+} estão representadas por linhas pretas: na ausência de Ca^{2+} (a), as regiões carbóxi-terminal da TnI (C-TnI, aminoácidos 103-182) e a região inibitória da TnT (aminoácidos 157-216) estão fortemente ligadas ao filamento fino, inibindo a atividade ATPásica da acto-miosina; na presença de Ca^{2+} (b) estas duas últimas interações são substituídas por uma forte interação entre o domínio amino-terminal da TnC (N-TnC) e a C-TnI e uma fraca interação (representada por linhas finas) entre a N-TnC e a TnT. Estas modificações induzidas pelo Ca^{2+} resultam na remoção da região inibitória da TnT do filamento fino gerando a ativação da atividade ATPásica. Os sítios precisos da TnT que interagem com a TnC ainda não estão claros.

e) Discussão

Neste projeto as interações entre a TnT e os outros componentes do filamento fino na presença ou ausência de Ca^{2+} foram analisadas através de ensaios de co-sedimentação com a acto-tropomiosina. As funções destas interações foram investigadas através do ensaio de atividade ATPásica da acto-miosina. Complexos troponina contendo fragmentos de TnT e/ou fragmentos de TnI foram analisados e a partir destes resultados, um modelo para o papel da TnT na regulação dependente de Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina pelo complexo troponina foi proposto (Fig.14). Este modelo incorpora o modelo anti-paralelo da TnC e TnI, descrito anteriormente (Farah et al., 1994). As interações no modelo aqui proposto podem ser subdivididas em dois grupos: interações insensíveis ao Ca^{2+} e interações sensíveis ao Ca^{2+} . Estas interações serão discutidas a seguir.

i)Interações insensíveis ao Ca^{2+}:

-Interação do domínio T_1 da TnT com a acto/tropomiosina.

O domínio T_1 da TnT está ligada ao filamento fino, na ausência ou presença de Ca^{2+}, ancorando desta maneira constitutivamente o complexo troponina ao filamento fino (Fig.14). Pearlstone e Smillie (1983) haviam demonstrado que o fragmento proteolítico T_1 liga-se à uma coluna de afinidade com tropomiosina acoplada de maneira insensível ao Ca^{2+}. Aqui nós demonstramos que esta região da TnT é também capaz de se ligar ao filamento fino de maneira insensível ao Ca^{2+}.

A ativação da atividade ATPásica pelo complexo troponina observada nos ensaios de ATPase (Fig. 11a) ocorre apenas na presença da TnT (Malnic e Reinach, 1994; Farah et al., 1994; Potter et al., 1995). Pela primeira vez demonstramos que esta função ativatória do complexo troponina reside no domínio T_1 da TnT. Portanto, o domínio T_1 não apenas ancora o complexo troponina ao filamento fino, mas também está envolvido na transmissão do sinal do Ca^{2+} para a tropomiosina.

-Interação do domínio carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$ com a região amino-terminal da TnI.

A região dos aminoácidos 216-263 da TnT corresponde ao principal sítio de ancoragem do dímero TnC/TnI. Esta ancoragem é mediada via a interação da região amino-terminal da TnI com o domínio carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$ (aminoácidos 216-263) (Fig.14).

O sítio de ligação da TnI na TnT já havia sido localizado anteriormente na região amino-terminal da TnI (Chong e Hodges, 1982a; Hitchcock, 1982; Farah et al., 1994; Potter et al., 1995), nossos dados portanto confirmam estes resultados. Trabalhos anteriores indicaram que os fragmentos P2, CB5, e a região amino-terminal de CB4 da TnT (Fig.6a) estariam envolvidos na interação com a TnI (Pearlstone e Smillie, 1980;1985; Hitchcock et al., 1981; Chong e Hodges, 1982a). No entanto, o mutante TnT_{1-216}, que apresenta estas regiões intactas não se mostrou capaz de interagir com a região amino-terminal da TnI quando analisado nos ensaios de co-sedimentação. Estas regiões da TnT foram detectadas como candidatas à sítios de interação com a TnI através de ensaios com complexos binários (TnT/TnI) ou ternários (TnT/TnI/TnC). No entanto, é importante lembrarmos que as interações entre as subunidades da troponina podem ser alteradas quando o complexo é incorporado ao filamento fino. Nossos resultados mostraram que a região dos aminoácidos 157-216 (o domínio inibitório da TnT), que corresponde aos fragmentos da TnT acima mencionados (CB5, região amino-terminal de CB4 e P2, Fig.6a) liga-se ao filamento fino. Consequentemente, na presença de acto-tropomiosina esta região da TnT provavelmente não estaria tão disponível para interagir com a TnI como na ausência de acto-tropomiosina. No mutante TnT_{1-216} uma fração grande da segunda região conservada da TnT (Fig.6a), que coincide com a região que contém "heptad repeats" (Pearlstone e Smillie, 1981), está deletada. Esta região foi sugerida como estando envolvida em uma interação do tipo "coiled-coil" com um "heptad repeat" existente na região amino-terminal da TnI (Pearlstone e Smillie, 1985). O fato de que a TnT_{1-216} não mostrou interação com a TnI contribui para a idéia de que esta região tipo "coiled-coil" da TnT esteja envolvida na interação com a TnI.

Nós demonstramos aqui também que a ancoragem do dímero TnC/TnI ao filamento fino via a interação da região amino-terminal da TnI com o domínio carbóxi-terminal de $TnT_{157-263}$ é necessária para que haja a ativação da atividade ATPásica da acto-miosina.

-Interação da região amino-terminal da TnI com o domínio carbóxi-terminal da TnC.

Nós demonstramos anteriormente que a região dos aminoácidos 1-98 da TnI interage com o domínio carbóxi-terminal da TnC tanto na ausência como na presença de Ca^{2+} (Farah et al.,1994). A região amino-terminal da TnI representa portanto o sítio de ancoragem constitutiva da TnC ao filamento fino.

ii)Interações sensíveis ao Ca^{2+}:

-Interação da região carbóxi-terminal da TnI (aminoácidos 103-182) com a acto/tropomiosina.

Demonstramos anteriormente que a região inibitória da TnI (contendo o peptídeo inibitório mais a sua região carbóxi-terminal) liga-se ao filamento fino na ausência de Ca^{2+}, causando a inibição da atividade ATPásica da acto-miosina (Farah et al., 1994). Esta interação é enfraquecida na presença de Ca^{2+}, o que remove o efeito inibitório da TnI.

Complexos ternários reconstituídos com $TnI_{103-182}$, que não interage diretamente com a TnT, inibem a atividade ATPásica numa razão 7:1 de actina:troponina com a mesma intensidade que complexos reconstituídos com TnI selvagem (Fig.13b e Farah et al., 1994). Isto implica que a interação direta da TnT com a TnI não é necessária para o efeito da TnT sobre a habilidade inibitória da TnI nestas razões molares de proteína. A TnT e a TnI devem portanto comunicar-se de alguma maneira, talvez através de alterações conformacionais na acto-tropomiosina, para produzir a inibição total, que não é observada na ausência da TnT (Fig.11a).

-Interação da região carbóxi-terminal da TnI (aminoácidos 103-182) com o domínio amino-terminal da TnC.

Também foi demonstrado por Farah et al., 1994 que na presença de Ca^{2+} o domínio amino-terminal da TnC interage com a região inibitória da TnI, removendo-a do filamento fino na presença

de Ca^{2+}. Esta interação é portanto responsável pela remoção do efeito inibitório da TnI na presença de Ca^{2+}.

-Interação do domínio inibitório da TnT (aminoácidos 157-216) com a acto/tropomiosina.

Neste trabalho o sítio de ligação ao filamento fino presente dentro do fragmento $TnT_{157-263}$ foi localizado na metade amino-terminal deste fragmento (entre os aminoácidos 157 e 216). Chong e Hodges (1982b) detectaram uma ligação cruzada do fragmento proteolítico T_2' com a cisteína 190 da tropomiosina. Apesar de o fragmento T_2' ser apenas 30 aminoácidos mais curto na sua extremidade carbóxi-terminal que T_2, este resultado é compatível com a observação de que o sítio de ligação à acto-tropomiosina do fragmento $TnT_{157-263}$ está localizado na região amino-terminal de T_2.

Os ensaios de atividade ATPásica indicaram que esta região da TnT apresenta uma função inibitória. Este domínio inibitório da TnT liga-se ao filamento fino de maneira sensível ao Ca^{2+}: na ausência de Ca^{2+} a sua interação com o filamento fino é fortalecida e na presença de Ca^{2+} e TnC esta interação é enfraquecida. Concordantemente, a interação desta região da TnT com o filamento fino é fortalecida quando a região inibitória da TnI (aminoácidos 103-182) está ligada ao filamento fino (na ausência de Ca^{2+}) e é enfraquecida quando esta região da TnI é removida do filamento fino (na presença de Ca^{2+}). Pearlstone e Smillie (1983) observaram que a TnI potencia a ligação da TnT ou de T_2 à tropomiosina, e que a ligação da TnI também aumenta a afinidade da interação T_1/tropomiosina. O fato de que a TnI, sem interagir diretamente com T_1, é capaz de afetar a interação entre T_1 e a tropomiosina indica que mudanças conformacionais causadas pela ligação da TnI ao filamento fino podem ser propagadas pelo filamento.

-Interação da TnC com a $TnT_{157-263}$.

Apesar de a interação entre a TnC e a TnT ser fraca, a TnC é capaz de remover o fragmento $TnT_{157-263}$ do filamento fino na presença de Ca^{2+}. Uma ampla região de T_2 foi implicada na interação

com a TnT nos complexos binários (Pearlstone e Smillie, 1978). A observação de que os complexos ternários contendo os mutantes que apresentam deleções na extremidade carbóxi-terminal da TnT são apenas estáveis na presença de Ca^{2+} indica que realmente uma grande região de $TnT_{157-263}$ pode interagir com a TnC. No entanto, os sítios precisos da TnT que interagem com a TnC não puderam ser determinados.

Estudos anteriores demonstraram que o sítio para a interação com a TnT reside no domínio amino-terminal da TnC (Grabarek et al., 1981). Este resultado é compatível com nossa observação de que a interação entre a TnC e a TnT ocorre apenas na presença de Ca^{2+}. Não se pode excluir porém a possibilidade de que interações entre o domínio carbóxi-terminal da TnC com a região $TnT_{157-263}$ também existam.

O efeito da ligação do Ca^{2+} à TnC poderia ser transmitido à TnT ou à TnI. Recentemente, Potter et al (1995) demonstraram através da utilização de um mutante de TnI (TnId57, deleção dos resíduos 1-57) que não interage diretamente com a TnT em complexos binários TnT/TnI, que a ativação da atividade ATPásica da acto-miosina resulta de uma interação específica e dependente de Ca^{2+} entre a TnT e a TnC. No entanto nós demonstramos aqui que não apenas a TnC, mas a região amino-terminal da TnI também é necessária para que haja a ativação da atividade ATPásica. O mutante $TnI_{103-182}$ utilizado em nossos estudos apresenta uma deleção maior (deleção de 102 aminoácidos) que o mutante utilizado por Potter et al (1995). Como TnId57, $TnI_{103-182}$ requer a presença de Ca^{2+} para formar um complexo ternário estável, mas diferentemente de TnId57, o complexo ternário contendo $TnI_{103-182}$ é instável quando o Ca^{2+} é quelado por EGTA. É possível que TnId57, apesar de não interagir com a TnT quando analisada em complexos binários (Potter et al., 1995), seja capaz de interagir com a TnT no complexo ternário ou quando este é incorporado ao filamento fino, o que explicaria a capacidade ativatória deste complexo. Por outro lado, no complexo contendo $TnI_{103-182}$, as interações entre a TnT e a TnI estariam completamente abolidas, como foi demonstrado através do ensaio de co-sedimentação. É interessante salientar que a região do " heptad repeat" que existe na região amino-terminal da TnI está localizada entre os aminoácidos 57 e 106 (Pearlstone e Smillie, 1985). Portanto esta região de "heptad repeat" ainda está presente na TnId57 mas deletada na $TnI_{103-182}$. Se os "heptad repeats" observados na TnT e na TnI estão realmente envolvidos na interação TnT/TnI como sugerido por Pearlstone e Smillie (1985), esta interação

estaria menos prejudicada no complexo contendo TnId57 que no complexo contendo $TnI_{103-182}$. Enfim, estas observações acima poderiam explicar porque os complexos contendo TnId57 são capazes de ativar a atividade ATPásica enquanto que os complexos contendo $TnI_{103-182}$ não são.

Concluindo, os ensaios de co-sedimentação, apesar de qualitativos, nos permitiram propor um modelo estrutural que apresenta as interações da TnT com os outros componentes do filamento fino, na ausência e na presença de Ca^{2+}. O papel funcional destas interações foi investigado através de ensaios de regulação dependente de Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina. O modelo propõe que as interações insensíveis ao Ca^{2+} não são significativamente alteradas com a mudança na concentração de Ca^{2+} e seriam portanto estruturais. As interações sensíveis ao Ca^{2+} por outro lado sofrem uma alteração: as regiões inibitórias da TnI e da TnT, na ausência de Ca^{2+} interagem fortemente com o filamento fino e fracamente com a TnC. Nesta situação, a atividade ATPásica da acto-miosina está completamente inibida. Na presença de Ca^{2+} a região inibitória da TnI passa a interagir fortemente com o domínio amino-terminal da TnC e fracamente com o filamento fino; o domínio inibitório da TnT, passa a interagir mais fortemente com a TnC do que com o filamento fino (Fig.14). Nesta situação a atividade ATPásica da acto-miosina é ativada. É importante salientar, que a ancoragem via a interação amino-terminal da TnI com a região 216-263 da TnT, apesar de insensível ao Ca^{2+}, é necessária juntamente com a TnC para a ativação da atividade ATPásica. Também é interessante o fato de que o domínio inibitório da TnT (aminoácidos 157-216) é adjacente à região CB2 da TnT (Fig.6a), a região presente dentro de T_1, rica em alfa-hélices e que interage fortemente com a tropomiosina independentemente de Ca^{2+} (Pearlstone e Smillie, 1977). É possível que esta região seja sensível às mudanças conformacionais dependentes de Ca^{2+} no domínio inibitório adjacente e que desta forma transmita o sinal do Ca^{2+} para a tropomiosina.

DISCUSSÃO GERAL

De todos os complexos proteicos multiméricos o filamento fino é um dos mais bem conhecidos. Todos os componentes deste complexo são conhecidos, assim como suas respectivas funções. Isto se deve ao fato de que as proteínas que constituem o filamento fino existem em grande abundância nas células musculares esqueléticas e podem ser obtidas em grandes quantidades através de métodos simples de purificação (Colowick e Kaplan, 1982). Além disto este sistema apresenta a vantagem de poder ser reconstituído "in vitro", simplesmente misturando-se todos os componentes (Greaser e Gergely,1971; Potter, 1982).

A clonagem dos cDNAs das subunidades da troponina (Reinach e Karlsson, 1988; Quaggio et al., 1993; Smillie et al., 1988) e sua expressão em *E.coli* (Quaggio et al., 1993; Farah et al., 1994) tornou possível a produção de fragmentos destas proteínas (Farah et al., 1994; Li et al., 1994; Pan e Potter, 1992) o que tem possibilitado um mapeamento detalhado dos domínios destas proteínas e de como estes domínios interagem para produzir a regulação da contração muscular. Um dos principais problemas relacionados à produção das subunidades da troponina em *E.coli* é a alta insolubilidade das troponinas I e T. Após sua purificação estas proteínas comportam-se como proteínas desenoveladas, que se agregam e precipitam a baixas forças iônicas e podem ser mantidas solúveis apenas em altas forças iônicas (0.5 a 1M KCl) (Quaggio et al., 1993; Farah et al., 1994). Os ensaios realizados com estas subunidades isoladas devem ser portanto sempre realizados em altas forças iônicas, para evitar a sua precipitação. No entanto, na presença da TnC, que é solúvel a baixas forças iônicas, a TnI e TnT são incorporadas em um complexo ternário altamente solúvel, tanto na presença como na ausência de Ca^{2+} (Potter, 1982).

Os resultados do projeto I (Malnic e Reinach, 1994) mostram que a co-expressão das três subunidades da troponina em *E.coli* representa um meio para se contornar este problema da insolubilidade das troponinas I e T. Um complexo ternário altamente solúvel pode ser purificado diretamente de *E.coli*. Embora os três cDNAs tenham sido construídos sob a regulação do mesmo

tipo de promotor (T7), os níveis de expressão de proteína não foram os mesmos para as três subunidades da troponina. Enquanto a TnI teve sua expressão aumentada, os níveis de expressão da TnT foram reduzidos quando comparados com os plasmídeos contendo apenas um gene. Consequentemente, os baixos níveis de TnT limitaram o rendimento final do complexo troponina produzido por este vetor a 5 mg /litro de cultura induzida. Os fatores que levam à esta diferença nos níveis de expressão de cada subunidade não são conhecidos. Diferenças podem ocorrer a nível de controle de tradução dos diferentes RNAs mensageiros, estabilidade dos diferentes RNAs mensageiros, estabilidade da proteína dentro da *E.coli,* competição pela maquinaria de síntese da *E.coli*, etc.

No caso do complexo troponina, tanto a reconstituição "in vitro" como a "in vivo" produzem complexos igualmente funcionais, pelo menos quanto às características analisadas. Existe a possibilidade de que estes complexos apresentem diferenças que não foram detectadas através dos ensaios utilizados, mas que seriam detectadas através de análises mais finas. Os complexos produzidos "in vivo" poderiam ser mais homogêneos quanto à sua estrutura, o que poderia facilitar a sua cristalização e determinação da sua estrutura cristalográfica.

Os resultados obtidos mostram que o desenovelamento do complexo troponina é reversível, e um complexo troponina funcional pode ser obtido "in vitro". No entanto, há exemplos de outras proteínas multiméricas, cujo desenovelamento é irreversível. Nestes casos, a co-expressão das subunidade em *E.coli* pode representar um meio de se produzir estas proteínas funcionais.

A partir dos resultados do projeto I ficou claro que a incorporação da TnT no complexo troponina é necessária para que a regulação da atividade ATPásica da acto-miosina seja sensível ao Ca^{2+}. Para compreender como a TnT é capaz de propagar a atividade regulatória de um complexo troponina para 7 actinas, no projeto II deste trabalho, mutantes de deleção de TnT foram construídos com o objetivo de mapear as regiões envolvidas nesta função. Os mutantes foram analisados quanto à sua capacidade de regular a atividade ATPásica da acto-miosina e quanto à capacidade de serem incorporados ao filamento fino. Mutantes de TnI foram utilizados também nos mesmos ensaios, e juntamente com os mutantes de TnT permitiram a elaboração de um modelo detalhado de como os componentes da troponina interagem entre si, com o filamento fino e como estas interações são modificadas em função das concentrações de Ca^{2+}.

Os resultados do projeto I indicaram que a TnI e a TnT provavelmente estão corretamente enoveladas apenas quando associadas à TnC ou no complexo ternário. Este fato mostra a importância de se estudar o complexo troponina como um todo, e não as suas subunidades isoladas. Neste segundo projeto, nós procuramos sempre que possível utilizar nos ensaios realizados o sistema do filamento fino completo, ou seja, tanto nos ensaios de co-sedimentação como nos ensaios de atividade ATPásica filamentos finos reconstituídos com actina, tropomiosina e o complexo troponina ternário (exceto em alguns experimentos controle) foram utilizados. Este procedimento mostrou-se muito útil para a determinação das interações que ocorrem no sistema completo e que portanto apresentam uma relevância fisiológica. Por exemplo, a interação de $TnT_{194-263}$ com o filamento fino, apesar de muito fraca, foi detectada na ausência de TnI e TnC (dados não mostrados). No entanto, na presença de TnI e TnC, ficou evidente que esta região da TnT contida neste mutante, interage com a TnI (TnI_{1-98}) e não com o filamento fino. Em conclusão, através da utilização do sistema multimérico completo, foi possível descartar algumas interações que ocorrem "in vitro" com subunidades isoladas, mas que provavelmente não existem "in vivo", ou no filamento fino completo.

Através dos resultados do projeto II nós pudemos demonstrar pela primeira vez que o papel da TnT não é apenas ancorar o complexo troponina ao filamento fino, mas que a TnT participa ativamente da regulação da contração muscular através da transdução dos sinais resultantes da ligação do Ca^{2+} à TnC para a tropomiosina. Ficou claro, que as mudanças conformacionais dependentes de Ca^{2+} que ocorrem na região globular do complexo troponina (que contém a TnC, TnI e a região T_2) são transduzidas para a região $_1T$ da TnT para produzir a ativação da atividade ATPásica. Demonstramos também que a interação direta da região amino-terminal da TnI com a extremidade carbóxi-terminal da TnT (aminoácidos 216-263) é necessária para a produção desta ativação. Portanto a TnI, além de sua bem conhecida função inibitória na ausência de Ca^{2+}, apresenta também um papel na função ativatória do complexo troponina na presença de Ca^{2+}.

A ativação da atividade ATPásica da acto-miosina pelo complexo troponina observada em nossos experimentos não é muito alta (aproximadamente 20% acima da atividade ATPásica na ausência de troponina), mas é altamente significativa e ocorre apenas na presença da TnT. Recentemente, Fraser e Marston (1995) estudaram o controle do complexo troponina sobre a mobilidade do filamento fino sobre miosina imobilizada através do ensaio de mobilidade "in vitro"

(Kron e Spudich, 1986). Eles mostraram que na ausência de Ca^{2+}, o complexo troponina causa uma diminuição no número dos filamentos móveis, sem porém dissociar os filamentos finos da superficie de miosina. Portanto mais uma vez há evidências de que o complexo troponina não bloqueia completamente a interação entre a miosina e actina na ausência de Ca^{2+} como prediria o modelo do impedimento estérico, o que é compatível com os dados bioquímicos obtidos por Chalovich e Eisenberg (1982), Rayment e colegas (1993) e Mc Killop e Geeves (1993). Fraser e Marston (1995) verificaram também que o complexo troponina não apresenta nenhum efeito sobre a velocidade da mobilidade do filamento fino sobre a miosina na ausência de Ca^{2+}, mas apenas sobre a proporção dos filamentos móveis. Na ausência de Ca^{2+} o número de filamentos móveis é reduzido; na presença de Ca^{2+}, este número é aumentado. Ou seja, cada filamento é "ligado" como uma unidade cooperativa, em um processo "tudo ou nada". Adicionalmente, na presença de Ca^{2+} ocorre um aumento significativo na velocidade da mobilidade do filamento fino sobre a miosina. Este aumento ocorre apenas quando a TnT está presente, e não foi verificado para o complexo binário TnC/TnI (Fraser e Marston, 1995). É provável que este efeito da TnT sobre o aumento na velocidade da mobilidade do filamento fino sobre a miosina esteja relacionado com a ativação da atividade ATPásica observada em nossos ensaios de ATPase.

Que o papel regulatório da TnT é transmitido ao filamento fino através da tropomiosina, já está bastante claro. No entanto, o mecanismo através do qual se dá esta comunicação, não é conhecido. Sabemos que na ausência de Ca^{2+} a TnT juntamente com a TnI de alguma maneira mantém a tropomiosina em seu estado "off", e na presença de Ca^{2+} em seu estado "on". Através de nossos resultados, pudemos localizar os domínios inibitório e ativatório da TnT. Como estes domínios exercem seus papéis ainda não está claro. A região CB2 (aminoácidos 77 a 157, Fig.6), presente dentro do domínio ativatório T_1, que se liga fortemente à tropomiosina (Pearlstone e Smillie, 1977) seria um forte candidato para alterar a posição da tropomiosina sobre a actina, como pressuporia o modelo de impedimento estérico da regulação da interação entre a actina e a miosina. A região CB2 apresenta alto conteúdo de estrutura de alfa-hélice quando analisada através de dicroismo circular (Pearlstone e Smillie, 1977), e apresentaria no total aproximadamente 22 voltas de alfa-hélice. A região entre os aminoácidos 180 e 284 da tropomiosina, que contém o sítio de ligação para CB2 (White et al., 1987), apresenta aproximadamente 26 voltas. O fato de que a região

T_1 da TnT apresenta-se como uma estrutura em bastão (Flicker et al., 1982; White et al., 1987) indica que a região CB2, contida em T_1, apresenta uma estrutura estendida, que dispõe-se paralelamente à estrutura em "coiled coil" da tropomiosina. A região de contato entre a região CB2 com a tropomiosina corresponderia aproximadamente à 1/3 do comprimento da tropomiosina (que apresenta 284 aminoácidos). Esta região de contato, seria o sítio da propagação do sinal proveniente da ligação do Ca^{2+} à TnC para a tropomiosina que resultaria na ativação da atividade ATPásica. A região de contato com o filamento fino, presente dentro de T_2, o domínio inibitório da TnT, seria menor, e agiria em conjunto com a TnI para causar seu efeito inibitório. Portanto várias questões a respeito de como exatamente as interações entre os domínios inibitório e ativatório da TnT com a tropomiosina resultariam na inibição (na ausência de Ca^{2+}) e na ativação (na presença de Ca^{2+}) da atividade ATPásica ainda estão em aberto.

A partir deste modelo várias hipóteses poderão ser testadas e analisadas em maior detalhe, como por exemplo, se a região T_1 apresenta alterações conformacionais nos estados "on" e "off" que não foram detectadas com a metodologia utilizada neste trabalho; quais as regiões da TnC e da TnT envolvidas na interação TnT/TnC na presença de Ca^{2+}, e desta maneira detalhar melhor o papel da interação da TnT com a TnC na ativação da atividade ATPásica; como a TnI comunica-se com a TnT para produzir a inibição da atividade ATPásica, já que foi demonstrado que a interação direta da TnI com a TnT não é necessária para a inibição total (Farah et al., 1994).

BIBLIOGRAFIA

Adelstein, R.S. and Eisenberg, E. (1980). Regulation and kinetics of the action-myosin-ATP interaction. Ann. Rev. Biochem. *49*, 921-956.

Andreev, O. and Borejdo, J. (1992). Binding of myosin subfragment-1 to F-actin. Biochem. Biophys. Res. Commun. *188*, 94-101.

Brandt, P.W., Diamond, M.S., and Schachat, F.H. (1984). The thin-filament of vertebrate skeletal muscle cooperatively activates as a unit. J. Mol. Biol. *180*, 379-384.

Brandt, P.W., Diamond, M.S., Rutchik, J.S., and Schachat, F.W (1987). Cooperative interaction between troponin-tropomyosin units extend the length of the thin filament in skeletal muscle. J. Mol. Biol. *195*, 885-896.

Breitbart, R.E., Nguyen, H.T., Medford, R.M., Destree, A.T., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1985). Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. Cell *41*, 67-82.

Bremel, R.D. and Weber, A. (1972). Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. Nature New Biol. *238*, 97-101.

Chalovich, J.M. and Eisenberg, E. (1982). Inhibition of the actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. J. Biol. Chem. *257*, 2432-2437.

Chong, P.C.S. and Hodges, R.S. (1982a). Photochemical cross-linking between rabbit skeletal troponin subunits. Troponin I-troponin T interactions. J. Biol. Chem. *257*, 11667-11672.

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

Colowick, S. P. and Kaplan, N.O. (1982). Structural and contractile proteins. Part B: The contractile apparatus and the cytoskeleton. Methods in Enzymology 85. Academic Press, Inc. NY

Da Silva, A.C.R., De Araujo, A.H.B., Herzberg, O., Moult, J., Sorenson, M., and Reinach, F.C. (1993). Troponin-C mutants with increased calcium affinity. Eur. J. Biochem. *213*, 599-604.

Da Silva, A.C.R. and Reinach, F.C. (1991). Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. TIBS *16*, 53-57.

Dhoot, G.H., and Perry. S.V. (1979a). Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. Nature *278*, 714-718.

Dhoot, G.H., Frearson,N., and Perry, S. V. (1979b). Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. Exp. Cell Res. *122*, 339-350.

Dhoot,G.K., Frearson, N., and Perry, S.V. (1980). The components of the troponin complex and development in skeletal muscle. Exp. Cell Res. *127*, 75-87.

Ebashi, S. and Kodama, A. (1966). Native tropomyosin-like action of troponin on trypsin-treated myosin B. J. Biochem. *60*, 733-734.

Ebashi, S., Ohtsuki, I., and Mihashi, K. (1973). Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. *37*, 215-223.

Eisenberg, E. and Kielley, W.W. (1974). Troponin-tropomyosin complex. Column chromatography separation and activity of the three active troponin components with and without tropomyosin present. J. Biol. Chem. *249*, 4742-4748.

Eyk, J.E.V., Cachia, P.J., Ingraham, R.H., and Hodges, R.S. (1986). Studies on the regulatory complex of rabbit skeletal muscle: contributions of troponin subunits and tropomyosin in the presence and absence of Mg^{2+} to the acto-S1 ATPase activity. J. Protein Chem. *5*, 335-354.

Farah, C.S., Miyamoto, C.A., Ramos, C.H.I.R., Da Silva, A.C.R., Quaggio, R.B., Fujimori, K., Smillie, L.B., and Reinach, F.C. (1994). Structural and regulatory functions of the NH_2- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. J. Biol. Chem. *269*, 5230-5240.

Farah, C.S. and Reinach, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. FASEB J. In press.

Flicker, P.F., Phillips Jr, G.N., and Cohen, C. (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin, an electron microscope study. J. Mol. Biol. *162*, 495-501.

Frankel, S., Sohn, R., and Leinwand, L. (1991). The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *88*, 1192-1196.

Fraser, I.D.C., and Marston, S.B. (1995). *In vitro* motility of actin-tropomyosin regulation by troponin and calcium. J. Biol. Chem. *270*, 7836-7841.

Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moult, J., and Reinach, F.C. (1990). Probing the Ca^{++} induced conformational transition of troponin C with site directed mutants. Nature *345*, 182-184.

Gauthier, G.F. (1983). The Muscular Tissue. In Histology, Cell and Tissue Biology. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 256-281.

Grabarek, Z., Drabikowski, W., Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., and Gergely, J. (1981). Protelytic fragments of troponin C. J. Biol. Chem. *256*, 13121-13127.

Grabarek, Z., Grabarek, J., Leavis, P.C., and 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.

Greaser, M.L. and Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. J. Biol. Chem. *246*, 4226-4233.

Greaser, M.L. and Gergely, J. (1973). Purification and properties of the components from troponin. J. Biol. Chem. *248*, 2125-2133.

Greene, L.E. and Eisenberg, E. (1980). Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *77*, 2616-2620.

Hartl, F.U., Martin, J., and Neupert, W. (1992). Protein folding in the cell: The role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. *21*, 293-322.

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

Haselgrove, J.C. (1972). X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. *37*, 341-352.

Head, J.F. and Perry, S.V. (1974). The interaction of the calcium binding troponin (troponin C) with bivalent cations and the inhibitory protein (troponin I). Biochem. J. *137*, 145-154.

Heeley, D.H., Golosinska, K., and Smillie, L.B. (1987). The effects of troponin T fragments T_1 and T_2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin

I and troponin C. J. Biol. Chem. *262*, 9971-9978.

Heinomen, J.K. and Lahti, R.J. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal. Biochem. *113*, 313-317.

Herzberg, O. and James, M.N.G. (1985). Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin C at 2.8 Å resolution. Nature *313*, 653-659.

Herzberg, O., Moult, J., and James, M.N.G. (1986). A model for the Ca^{2+} induced conformational transition of troponin C. J. Biol. Chem. *261*, 2638-2644.

Hill, L.E., Mehegan, J.P., Butters, C.A., and Tobacman, L.S. (1992). Analysis of troponin-tropomyosin binding to actin. Troponin does not promote interactions between tropomyosin molecules. J. Biol. Chem. *267*, 16106-16113.

Hitchcock, S.E. (1975). Regulation of muscle contraction: binding of troponin and its components to actin and tropomyosin. Eur. J. Biochem. *52*, 255-263.

Hitchcock, S.E. (1982). Study of the structure of troponin I by measuring the relative reactivities of lysines with acetic anhydride. J. Biol. Chem. *257*, 7372-7380.

Hitchcock, S.E., Huxley, H.E., and Szent-Györgyi, A.G. (1973). Calcium sensitivity binding o troponin to actin-tropomyosin: a two-site model for troponin action. J. Mol. Biol. *80*, 825-836.

Hitchcock, S.E., Zimmerman, C.J., and Smalley, C. (1981). Study of the structure of troponin T by measuring the relative reactivites of lysines with acetic anhydride. J. Mol. Biol. *147*, 125-151.

Hoffman, S.J., Looker, D.L., Roehrich, J.M., Cozart, P.E., Durfee, S.L., Tedesco, J.L., and Stetler,

G.L. (1990). Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *87*, 8521-8525.

Holmes, K.C. (1995). The actomyosin interaction and its control by tropomyosin. Biophys. J. *68*, 2s-7s.

Horwitz, J., Bullard, B., and Mercola, D. (1979). Interaction of troponin subunits: the interaction between the inhibitory and tropomyosin-binding subunits. J. Biol. Chem. *254*, 350-355.

Huxley, H.E. (1972). Structural changes in the actin- and myosin- containing filaments during contraction. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. *37*, 361-376.

Johnson, J.D., Collins, J.H., Robertson, S.P., and Potter, J.D. (1980). A fluorescent probe study of Ca^{2+} binding to the Ca^{2+}-specific sites of cardiac troponin and troponin C. J. Biol. Chem. *255*, 9635-9640.

Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin- DNase I complex. Nature *347*, 37-44.

Kron, S.J., and Spudich, J.A. (1986). Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *83*, 6272-6276.

Kunkel, T.A., Roberts, J.D., and Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. *154*, 367-382.

Lee, S.C. and Olins, P.O. (1992). Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. *267*, 2849-2852.

Lehman, W., Craig, R., and Vibert, P. (1994). Ca^{2+}-induced tropomyosin movement in *Limulus* thin

filaments revealed by three-dimensional reconstruction. Nature *368*, 65-67.

Lehrer, S.S. and Morris, E.P. (1982). Dual effects of tropomyosin and troponin-tropomyosin on actomyosin subfragment 1 ATPase. J. Biol. Chem. *257*, 8073-8080.

Li, M.X., Chandra, M., Pearlstone, J.R., Racher, K.I., Trigo-Gonzales, G., Borgford, T., Kay, C.M., and Smillie, L. (1994). Properties of isolated recombinant N and C domains of chicken troponin C. Biochemistry *33*, 917-925.

Mak, A.S. and Smillie, L.B. (1981). Structural interpretation of the two-site binding of troponin on the muscle thin filament. J. Mol. Biol. *149*, 541-550.

Malik, N.A., Anantharamaiah, G.M., Gawish, A., and Cheung, H.C. (1987). Structural and biological studies on synthetic peptide analogues of a low-affinity calcium-binding site of skeletal troponin C. BBA *911*, 221-230.

Malnic, B. and Reinach, F.C. (1994). Assembly of functional skeletal muscle troponin complex in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. *222*, 49-54.

Matsuda, R., Obinata, T., and Shimada, Y. (1981). Types of troponin components during development of chicken skeletal muscle. Dev. Biol. *82*, 11-19.

McKillop, D.F.A. and Geeves, M.A. (1991). Regulation of the acto-myosin subfragment 1 interaction by troponin/tropomyosin. Evidence for control of a specific isomerization between two acto-myosin subfragment 1 states. Biochem. J. *279*, 711-718.

McKillop, D.F.A. and Geeves, M.A. (1993). Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. Biophys. J. *65*, 693-701.

McNally, E.M., Goodwin, E.B., Spudich, J.A., and Leinwand, L.A. (1988). Coexpression and assembly of myosin heavy chain and myosin light chain in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA *85*, 7270-7273.

Milligan, R.A., Whittaker, M., and Safer, D. (1990). Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. Nature *348*, 217-221.

Mitraki, A., Fane, B., Haase-Pettingell, C., Sturtevant, J., and King, J. (1991). Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. Science *253*, 54-58.

Moss,R. (1991). Ca^{2+} regulation of mechanical properties of striated muscle. Mechanistic studies using extraction and replacement of regulatory proteins. Circulation Research *70*, 865-884.

Moss, R.L., Giulian, C.C., and Greaser, M.L. (1985). The effects of partial extraction of TnC upon the tension -pCa relation in mammalian skeletal muscle. J. Gen. Physiol. *86*, 585-600.

Ohtsuki, I. (1979). Molecular arrangement of troponin T in the filament. J. Biochem. *86*, 491-497.

Ohtsuki, I., Maruyama, K., and Ebashi, S. (1986). Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. Adv. Protein Chem. *38*, 1-67.

Pan, B.-S., Gordon, A.M., and Luo, Z. (1989). Removal of tropomyosin overlap modifies cooperative binding of myosin S1 to reconstituted thin filaments of rabbit striated muscle. J. Biol. Chem. *264*, 8495-8498.

Pan, B.-S., Gordon, A.M., and Potter, J.D. (1991). Deletion of the first 45 NH_2-terminal residues of rabbit skeletal troponin T strengthens binding of troponin to immobilized tropomyosin. J. Biol. Chem. *266*, 12432-12438.

Pan, B.-S. and Potter, J.D. (1992). Two genetically expressed troponin T fragments representing alfa and beta isoforms exhibit functional differences. J. Biol. Chem. *267*, 23052-23056.

Pardee, J.D. and Spudich, J.A. (1982). Purification of muscle actin. Meth. Enzymol. *85*, 164-182.

Parry, D.A.D. and Squire, J.M. (1973). Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. J. Mol. Biol. *75*, 33-55.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1977). The binding site of rabbit skeletal alfa-tropomyosin on troponin T. Can. J. Biochem. *55*, 1032-1038.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1978). Troponin T fragments: physical properties and binding to troponin C. Can. J. Biochem. *56*, 521-527.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1980). The binding sites of rabbit skeletal troponin I on troponin T. Can. J. Biochem. *58*, 649-654.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1981). Identification of a second binding region on rabbit skeletal troponin T for alfa-tropomyosin. FEBS Lett. *128*, 119-122.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1982). Binding of troponin T fragments to several types of tropomyosin: sensitivity to Ca^{2+} in the presence of troponin C. J. Biol. Chem. *257*, 10587-10592.

Pearlstone, J.R. and Smillie, L.B. (1985). The interaction of rabbit skeletal muscle troponin T fragments with troponin I. Can. J. Biochem. Cell Biol. *63*, 212-218.

Pearlstone, J.R. and Smillie, M.B. (1983). Effects of troponin I plus C on the binding of troponin T and its fragments to alfa-tropomyosin. Ca^{2+} sensitivity and cooperativity. J. Biol. Chem. *258*, 2534-2542.

Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F., and 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.

Poole, K.J.V., Holmes, K.C., Evans, G., Rosenbaum, G., Rayment, I., and Lorenz, M. (1995). Control of the actomyosin interaction. Biophys. J. *68*, 348s.

Potter, J.D. (1974). The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. Archives of Biochemistry and Biophysics *162*, 436-441.

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

Potter, J.D. and Gergely, J. (1974). Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. Biochemistry *13*, 2697-2703.

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

Potter, J.D., Sheng, Z., Pan, B., and Zhao, J. (1995). A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. J. Biol. Chem. *270*, 2557-2562.

Quaggio, R.B., Ferro, J.A., Monteiro, P.B., and Reinach, F.C. (1993). Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: The role of rare codons on the expression level. Prot. Sci. *2*, 1053-1056.

Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., and Milligan, R.A. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. Science *261*, 58-65.

Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., and Holden, H.M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. Science *261*, 50-58.

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

Reinach, F.C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T., and Fischman, D.A. (1982). Isoforms of C-protein in adult skeletal muscle: detection with monoclonal antibodies. J. Cell Biol. *95*, 78-84.

Schachat, F.H., Diamond, M.S., and Brandt, P.W. (1987). Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. J. Mol. Biol. *198*, 551-554.

Schaegger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. *166*, 368-379.

Shen, T., Ho, N.T., Simplaceanu, V., Zou, M., Green, B.N., Tam, M.F., and Ho, C. (1993). Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *90*, 8108-8112.

Skerra, A. and Plucktuhn, A. (1988). Assembly of functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. Science *240*, 1038-1040.

Smillie, L.B. (1979). Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. Trends Biochem. Sci. *4*, 151-155.

Smillie, L.B. (1982). Preparation and identification of A and B tropomyosin. Meth. Enzymol. *85*, 234-241.

Smillie, L.B., Golosinska, K., and Reinach, F.C. (1988). Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. J. Biol. Chem. *263*, 18816-18820.

Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. Nature *372*, 231-236.

Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. J. Mol. Biol. *219*, 37-44.

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

Sundaralingam, M., Bergstrom, R., Strasburg, G., Rao, S.T., Roychowdhury, P., Greaser, M., and Wang, B.C. (1985). Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3 Å resolution. Science *227*, 945-948.

Syska, H., Wilkinson, J.M., Grand, R.J.A., and Perry, S.V. (1976). The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. Biochem. J. *153*, 375-387.

Tanokura, M., Tawada, Y., Ono, A., and Ohtsuki, I. (1983). Chymotryptic subfragments of troponin T from rabbit skeletal muscle. Interaction with tropomyosin, troponin I and troponin C. J. Biochem. *93*, 331-337.

Tao, T., Scheiner, C.J., and Lamkin, M. (1986). Site-specific photo-cross-linking studies on interactions between troponin and tropomyosin and between subunits of troponin. Biochemistry *25*, 7633-7639.

Van Eerd, Jean-Paul and Kawasaki, Y. (1973). Effect of calcium (II) on the interaction between the

subunits of troponin and tropomyosin. Biochemistry *12*, 4972-4980.

Walsh, T.P., Trueblood, C.E., Evans, R., and Weber, A. (1984). Removal of tropomyosin overlap and the co-operative response to increasing calcium concentrations of the acto-subfragment-1 ATPase. J. Mol. Biol. *182*, 265-269.

White, S.P., Cohen, C., and Phillips Jr., G.N. (1987). Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. Nature *325*, 826-828.

Wilkinson, J.M., Moir, A.J.G., and Waterfield, M.D. (1984). The expression of multiple forms of troponin T in chicken-fast-skeletal muscle may result from defferential splicing of a single gene. Eur. J. Biochem. *143*, 47-56.

Willadsen, K.A., Butters, C.A., Hill, L.E., and Tobacman, L.S. (1992). Effects of the amino-terminal regions of tropomyosin and troponin T on thin filament assembly. J. Biol. Chem. *267*, 23746-23752.
Wnuk, W., Schoechlin, M., and Stein, E.A. (1984). Regulation of actomyosin ATPase by a single calcium-binding site on troponin C from crayfish. J. Biol. Chem. *259*, 9017-9023.

Yates, L.D. and Greaser, M.L. (1983). Troponin subunit stoichiometry and content in rabbit skeletal muscle and myofibrils. J. Biol. Chem. *258*, 5770-5774.

Zot, A.S. and Potter, J.D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. Ann. Rev. Biophys. Chem. *16*, 535-559.

CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome: Bettina Malnic

Endereço: Rua Camargo Aranha, 88
CEP 01236 São Paulo SP Brasil

Local e data de nascimento: 13 de maio de 1965. São Paulo, SP.

Educação

1985-1988 - Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

1989-1991 - Mestrado em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo e Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo. Tese: "Clonagem e Caracterização de 80K-H, um Possível Substrato para a Proteína Quinase C".

1992-1995 - Doutoramento em Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Publicação

Malnic, B. & Reinach, F.C. Assembly of functional skeletal muscle troponin in *E.coli*. (1994) Eur.J.Biochem. 222 (1): 49-54