UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA TROPONINA I
ATRAVÉS DE MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS

RONALDO BENTO QUAGGIO

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

SÃO PAULO

1994

"ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA TROPONINA I ATRAVÉS DE
MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS"

RONALDO BENTO QUAGGIO

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-Almeida
IQ-USP

Prof. Dr. Roy Edward Larson
FMRP-USP

Prof. Dr. Francisco de Assis Leone
FFCLRP

Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho
EPM

SÃO PAULO
06 DE OUTUBRO DE 1994

À Katia

Agradeço a todos que colaboraram e tornaram possível este trabalho.

R.B.Q. foi bolsista do CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Regulação da contração muscular	1
1.2 Troponina I	3
1.3 Interação da troponina I com a tropomiosina	8
1.4 Interação da troponina I com a troponina C	9
1.5 Interação da troponina I com a troponina T	14
1.6 Conclusão	15
1.6.1 Mutações	15
2 MATERIAIS	17
2.1 Reagentes radioativos	17
2.1.1 Nucleotídeos radioativos	17
2.1.2 Marcador de Proteína	17
2.2 Enzimas	17
2.2.1 New England Biolabs	17
2.2.2 Boehringer Mannheim	17

2.3	Meios de Cultura	17
2.3.1	SOB	17
2.3.2	2xTY	17
2.3.3	Meio Mínimo	17
2.3.4	Placas Lambda	17
2.3.5	Lambda Top	18
2.3.6	Placas TYE	18
2.3.7	Placas de Meio Mínimo	18
2.4	Antibióticos	18
2.4.1	Ampicilina	18
2.4.2	Cloranfenicol	18
2.5	Linhagens de Bactérias	18
2.5.1	<i>E.coli</i> K12 HMS174	18
2.5.2	<i>E.coli</i> B BL21(DE3)	18
2.5.3	<i>E.coli</i> B BL21(DE3) pLysS	18
2.5.4	<i>E.coli</i> B BL21(DE3) pLysE	18
2.5.5	<i>E.coli</i> JM101	19
2.5.6	<i>E.coli</i> CJ236	19
2.6	Tampões e Soluções	19
2.6.1	TFB	19
2.6.2	DnD	19
2.6.3	TE	19
2.6.4	PEG	19
2.6.5	Solução A	19
2.6.6	Solução B	19
2.6.7	Solução C	19
2.6.8	Tampão de Digestão Bam HI/Eco RI	19
2.6.9	Tampão de Digestão Eco RV	19
2.6.10	Tampão de Digestão Bam HI	19

2.6.11	Tampão de Digestão Nde I/Bam HI	20
2.6.12	Tampão de Digestão Nde I/Eco RI	20
2.6.13	Tampão de Ligação	20
2.6.14	TBE (1x)	20
2.6.15	Tampão de amostra para DNA (6x)	20
2.6.16	Tampão de amostra para SDS-PAGE (2x)	20
2.6.17	Tampão de amostra uréia-gel (6x)	20
3	MÉTODOS	21
3.1	Crescimento e manutenção das Bactérias	21
3.2	Digestão dos vetores	21
3.3	Reação de Ligação	21
3.4	Preparação das Amostras de DNA para eletroforese	22
3.5	Gel de Agarose	22
3.6	Transformação de Bactérias com RF M13 ou Plasmídeo	22
3.8	Mini-preparação de DNA	23
3.9	Preparação de DNA fita simples (ssDNA)	23
3.11	Mutação Sítio-Dirigida com Oligonucleotídeo	24
3.11.1	Preparação de DNA fita simples contendo uracil	24
3.11.2	Fosforilação do Oligonucleotídeo	24
3.11.3	Hibridização	25
3.11.4	Extensão e Ligação	25
3.11.5	Seleção e seqüenciamento dos Mutantes	25

3.12	Preparação em Larga Escala de RF M13 e	
	Plasmídeo	25
3.12.1	RF M13	25
3.12.2	Plasmídeo	26
3.12.3	Extração de plasmídeo e RF M13 por	
	Lise Alcalina	26
3.12.4	Purificação de plasmídeo e RF M13	
	por gradiente de CsCl ₂	27
3.13	Mini-indução de proteína	27
3.14	Gel de SDS-PAGE	27
3.14.1	Preparação de amostra para gel	
	SDS-PAGE	28
3.15	Indução em larga escala de proteína . . .	28
3.16	Purificação de proteína recombinante	
	induzida em larga escala	29
3.16.1	Troponina I recombinante	29
3.16.2	Troponina C recombinante	29
3.16.3	Troponina T recombinante	30
3.16.4	Proteínas musculares de galinha . . .	30
3.17	Quantificação da concentração de	
	proteína	31
3.18	Formação do complexo TNI/TNC	31
3.18.1	Amostra para gel de Uréia	31
3.18.2	Gel de uréia	31
3.19	Reconstituição do complexo troponina . . .	32
3.19.1	Análise do complexo troponina por	
	FPLC	32
3.20	Inibição da atividade Mg ²⁺ ATPásica	32

3.21	Liberação da inibição da Mg^{2+} ATPase por troponina C	33
3.22	Regulação por cálcio da atividade Mg^{2+} ATPásica	33
3.23	Marcação da troponinas I mutantes com N-Etil (2,3- ^{14}C)maleimida	34
3.24	Ligação da troponina I ao filamento de actina	34
3.25	Análise dos experimentos de ligação por Scatchard plots	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Transferência do inserto TnI de pET-R18 para M13mp18	37
4.2	Mutações sítio-dirigidas: K105E, F106Y, R113E E V157*	39
4.3	Subclonagem dos insertos TnIs mutantes no vetor pET	40
4.4	Expressão e purificação dos mutantes de troponina I	42
4.5	Caracterização dos mutantes de troponina I	43
4.5.1	Formação dos complexos TnC/TnIs mutantes	44
4.5.2	Inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pelas TnIs mutantes	47
4.5.3	Liberação da inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pela troponina C	49

4.5.4	Formação do complexo troponina: TnC, TnT e TnIs mutantes	51
4.5.5	Regulação da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pelos complexos troponina contendo TnIs mutantes	53
4.5.6	Ensaio de ligação da troponina I ao filamento de actina	55
5	DISCUSSÃO	63
5.1	Troponina I	64
5.2	Mutantes de troponina I	67
5.3	Conclusão	72
5.3.1	Interface TnI-tropomiosina	74
5.3.2	Interface TnI-actina	75
	BIBLIOGRAFIA	77
	Anexo 1 - Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in <i>Escherichia coli</i> : The role of rare codons on the expression level	88
	Anexo 2 - Lisogenização com λ DE3 das cepas <i>E.coli</i> CY15077 e <i>E.coli</i> W3110 A33	102
	Materiais e Métodos	104
1	Linhagens de Bactérias	104
1.1	<i>E.coli</i> W3110trp A33	104
1.2	<i>E.coli</i> CY15077 (W3110 Δ trpEA2)	104
1.3	Fago λ DE3	104
2	Lisogenização com λ DE3	104

3	Verificação da lisogenização de λ DE3 . . .	105
	CURRICULUM VITAE	106

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Seqüência do fragmento CN4 da troponina I	4
Figura 2: Peptídeos sintetizados por Talbot e Hodges (1981).	5
Figura 3: Análogos do peptídeo inibitório sintetizados por Van Eyk e Hodges (1988)	7
Figura 4: Modelo de interação troponina I troponina C . .	12
Figura 5: Diagrama estéreo do peptídeo inibitório da TnI ligado a troponina C saturada com cálcio	13
Figura 6: Transferência do inserto TnI do vetor pET-R18 para o vetor M13mp18	38
Figura 7: Oligonucleotídeos utilizados na construção dos mutantes sítio dirigidos de troponina I	39
Figura 8: Transferência do insertos TnIs mutantes dos vetores M13-R# para o vetor de expressão pET3a .	41
Figura 9: Purificação da TnI recombinante	42
Figura 10: Quadro sinótico do método de purificação das TnIs recombinantes com as modificações introduzidas	43
Figura 11: Formação dos com-plexos das troponinas I sel- vagem e mutantes com a tropo-nina C selvagem e as troponi-nas C mutantes nos sítios de ligação de cálcio	46
Figura 12: Ensaio de inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da acto-miosina pela troponina I recombinante selvagem e pelas TnIs mutantes	47
Figura 13: Ensaio de liberação da inibição pela troponina I da atividade Mg^{2+} ATPásica da acto-miosina pela adição de troponina C	49

Figura 14: Eluição da coluna de FPLC dos complexos troponina reconstituídos com a TnI selvagem e as TnIs mutantes.	52
Figura 15: Ensaio de regulação por cálcio da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pela troponina	53
Figura 16: Ligação das diferentes troponinas I à actina-tropomiosina	56
Figura 17: Ensaio de ligação troponina I actina sem tropomiosina	59
Figura 18: Ligação da troponina I ao filamento de actina	65
Figura 19: Modelo de interação entre troponina I, tropomiosina e filamento de actina	73
Tabela 1: Importância dos resíduos da seqüência primária do peptídeo inibi-tório.	7
Tabela 2: Parâmetros da análise por Scatchard plot dos experimentos de ligação da troponina I ao filamento de actina	62

ABREVIATURAS

BSA	albumina bovina sérica
CM	carboxi-metil
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil-eter) N,N,N',N' tetracético
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranisídeo
O.D.	densidade óptica
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
psi	libras por polegada quadrada
SDS	laurilsulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametilenodiamino
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

A troponina I (TnI) é a sub-unidade inibitória do complexo troponina, responsável pela regulação da contração do músculo esquelético. Foi demonstrado que sua ação inibitória sobre a Mg^{2+} ATPase da actomiosina, deve-se principalmente à região entre os resíduos 96 e 116 (região do peptídeo inibitório).

Para estudar o mecanismo de inibição a nível molecular, produzimos três mutantes na região do peptídeo inibitório através de mutações sítio-dirigidas. Substituímos os resíduos lisina 105 por ácido glutâmico (K105E), fenilalanina 106 por tirosina (F106Y) e arginina 113 por ácido glutâmico (R113E). As troponinas I mutantes foram expressas em *E.coli*, purificadas e ensaiadas em sua atividade inibitória, interações com os outros componentes do complexo regulatório e sua capacidade regulatória.

Os resultados obtidos indicam que a mutação na posição 105 alterou a interação da proteína com a tropomiosina, diminuindo sua atividade inibitória e afinidade pela actina-tropomiosina. A substituição na posição 113 alterou a interação da proteína com a actina e com a actina-tropomiosina, também diminuindo a atividade inibitória na presença de tropomiosina e inviabilizando a inibição na ausência de tropomiosina. Já a substituição na posição 106 não produziu alteração detectável.

Concluimos que o resíduo 105 faz parte do sítio de ligação da troponina I ao complexo actina-tropomiosina e que o resíduo 113 participa diretamente do mecanismo de inibição. Desta forma, definimos duas interfaces de interação da troponina I com o filamento de actina-tropomiosina, necessárias a ligação da troponina I ao filamento e inibição da ATPase.

SUMMARY

Troponin I (TnI) is the inhibitory subunit of the troponin complex, responsible for the regulation of skeletal muscle contraction. It has been demonstrated that TnI's inhibitory action on Mg^{2+} ATPase of actomyosin is due principally to the region between residues 96 and 116 (the inhibitory region).

To study the inhibitory mechanism at the molecular level, we produced three mutants of the inhibitory region by site-directed mutagenesis. We substituted lysine 105 for glutamic acid (K105E), phenylalanine 106 for tyrosine (F106Y) and arginine 113 for glutamic acid (R113E). The TnI mutants were expressed in *E.coli*, purified and analyzed for their inhibitory activity, interaction with other components of the regulatory complex and regulatory capacity.

The results indicate that the mutation in K105E modified the interaction of TnI with tropomyosin, reduced its inhibitory activity and actin-tropomyosin affinity. The mutant R113E displayed modified interaction with actin and actin-tropomyosin, reduced inhibitory activity in the presence of tropomyosin and essentially no inhibitory activity in the absence of tropomyosin. The mutant F106Y behaved essentially like wild-type TnI.

We conclude that residue 105 is part of the site by which troponin I binds to the actin-tropomyosin and that residue 113 participates directly in the inhibitory mechanism. In this way, we have defined two interfaces between troponin I and the actin-tropomyosin which are necessary for binding TnI to the filament and to inhibit the actomyosin ATPase.

1 INTRODUÇÃO

A regulação da contração muscular a nível molecular é um sistema modelo sobre o qual possuímos muitas informações bioquímicas, entretanto a forma como este mecanismo funciona permanece desconhecida. Nesta tese estudamos um de seus componentes, troponina I, através de mutações sítio-dirigidas. Mudando alguns de seus resíduos em posições descritas com importantes para sua atividade inibitória, obtemos novas informações sobre seu mecanismo de inibição a nível molecular. Anexamos também a este trabalho o artigo Quaggio e colaboradores (1993; anexo 1), que descreve a produção e caracterização da troponina I recombinante em *E.coli* do qual esta tese é decorrente. No anexo 2, descrevemos a construção de novos hospedeiros para vetores do sistema pET. Estes novos hospedeiros permitirão a produção de proteínas contendo análogos de triptofano em suas seqüências primárias, o que permitirá o estudo destas proteínas através de ensaios de fluorescência.

1.1 Regulação da contração muscular

A contração muscular é o resultado da interação entre os filamentos de F-actina (filamento fino) e os filamentos de miosina (filamento grosso) que constituem o sarcômero da fibra muscular. Esta interação provoca o deslizamento do filamento de actina sobre o filamento de miosina com o consumo de ATP. Esta interação é regulada pela concentração de íons cálcio presente no citoplasma da fibra muscular. No músculo esquelético e cardíaco esta regulação é feita através de um complexo proteico associado

ao filamento de actina. Este complexo é composto por uma molécula de tropomiosina e uma de troponina atuando sobre segmentos de sete monômeros de actina ao longo do filamento fino (Ohtsuki et al., 1986; Leavis e Gergely, 1982; Zot e Potter, 1987).

A molécula de tropomiosina (TM) é constituída por duas sub-unidades em α -hélices paralelas com uma estrutura "coiled-coil", que forma filamentos através da interação do N-terminal de uma molécula com o C-terminal da molécula vizinha (McLachlan e Stewart, 1975). Estes filamentos ligam-se ao filamento de actina. Cada molécula estende-se sobre sete monômeros de actina no filamento. Na metade C-terminal da TM liga-se uma molécula de troponina. A troponina é um complexo formado por três polipeptídeos. Cada um dos componentes deste complexo exerce uma função específica no processo de regulação da contração muscular. Um é o receptor de íons cálcio, troponina C (TnC), outro, troponina I (TnI), é responsável pela inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina e o terceiro polipeptídeo, troponina T (TnT), é o responsável pela interação da troponina com a tropomiosina (Ohtsuki et al., 1986; Leavis e Gergely, 1982; Zot e Potter, 1987).

A ação regulatória do complexo troponina-tropomiosina sobre a interação entre a actina-miosina é feita de modo cálcio dependente. Em baixas concentrações de cálcio ($0,1 \mu M$), o complexo bloqueia a interação actina-miosina. Nesta condição, a troponina I interage com a tropomiosina e inibe a interação entre

os filamentos de actina e miosina. Quando a concentração de cálcio é aumentada (1-10 μM), este liga-se à troponina C que desloca a troponina I (Tao et al., 1990), o que faz com que o complexo deixe de inibir a interação actina-miosina resultando na contração muscular (Ohtsuki et al., 1986; Leavis e Gergely, 1982; Zot e Potter, 1987).

1.2 Troponina I

A troponina I é um polipeptídeo básico com pI de 9,3 e aproximadamente 180 aminoácidos (Wilkinson e Grand, 1975; Wilkinson, 1974; Wilkinson e Grand, 1978). A TnI isolada é capaz de inibir em 20% a atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina, independente da concentração de cálcio (Syska et al., 1976; Perry et al., 1973). Esta ação inibitória atinge 80% na presença de tropomiosina. A adição de troponina C em quantidade equimolar à troponina I neutraliza sua ação inibitória independente da concentração de cálcio (Perry et al., 1973).

Estudando fragmentos produzidos com brometo cianogênio, Syska e colaboradores (1976) demonstraram que o fragmento CN4 (resíduos 96-116 da TnI, Figura 1), possui 75% da ação inibitória da troponina I intacta. Esta inibição também é neutralizada pela adição de troponina C. Esta região do polipeptídeo tem a seqüência de aminoácidos altamente conservada entre as diferentes TnIs (Wilkinson e Grand, 1978), indicando que esta região é importante na interação com a tropomiosina e actina no processo de inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina.

Em outro trabalho Talbot e Hodges (1981b) fizeram um estudo comparativo, utilizando peptídeos sintéticos, das seqüências primária da região do peptídeo inibitório de algumas troponinas I e determinaram a importância de alguns dos resíduos do peptídeo para atividade inibitória, acrescentando novos dados ao trabalho anterior (figura 2; Talbot e Hodges, 1981b).

105	110	113	116	
Gly-Lys-Phe-Lys-Arg-Pro-Pro-Leu-Arg-Arg-Arg-Val-Arg				I
Gly-----		(-)	-----Arg	II
Gly-----		Leu-----	Arg	III
Gly-----	Thr-----	Arg-----	Arg	IV
Gly-----	Thr-----	Leu-----	Arg	V

Figura 2: Peptídeos sintetizados por Talbot e Hodges (1981).
Peptídeos utilizados no estudo comparativo das diferentes seqüências da região do peptídeo inibitório da troponina I e análise da importância de alguns resíduos. (-)deleção; peptídeo II seqüência da TnI de músculo esquelético de coelho; peptídeo V seqüência da TnI de músculo cardíaco de coelho.

Comparando as atividades dos peptídeos I, II e III, onde a substituição pelo resíduo de Leucina (III) diminuía a capacidade inibitória do peptídeo, concluiu-se pela importância do resíduo de arginina 113. Foi também descartada a importância do resíduo de

Prolina 110, que foi substituído em IV e V por um resíduo de Treonina, não havendo modificação nos valores esperados para a atividade inibitória dos peptídeos, ou seja, a atividade de IV é similar a de I e a de V é similar a de III.

Grand e colaboradores (1982) analisaram os espectros de ressonância magnética de próton do peptídeo CN4 na presença de actina. Analisando os espectros, verificou que os resíduos de Arginina do peptídeo CN4 são afetados pela presença da actina, enquanto que os resíduos Lys 105 e Val 114, essenciais à ação inibitória (Talbot e Hodges, 1981), não são afetados. Este resultado não só confirma a interação de CN4 com a actina, mas também sugere que resíduos como a Val 114, essencial à inibição, interaja com a tropomiosina, uma vez que este resíduo não é perturbado pela presença da actina.

Van Eyk e Hodges (1988), em outro trabalho com peptídeos sintéticos análogos ao peptídeo inibitório, estudaram o papel de cada um dos resíduos do peptídeo inibitório (Ip), substituindo-os por um resíduo de Glicina e verificando sua importância para a atividade inibitória (figura 3; Van Eyk e Hodges, 1988).

105	110	115	
Gly-Lys-Phe-Lys-Arg-Pro-Pro-Leu-Arg-Arg-Val-Arg			Ip
----Gly-----			105
-----Gly-----			106
-----Gly-----			107
-----Gly-----			108
-----Gly-----			109
-----Gly-----			110
-----Gly-----			111
-----Gly-----			112
-----Gly-----			113
-----Gly-----			114
-----Gly-----			115

Figura 3: Análogos do peptídeo inibitório sintetizados por Van Eyk e Hodges (1988). Vários análogos do peptídeo inibitório foram sintetizados substituindo-se o resíduos da seqüência primária por resíduos de glicina para estudar sua importância para atividade inibitória do peptídeo.

Resíduo	Importância
Arg ₁₁₅	mais essencial
Val ₁₁₄	+++++++--
Lys ₁₀₇	+++++++--
Leu ₁₁₁	+++++++--
Arg ₁₁₂	+++++----
Phe ₁₀₆	+++++----
Pro ₁₁₀	+++++----
Arg ₁₁₃	+++-----
Lys ₁₀₅	++-----
Arg ₁₀₈	+-----
Pro ₁₀₉	menos essencial

Tabela 1: Importância dos resíduos da seqüência primária do peptídeo inibitório. Peptídeos sintéticos análogos ao peptídeo inibitório contendo substituições por glicinas dos resíduos em suas posições originais, foram utilizados para determinar a importância do resíduo para atividade inibitória do peptídeo (Van Eyk e Hodges, 1988).

A partir da análise do comportamento dos análogos contendo glicina, foi construída uma escala de importância dos resíduos da sequência primária do peptídeo inibitório em sua interação com a actina-tropomiosina na inibição da ATPase (Tabela 1).

Em trabalho recente Van Eyk e colaboradores (1993) acrescentaram um novo dado à caracterização da região do peptídeo inibitório da troponina I. Substituíram a TnI pelo peptídeo inibitório em fibras de músculo cardíaco descascadas e verificaram que o peptídeo é capaz de mimetizar a função da troponina I, na regulação da contração muscular de modo cálcio dependente (Van Eyk et al., 1993). Estes resultados confirmam que a região do peptídeo inibitório tem um papel central na regulação da inibição pela troponina I.

1.3 Interação da troponina I com a tropomiosina

A interação da troponina I com a tropomiosina no filamento de actina é a responsável pela inibição da atividade Mg^{2+} ATPase da actomiosina (Perry et al., 1973). Apesar da importância desta interação existe pouca informação disponível sobre os domínios nos dois polipeptídeos envolvidos nesta interação.

Potter e Gergely (1974) demonstraram que a TnI liga-se a tropomiosina e actina em ensaios de ultracentrifugação. Katayama (1980) mostrou que a troponina é retida em uma coluna de troponina I-Sepharose 4B, o que indica que existe uma interação direta entre estas duas proteínas.

Eaton e colaboradores (1975) correlacionaram o inibição Mg^{2+} ATPase da actomiosina, a ligação de tropomiosina a actina e o efeito da adição de troponina I. Concluíram que a interação das três sub-unidades é importante no processo de inibição.

A maior parte dos resultados obtidos com a tropomiosina estão mais relacionados a sua interação com a troponina T e seu papel no processo de regulação cálcio dependente (Ohtsuki et al., 1986; Leavis e Gergely, 1982; Zot e Potter, 1987).

1.4 Interação da troponina I com a troponina C

A troponina I liga-se à troponina C de modo cálcio independente, mas a presença de cálcio fortalece esta ligação (Head e Perry, 1974; Potter e Gergely, 1974; Ohnishi et al., 1975). Syska e colaboradores (1976) demonstraram que duas regiões da TnI interagem com a TnC. Estas regiões foram definidas utilizando-se os fragmentos da TnI, CN5 (resíduos 1-21), CN4 (resíduos 96-116) obtidos da digestão com brometo cianogênio e CF2 (resíduos 1-48) obtido pela clivagem nos resíduos de cisteína. Como os fragmentos CN5 e CF2 se sobrepõem, o fragmento que melhor delimita a região de interação é CF2 que se liga mais fortemente à TnC na presença de cálcio. Utilizando o trabalho de Wilkinson e Grand (1978), onde são comparadas quatro seqüências de TnIs, é possível concluir que a provável região de interação está entre os resíduos 10-26 da troponina I. Esta conclusão é confirmada pelo trabalho de Katayama e Nozaki (1982), que sintetizaram um peptídeo análogo a região dos resíduos 10-25 da TnI e mostraram que este peptídeo interage com a

TnC de forma dependente de cálcio. Estes resultados, e outros obtidos por Moir et al. (1978), que descreveu a capacidade da TnC em diminuir a fosforilação dos resíduos Thr 11 e Ser 117 da TnI, indicam uma possível interação dependente de cálcio entre a TnC e TnI na região N-terminal da TnI.

Outra região de interação é o fragmento CN4 já descrito anteriormente, que concentra a ação inibitória da TnI. A ação inibitória da TnI é neutralizada pela adição de TnC independente de cálcio (Syska et al., 1976). Grand e colaboradores (1982), Dalgarno e colaboradores (1982) e Cachia e colaboradores (1983), demonstraram que uma série de resíduos do fragmento CN4 são perturbados pela TnC na presença de cálcio (Figura 1) e que esta perturbação é diminuída com a retirada do cálcio.

Em experimentos com fragmentos de TnC obtidos por digestão com brometo cianogênio, ficou demonstrado que o fragmento CB9 (resíduos 87-134) da TnC é capaz de neutralizar a ação inibitória da TnI, impedir a fosforilação da Ser 117 e também de formar complexo com a TnI na presença de cálcio (Weeks e Perry, 1978; Grabarek et al., 1981).

Leszyk e colaboradores (1987; 1990) em experimentos com duas técnicas diferentes de "cross-link" entre a troponina C e troponina I, determinaram que a região CN4 da TnI formava ligação com as regiões CB9 (resíduos 87-134; Leszyk et al., 1987) e CB8 (resíduos 46-78; Leszyk et al., 1990) da TnC, mas não observou

ligação com a região CN5 em nenhum dos casos. Este resultado conflitante entre os dois trabalhos, talvez se explique pelo fato de terem sido usadas técnicas distintas na produção dos "cross-links" e que de fato a região CN4 interage com as duas regiões da troponina C.

Estas interações entre os resíduos da região do peptídeo inibitório com a TnC de forma cálcio dependente, foram observados ao nível da troponina I como um todo no de trabalho Tao e colaboradores (1990). Em experimentos de transferência de energia por ressonância, Tao e colaboradores observaram que a distância entre a actina e o resíduo cisteína 133 da TnI aumentava para aproximadamente 15 angstroms com a adição de cálcio. Resultado que confirmou em experimento de "cross-link" entre a mesma cisteína 133 e actina: na ausência de cálcio a havia a formação de "cross-link" TnI actina, mas na presença de cálcio o "cross-link" não se formava.

O trabalho de Farah e colaboradores (1994), de nosso laboratório, utilizando mutantes de deleção da TnI, caracterizou o papel de cada um dos domínios da troponina I e sua interação com a TnC no processo de regulação da inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina. A partir desta caracterização foi proposto um modelo de interação anti-paralela entre a troponina C e troponina I (Figura 4).

Figura 4: Modelo de interação troponina I troponina C. Modelo de interação entre os domínios N-terminal e C-terminal da TnI e TnC. Interações cálcio o magnésio dependentes, definidas pelos experimentos de Farah e colaboradores (1994) estão indicadas.

Kobayashi e colaboradores (1994) utilizando experimentos de "cross-link" com o complexo troponina determinaram que a região inibitória faz contacto com os dois domínios da troponina C (sítios de baixa afinidade N-terminal e sítios de alta afinidade C-terminal), e que a interação entre as duas proteínas se da de modo anti-paralelo, ou seja, N-terminal de uma com C-terminal da outra, confirmando o modelo de Farah e colaboradores (1994).

A estrutura da região do peptídeo inibitório quando ligado à troponina C saturada com cálcio, foi determinada por espectroscopia bi-dimensional de ressonância magnética nuclear de

^1H por Campbell e Sykes (1991). Neste experimentos não foi possível determinar o sítio de ligação do peptídeo à TnC, mas determinou-se que o peptídeo tem a forma uma α -Hélice anfifílica distorcida na região das duas prolinas centrais. Os resíduos básicos da hélice não interagem com a TnC, mas apontam suas cadeias laterais em direção oposta à superfície da TnC. Já os resíduos hidrofóbicos formam um pequeno núcleo que interage com a troponina C (figura 5). Estes resultados compatíveis com os dados até agora reunidos sobre a interação da região do peptídeo inibitório com a TnC e com a actina-tropomiosina.

Figura 5: Diagrama estéreo do peptídeo inibitório da TnI ligado a troponina C saturada com cálcio. Estrutura determinada por espectroscopia de ^1H -NMR (Campbell e Sykes, 1991). Observe a posição dos resíduos 105, 106 e 113 mutados em nosso estudo.

1.5 Interação da troponina I com a troponina T

Em ensaios de caracterização da interação da TnT com a TnI vários autores (Hitchcock, 1975; Katayama, 1979; Horwitz et al., 1979; Tanokura e Ohtsuki, 1982) mostraram que a TnI esta muito próxima da TnT (~0,6 nm) no complexo e que a interação entre a TnI e a TnT só ocorre se a TnI está na forma reduzida. Desta forma uma troponina em que a TnI está oxidada, não é capaz de regular a atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina de modo cálcio dependente. Assim conclui-se que a interação entre a TnI e a TnT é necessária para regulação por cálcio da contração muscular (Horwitz et al., 1979).

Chong e Hodges (1982) demonstraram que as Cys 48 e Cys 64 só reagem com iodoacetamida se a TnI estivesse isolada ou complexada com a TnC, e que estes resíduos eram protegidos quando a TnI estava complexada com a TnT. Mostraram também que o resíduo Cys 133¹ reagia em qualquer condição, indicando que a região onde estão os resíduos Cys 48 e Cys 64 da TnI interage com a TnT. Este resultado foi confirmado por Hitchcock-De Gregori (1982) em ensaio onde media a reatividade das lisinas da TnI à acetilação. Demonstrou que as lisinas presentes entre os resíduos 40 e 98 da TnI, tinham sua reatividade modificada quando a TnI estava complexada com a TnT, resultado que é consistente como os dados obtidos para os resíduos de cisteína.

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

1.6 Conclusão

Nosso objetivo nesta tese é estudar o mecanismo de inibição da troponina I sobre a Mg^{2+} ATPase da actomiosina. A nossa estratégia foi a de produzir mutantes de troponina I na região do peptídeo inibitório e caracterizar as alterações no comportamento da proteína mutante associadas às modificações introduzidas.

Desenhamos quatro mutantes diferentes da troponina I, três na região do peptídeo inibitório e um na porção C-terminal da proteína. A escolha dos resíduos baseou-se nos trabalhos com o peptídeo inibitório (Talbot e Hodges, 1981; Talbot e Hodges, 1981b; Van Eyk e Hodges, 1988), já que nenhuma informação estrutural sobre as interações os componentes do sistema regulatório ou sobre o mecanismo de inibição era disponível. Somente com o trabalho de Campebell e Sykes (1991), alguma informação estrutural tornou-se disponível, mas mesmo assim só do peptídeo inibitório da TnI ligado a TnC, sem definir o sítio desta ligação.

1.6.1 Mutações

Como dissemos anteriormente, os resíduos a serem mutados foram definidos com base nos resultados apresentados nos trabalhos com o peptídeo inibitório. A região do peptídeo inibitório é muito básica, possuindo muito resíduos de arginina que são perturbados pela presença de actina (Grand et al., 1982; Dalgarno et al., 1982) e outros perturbados pela TnC com a adição de cálcio (Cachia et al., 1983).

Escolhemos trabalhar nos dois extremos da região do peptídeo: Na região N-terminal que interage mais fortemente com a TnC substituímos o resíduo lisina 105 por um ácido glutâmico, promovendo a mudança de carga na posição. A fenilalanina 106 que interage com a TnC e também com a actina foi substituída por uma tirosina, passando de um resíduo hidrofóbico para um polar. A arginina 113 na posição C-terminal, que é perturbada pela presença de actina e também interage com a TnC, foi substituída por um ácido glutâmico com uma mudança na carga também. Por fim, introduzimos um codon de terminação na posição 157 para estudar o comportamento da proteína sem uma parte de seu C-terminal.

2 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados tem grau analítico.

2.1 Reagentes radioativos

2.1.1 Nucleotídeos radioativos

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

2.1.2 Marcador de Proteína

N-Etil[2,3- C^{14}]Maleimida (5,1 mCi/mmol), Amersham.

2.2 Enzimas

2.2.1 New England Biolabs

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

2.2.2 Boehringer Mannheim

Fragmento Klenow da DNA polimerase I.

2.3 Meios de Cultura

2.3.1 SOB

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

2.3.2 2xTY

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

2.3.3 Meio Mínimo

6 g/l Na_2HPO_4 ; 3 g/l KH_2PO_4 ; 0,5 g/l NaCl; 1 g/l NH_4Cl ; 0,2 g/l MgSO_4 ; 2 g/l glicose; 0,1 g/l CaCl_2 ; 1 mg/l vitamina B_1 .

2.3.4 Placas Lambda

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

2.3.5 Lambda Top

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

2.3.6 Placas TYE

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

2.3.7 Placas de Meio Mínimo

Meio Mínimo; 15 g/l agar.

2.4 Antibióticos

2.4.1 Ampicilina

Ampicilina sódica Binotal, Bayer.

Ampicilina sódica Amplacilina, Fontoura-Wyeth.

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

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

2.4.2 Cloranfenicol

Succinato de cloranfenicol Quemacetina, Carlo Erba.

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

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

2.5 Linhagens de Bactérias

2.5.1 *E.coli* K12 HMS174 (Studier et al., 1990).

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

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

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

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

2.5.6 *E.coli* CJ236 (Kunkel et al., 1987)

2.6 Tampões e Soluções

2.6.1 TFB

100 mM KCl; 45 mM MnCl₂·2H₂O; 10 mM CaCl₂·2H₂O; 3 mM cloreto de hexaminacobalto; 10 mM K-Mes pH 6,2.

2.6.2 DnD

1 M DTT; 90% (v/v) DMSO; 10 mM acetato de potássio pH 6,5.

2.6.3 TE

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

2.6.4 PEG

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

2.6.5 Solução A

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

2.6.6 Solução B

0,2 N NaOH; 1% SDS.

2.6.7 Solução C

3 M acetato de potássio pH 4,8.

2.6.8 Tampão de Digestão Bam HI/Eco RI

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

2.6.9 Tampão de Digestão Eco RV

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

2.6.10 Tampão de Digestão Bam HI

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

2.6.11 Tampão de Digestão Nde I/Bam HI

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

2.6.12 Tampão de Digestão Nde I/Eco RI

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

2.6.13 Tampão de Ligação

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

2.6.14 TBE (1x)

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

2.6.15 Tampão de amostra para DNA (6x)

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

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

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

2.6.17 Tampão de amostra uréia-gel (6x)

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

3 MÉTODOS

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

3.1 Crescimento e manutenção das Bactérias

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

3.2 Digestão dos vetores

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

3.3 Reação de Ligação

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

3.4 Preparação das Amostras de DNA para eletroforese

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

3.5 Gel de Agarose

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

3.6 Transformação de Bactérias com RF M13 ou Plasmídeo

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

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

3.8 Mini-preparação de DNA

Inocular 2 ml de 2xTY contendo o antibiótico apropriado com uma colônia isolada e incubar por 12 horas sob agitação a 37 °C. Transferir 1,5 ml da cultura para tubo eppendorf e centrifugar 12.000xg por 1 min a 4 °C. Aspirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado com 100 µl de solução A gelada. Adicionar 200 µl de solução B. Fechar o tubo e misturar a solução invertendo o tubo delicadamente. Incubar em gelo por 5 min. Adicionar 150 µl de solução C gelada e vortexar de forma delicada na posição invertida. Incubar em gelo por 5 min. Centrifugar por 5 min a 12.000xg e 4 °C. Transferir sobrenadante para novo tubo. Adicionar igual volume de fenol/clorofórmio e vortexar vigorosamente. Centrifugar 2 min a 12.000xg e 4 °C. Transferir fase aquosa para novo tubo e precipitar o DNA adicionando 2 volumes de etanol. Incubar por 2 min à temperatura ambiente. Centrifugar 5 min a 12.000xg e 4 °C. Aspirar o sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol 70%. Centrifugar 5 min a 12.000xg a 4 °C. Aspirar o sobrenadante e secar o precipitado a vácuo. Ressuspender precipitado com 50 µl de TE. Estocar a -20 °C.

3.9 Preparação de DNA fita simples (ssDNA)

Transferir vírus M13 com um palito estéril, para 1,5 ml de 2xTY contendo 1% de *E.coli* JM101 de cultura saturada fresca. Incubar a 37 °C por 4 horas. Transferir cultura para tubo eppendorf estéril. Centrifugar 12.000xg 5 min. Transferir sobrenadante para novo tubo. Adicionar 150 µl de PEG. Incubar 20 min à temperatura ambiente. Centrifugar 12.000xg 20 min. Aspirar sobrenadante. Centrifugar 12.000xg 30 seg. Aspirar sobrenadante. Adicionar 100 µl de TE. Adicionar 50 µl de fenol equilibrado em 10 mM Tris-HCl pH

8,0. Vortex 30 s. Centrifugar 12.000xg 1 min. Retirar fase aquosa para novo tubo. Adicionar 10 μ l de 3 M acetato de sódio pH 5,2. Adicionar 250 μ l de etanol absoluto. Precipitar DNA durante 12 horas a -20 °C. Centrifugar 12.000xg 15 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Lavar o precipitado com etanol 70%. Centrifugar 12.000xg 15 min à temperatura ambiente. Descartar sobrenadante. Secar precipitado a vácuo. Ressuspender precipitado em 30 μ l de TE. Estocar -20 °C.

3.11 Mutao Stio-Dirigida com Oligonucleotdeo

(Zoller e Smith, 1982; Carter et al., 1985; Kunkel et al., 1987)

3.11.1 Preparo de DNA fita simples contendo uracil

Adicionar 1 μ l do sobrenadante de cultura de preparao de DNA fita simples (10^8 - 10^9 pfus; item 3.9) em um frasco de 1 litro contendo 100 ml de meio 2xTY, 0,25 μ g/ml de uridina e 0,25% (v/v) de *E.coli* CJ236 de cultura saturada fresca. Incubar 6 - 12 horas a 37°C e 200 rpm. Centrifugar cultura 1000xg por 10 min e preparar o DNA fita simples como descrito no item 3.9.

3.11.2 Fosforilao do Oligonucleotdeo

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

3.11.3 Hibridização

Adicionar 10 pmoles do oligonucleotídeo mutagênico fosforilado e 10 pmoles de ssDNA do vetor M13 com o inserto a ser mutado em 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂. O tubo com a reação é colocado em um beaker contendo água a 80 °C, que esfriará até a temperatura ambiente.

3.11.4 Extensão e Ligação

A solução de Hibridização (descrita acima) é corrigida para: 0,25 mM rATP; 0,25 mM dNTPs; 5 mM DTT; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂. Adicionar 10 U T4 DNA ligase; 5 U do fragmento Klenow da DNA polimerase. Incubar 12-20 horas a 12-15 °C. Transformar *E.coli* JM101 com a solução de DNA. As colônias infectadas com M13, obtidas após a transformação, são utilizadas na seleção dos mutantes.

3.11.5 Seleção e seqüenciamento dos Mutantes

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

3.12 Preparação em Larga Escala de RF M13 e Plasmídeo

3.12.1 RF M13

Inocular 10 ml de Meio Mínimo com 1% (v/v) de cultura saturada de *E.coli* JM101 fresca e colônia isolada do vírus M13 selecionado e incubar a 37 °C sob agitação vigorosa durante 12

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

3.12.2 Plasmídeo

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

3.12.3 Extração de plasmídeo e RF M13 por Lise Alcalina

Ressuspender precipitado em 50 ml de Solução A gelada. Lisar bactérias com 50 ml de Solução B sob vigorosa agitação (não ultrapassar 5 min no processo). Neutralizar o lisado com 50 ml de Solução C até formar um precipitado branco. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Transferir sobrenadante para outro tubo e adicionar 2 volumes de etanol absoluto (ou 1 volume de isopropanol). Precipitar DNA por 1 hora a -20 °C. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Lavar precipitado com 100 ml etanol 70%. Centrifugar 2.000xg por 20 min a 4 °C. Descartar sobrenadante. Secar precipitado a vácuo.

3.12.4 Purificação de plasmídeo e RF M13 por gradiente de CsCl₂

Ressuspender precipitado em TE. Adicionar CsCl₂ na proporção de 1 g para cada ml de solução. Adicionar brometo de etídio para concentração final de 0,5 mg/ml. Centrifugar 3.000xg por 10 min à temperatura ambiente. Transferir sobrenadante para tubos de ultracentrifugação, completando o volume com óleo mineral. Centrifugar a 60.000 rpm por 24 horas a 20 °C (rotor 80 Ti Beckman ou equivalente). Retirar banda de DNA purificado (RF M13 ou Plasmídeo). Extrair o brometo de etídio com 1-butanol saturado com 1 M NaCl (3x). Dialisar contra TE para retirada do CsCl₂. Estocar -20 °C.

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

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

3.14 Gel de SDS-PAGE

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

R-250. Descorar em 7% ácido acético.

3.14.1 Preparação de amostra para gel SDS-PAGE

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

3.15 Indução em larga escala de proteína

(Studier et al., 1990)

Dia anterior: Repicar clone em placa de TYE com antibiótico apropriado, incubar durante a noite a 37 °C. Inocular 50 ml de 2xTY contendo o antibiótico com cultura da placa. Incubar 3 horas, 37 °C e 200 rpm. Inocular 500 ml de 2xTY contendo o antibiótico com 5 ml (1%) da cultura anterior. Incubar até O.D.₆₀₀ = 0,8 - 0,9, a 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de amostra antes da indução. Induzir a expressão adicionando IPTG para uma concentração final de 0,4 mM. Incubar 3 horas, 37 °C e 200 rpm. Coletar 1 ml de amostra induzida. Centrifugar 4.500xg, 10 min e 4 °C. Descartar sobrenadante e guardar precipitado a -20 °C.

3.16 Purificação de proteína recombinante induzida em larga escala

As sub-unidades do complexo troponina TnC, TnI e TnT recombinantes foram induzidas em larga escala e purificadas segundo os métodos abaixo

3.16.1 Troponina I recombinante (Quaggio et al., 1993)

O precipitado da larga escala é solubilizado em: 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 30 ml para cada litro de cultura induzida. Passar 3 x "French Press", 16.000 psi. Centrifugar 110.000xg, 30 min e 4 °C. Descartar sobrenadante. Ressuspender precipitado em: 50 mM Tris-HCl pH 7.0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Aplicar em coluna de CM-sepharose fast flow equilibrada com o mesmo tampão: 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 mM EDTA; 10 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Eluir com gradiente de NaCl: 0 a 300 mM em frações de 10 ml, com fluxo de 200 ml/h. Reunir frações com a proteína. Dialisar contra: 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 M NaCl; 5 mM β -mercaptoetanol no primeiro passo e 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 500 mM NaCl; 5 mM β -mercaptoetanol nos passos seguintes . Estocar a -20 °C.

3.16.2 Troponina C recombinante (Quaggio et al., 1993)

O precipitado da Larga escala é solubilizado em: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 40 ml para cada litro de cultura induzida. Passar 3 x "French Press", 16.000 psi. Centrifugar 16.000xg, 30 min e 4 °C. Descartar o precipitado. O volume do sobrenadante é corrigido para 50 ml por litro de cultura e é adicionado TCA para 5%(v/v) final. A suspensão é centrifugada 1.500xg, 10 min e 4°C. O precipitado é solubilizado em: 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 2 mM MgCl_2 ; 1 mM β -mercaptoetanol e dialisada contra a mesma solução (3 trocas). A suspensão é centrifugada 110.000xg, 30 min, 4°C. Ao sobrenadante é adicionada uréia sólida para concentração final de 8 M. Aplicar a solução em coluna de DEAE-sepharose fast flow equilibrada com o mesmo tampão: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM MgCl_2 ; 1 mM β -mercaptoetanol; 8 M uréia. Após a aplicação da amostra lavra

a coluna com o mesmo tampão e 60 mM NaCl. Eluir com gradiente de NaCl: 60 a 400 mM em frações de 10 ml, com fluxo de 200 ml/h. Reunir frações com a proteína. Dialisar contra: 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 1 mM β-mercaptoetanol. Estocar a -20 °C.

3.16.3 Troponina T recombinante (Farah et al., 1994)

O precipitado da Larga escala é ressuspenso em 6M uréia, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA e 1,4 mM β-mercaptoetanol; Lisado 3x em uma French Press a 16.000 psi; centrifugado a 30.000 rpm por 1 hora a 4°C; O sobrenadante obtido é aplicado em coluna de DEAE-sepharose fast flow equilibrada no mesmo tampão; A coluna é eluída com gradiente de 0-600 mM NaCl; As frações contendo a proteína são reunidas e dialisadas contra 6M uréia, 50 mM acetato de sódio pH 5,0, 1 mM EDTA e 1,4 mM β-mercaptoetanol; As frações são aplicadas em coluna de CM-sepharose fast flow equilibrada no mesmo tampão; A coluna é eluída com gradiente de NaCl de 0-600 mM; As frações contendo a proteína são dialisadas contra 2% ácido fórmico, liofilizadas e estocadas a -20 °C.

3.16.4 Proteínas musculares de galinha

Miosina e actina foram extraídas e purificadas do músculo peitoral de galinha como descrito por Pardee e Spudich (1982) e Reinach e colaboradores (1982). A α-tropomiosina foi extraída e purificada de músculo cardíaco de galinha como descrito por Smille (1982).

3.17 Quantificação da concentração de proteína

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

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

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

3.18.1 Amostra para gel de Uréia

A cada amostra, adicionar uréia sólida para 6M final. Adicionar tampão de corrida 6x uréia gel e solução de 8M uréia para manter a concentração final da amostra em 6 M uréia.

3.18.2 Gel de uréia

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

3.19 Reconstituição do complexo troponina

As troponinas TnC, TnI e TnT recombinantes são reunidas em quantidades equimolares em 4,6 M uréia, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M KCl, 0,5 mM CaCl₂, 10mM β-mercaptoetanol e 0,01% NaN₃ e dialisadas contra 4,6 M uréia, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 M KCl, 50 μM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol e 0,01% NaN₃. As concentrações de KCl e uréia são então reduzidas por passos: a) dialisa contra mesmo tampão anterior mas com 2 M uréia; b) dialisa contra 20 mM imidazol pH 7,0, 1 M KCl, 50 μM CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol e 0,01% NaN₃; c) dialisa contra tampão anterior mas com 100 mM KCl; d) dialisa contra 20mM imidazol pH 7,0, 6,5mM KCl, 10mM β-mercaptoetanol e 0,01% NaN₃. Estocar a -70°C.

3.19.1 Análise do complexo troponina por FPLC

A análise da reconstituição do complexo troponina foi feita em coluna de FPLC. Amostras de 200 μl dos complexos troponina foram aplicadas em coluna de sephadex HB75 10/30 equilibrada com 100 mM KCl, 20mM Imidazol pH 7,0, 3,5 mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoetanol e 50 μM CaCl₂ na análise na presença de cálcio, ou 5 mM EDTA na análise na ausência de cálcio, em fluxo de 0,5ml/min. Amostras dos picos de eluição dos complexos foram posteriormente fracionadas em gel de SDS-PAGE.

3.20 Inibição da atividade Mg²⁺ATPásica

A atividade Mg²⁺ATPásica da actomiosina é medida como descrito por Heinonen e Lahti (1981), para quantificar o fosfato inorgânico Pi liberado pela reação. As condições estabelecidas para o ensaio são: 4 μM de F-actina, 1,15 μM tropomiosina, 0,2 μM miosina e troponina I de 0,53 a 7,68 μM em 20 mM imidazol pH 7,0,

50 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 1,0 mM DTT e 2 mM ATP; em volume final de 200 µl. Pré-incuba por 10 min., adiciona-se ATP e incuba por 25 min a 25°C.

3.21 Liberação da inibição da Mg²⁺ATPase por troponina C

A recuperação da atividade Mg²⁺ATPásica da actomiosina é medida pela quantidade de fosfato inorgânico liberado pela ATPase como descrito por Heinonen e Lahti (1981). As condições de ensaio são: EGTA, 4 µM de F-actina, 1,15 µM tropomiosina, 0,2 µM miosina, 4,0 µM troponina I e 0-8 µM troponina C em 20 mM imidazol pH 7,0, 60 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 1,0 mM DTT e 2 mM ATP em volume final de 200 µl. Pré-incuba por 10 min., adiciona-se ATP e incuba por 25 min a 25°C.; Ca²⁺, 4µM de F-actina, 1,15µM tropomiosina, 0,2µM miosina, 4,0µM troponina I e 0-8 µM troponina C em 20 mM imidazol pH 7,0, 60 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 0,5 mM EGTA, 1 mM DTT e 2 mM ATP em volume final de 200 µl. Pré-incuba por 10 min., adiciona-se ATP e incuba por 25 min a 25°C.

3.22 Regulação por cálcio da atividade Mg²⁺ATPásica

A regulação da atividade Mg²⁺ATPásica da actomiosina é medida pela quantidade de fosfato inorgânico liberado pela ATPase como descrito por Heinonen e Lahti (1981). As condições de ensaio são: EGTA, 4 µM de F-actina, 0,57 µM tropomiosina, 0,2 µM miosina e 0,57 µM troponina em 20 mM imidazol pH 7,0, 60 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 1,0 mM DTT e 2 mM ATP adicionando-se CaCl₂ para obter o pCa desejado em volume final de 200 µl. Para determinar a quantidade de cálcio a ser adicionado, assumimos que a constante de dissociação do EGTA é 1,9.10⁻⁷ M e calculamos a quantidade cálcionecessária para obtenção do pCa desejado. Pré-incuba por 10

min., adiciona-se ATP e incuba por 25 min a 25°C.

3.23 Marcação da troponinas I mutantes com N-Etil(2,3-¹⁴C)maleimida

Adiciona-se DTT para uma concentração final de 10mM em solução contendo troponina I 100 μ M em 25 mM Tris-HCl pH 7,0; 500 mM KCl; 5 mM β -mercaptoetanol. Incuba por 1 hora a 37°C. Remove-se o DTT passando a amostra em uma coluna de Sepharose G-25 equilibrada com o mesmo tampão sem DTT ou β -mercaptoetanol. Adiciona-se etil-maleimida para uma concentração final de 3 vezes superior à concentração de troponina I (mol/mol). Incuba-se por 1 hora a temperatura ambiente. Remove-se o excesso de N-etil(¹⁴C)maleimida passando a amostra em coluna de sepharose G-25 equilibrada com o tampão anterior. Cada amostra de 200 μ l utilizou uma coluna feita em seringa de 1 ml e centrifugada 3000 rpm por 4 min em centrífuga clínica (Heald e Hitchcock-DeGregori, 1988; Monteiro et al., 1994). A incorporação do marcador à TnI é de 1,3 a 1,6 mol/mol, com atividade específica entre 7 e 9mCi/mmol.

3.24 Ligação da troponina I ao filamento de actina

Adiciona-se troponina I marcada e não marcada* para concentrações finais de 0,71 a 20 μ M em solução contendo 20 μ M de actina e 5,71 μ M de tropomiosina em 20 mM Imidazol pH 7,0; 200 mM NaCl; 25 mM β -mercaptoetanol; 2,5 mM MgCl₂; para volume final de 300 μ l. Até a concentração de 2,86 μ M de troponina I, utilizamos apenas TnI marcada, nas demais concentrações adicionamos TnI marcada e não marcada nas seguintes proporções: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 e 1:6. Incuba-se por 10 min a temperatura ambiente. Recolhe-se duas amostras de 50 μ l. Ultracentrifuga-se por 10min a 85.000rpm

(rotor TLA 120.1; Beckman Optima) e 40°C. Recolhe-se três amostra de 50 μ l. Adiciona-se as amostras a 1 ml de líquido de cintilação miscível (sardi). A diferença entre as contagens de antes e de depois da ultracentrifugação, determinam as concentrações de troponina I ligada à actina-tropomiosina (modificado de Potter e Gergely, 1974).

* Experimentos de ligação realizados apenas com TnI marcada apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com as misturas de TnI marcada e não marcada, indicando que o procedimento de marcação não interfere na ligação da troponina I ao filamento de actina (resultados não apresentados).

3.25 Análise dos experimentos de ligação por Scatchard plots

Os resultados dos experimentos de ligação da troponina I com a actina-tropomiosina e só actina, foram analisados em scatchard plots segundo o modelo de ligação de pequenas moléculas a homopolímeros proposto por McGhee e Von Hippel (1974) e Zasedatelev e colaboradores (1971).

Este modelo descreve a ligação de uma molécula a um número de monômeros em um polímero. É um modelo bastante geral que assume ligação cooperativa entre o ligante e seu vizinho em uma única polaridade, sendo desprezada a influência de ligações isoladas ao longo do polímero. É descrito pela equação abaixo:

$$\frac{V}{L} = k(1-nv) \left[\frac{(2w+1)(1-nv) + v - R}{2(w-1)(1-nv)} \right]^{n-1} \left[\frac{1 - (n+1)v + R}{2(1-nv)} \right]$$

$$R = \sqrt{[1 - (n+1)v]^2 + 4wv(1-nv)}$$

Onde v concentração de proteína ligada dividida pela concentração do polímero, L a concentração de proteína livre, k a constante de associação da ligação, w o fator de cooperatividade e wk constante de associação da proteína pelo sítio vizinho a um sítio já ocupado por outra molécula da proteína. Quando não houver cooperatividade na ligação $w=1$ e a equação anterior reduz-se à equação abaixo:

$$\frac{V}{L} = k(1-nv) \left[\frac{1-nv}{1-(n-1)v} \right]^{n-1}$$

O ajuste dos parâmetros da equação aos resultados experimentais foi feita com o programa SigmaPlot da Jandel Scientific capaz de executar regressão não linear por mínimos quadrados

4 RESULTADOS

4.1 Transferência do inserto TnI de pET-R18 para M13mp18

Antes do início da construção dos mutantes de troponina I na região do peptídeo inibitório, foi necessário construir um vetor M13 com o inserto do cDNA da troponina I para utilização do método descrito por (Kunkel et al., 1987) para a produção de mutações sítio-dirigidas. Este procedimento foi necessário uma vez que o vetor M13 originalmente construído com o inserto de cDNA da troponina I M13-R18 (Quaggio et al., 1993), é um derivado do vetor M13 K11 RX (Waye et al., 1985). Estes vetores possuem dois codons ambar, o que os torna viáveis somente em cepas que complementem a mutação (Carter, 1987). A cepa utilizada no método de (Kunkel et al., 1987), *E.coli* CJ236, não complementa mutações ambar e desta forma impede a propagação de vetores que as possuam. Portanto foi necessário construir um novo vetor M13 com o inserto TnI que não possua codons ambar (Figura 6).

Na construção do novo vetor M13 utilizamos o vetor de expressão pET-R18 (Quaggio et al., 1993) e o vetor M13mp18. A construção foi feita digerindo-se o vetor pET-R18 com Xba I/Bam HI que libera o fragmento TnI, que foi subclonado no vetor M13mp18 digerido com as mesmas enzimas. O produto da subclonagem foi utilizado na transformação de *E.coli* JM101 que foi crescida na presença de X-gal e IPTG para seleção da incorporação do inserto. Com os clones positivos (placas brancas), foram feitas mini-preparações de RFs. Estes RFs foram digeridos com as mesmas enzimas, Xba I/Bam HI, para seleção da subclonagem do inserto TnI. Foi selecionado o clone M13-R75, sendo feita uma larga escala de RF para preservar a construção (figura 6).

Figura 6: Transferência do inserto TnI do vetor pET-R18 para o vetor M13mp18. O vetor pET-R18 foi digerido com Xba I e BamH I liberando o inserto TnI, que foi subclonado no vetor M13mp18 digerido com as mesmas enzimas dado origem ao vetor M13-R75. T7 = promotor da T7 RNA polimerase; ter= terminador de transcrição da T7 RNA polimerase; TnI = cDNA da troponina I; ORI = origem de replicação; Ap = gene de resistência à ampicilina; TC = gene de resistência à tetraciclina; Rop = interação com a RNAase I ; I a IX = genes do fago M13; Lac Z = gene truncado da β -galactosidase; ori, Plus e Minus = origem de replicação do fago M13.

4.2 Mutações sítio-dirigidas: K105E, F106Y, R113E E V157*

O vetor M13-R75 foi inoculado em uma cultura de *E.coli* CJ236 e utilizando para a produção de ssDNA contendo uracil incorporado como descrito por (Kunkel et al., 1987). Este ssDNA do vetor M13-R75, contendo uracil, foi então utilizado como fita molde para a produção dos mutantes sítio-dirigidos de troponina I.

Figura 7: Oligonucleotídeos utilizados na construção dos mutantes sítio dirigidos de troponina I. Foram construídos três mutantes diferentes na região do peptídeo inibitório e um no C-Terminal da troponina I.

Os oligonucleotídeos mutagênicos KE-105, FY-106, RE-113 e V-157 (figura 7) foram hibridizados, estendidos e ligados como descrito por (Zoller e Smith, 1982; Carter, 1987). Os produtos da mutagêneses foram utilizados na transformação de *E.coli* JM101 e das placas de vírus obtidas foram preparados ssDNAs para seleção dos mutantes. Os clones foram selecionados por seqüenciamento, sendo obtidos os clones M13-R91 (mutante R113E), M13-R100 (mutante F106Y), M13-R131 (mutante V157*) e M13-R154 (mutante K105E), que foram totalmente seqüenciados confirmando as seqüências esperadas. Com todos os mutantes definidos foram então preparadas largas escalas de RFs dos vetores mutantes.

4.3 Subclonagem dos insertos TnIs mutantes no vetor pET

Para a construção dos vetores de expressão das troponinas I mutantes, os insertos TnIs mutantes liberados pela digestão Nde I/Bam HI dos vetores M13 foram subclonados em vetores pET-3a (Studier et al., 1990) digeridos com as mesmas enzimas. O DNA obtido com a subclonagem foi usado na transformação de *E.coli* HMS174. Com os clones positivos (resistentes à ampicilina) foram feitas mini-preparações de DNA. Os plasmídeos foram então digeridos com Nde I/Bam H para seleção dos clones que possuíam os insertos TnIs mutante. Foram selecionados os clones pET-R91.4 (mutante R113E), pET-R100.1 (mutante F106Y), pET-R131.2 (mutante V157*) e pET-R154.2 (mutante K105E). Foram preparadas largas escalas de plasmídeos dos vetores de expressão das troponinas I mutantes. Estes plasmídeos foram seqüenciados, confirmando novamente as seqüências esperadas (figura 8).

Observação: A caracterização do mutante V157* não consta desta tese e está descrita no trabalho de Farah e colaboradores (1994).

Figura 8: Transferência do insertos TnIs mutantes dos vetores M13-R# para o vetor de expressão pET3a. Os vetores M13 que continham os insertos das TnIs mutantes foram digeridos com Nde I/BamH I. Os insertos liberados foram subclonados no vetor de expressão pET-3a digerido com as mesmas enzimas dando origem aos vetores de expressão da troponinas I recombinantes pET-R#. T7 = promotor da T7 RNA polimerase; ter= terminador de transcrição da T7 RNA polimerase; TnI = cDNA da troponina I; ORI = origem de replicação; Ap = gene de resistência à ampicilina; TC = gene de resistência à tetraciclina; Rop = interação com a RNAase I; I a IX = genes do fago M13; Lac Z = gene truncado da β -galactosidase; ori, Plus e Minus = origem de replicação do fago M13.

4.4 Expressão e purificação dos mutantes de troponina I

Os vetores de expressão contendo os insertos de TnIs mutantes foram utilizados na transformação de *E.coli* BL21(DE3) pLysS, cepa de expressão do sistema pET (Studier et al., 1990). Com os clones positivos (resistentes à ampicilina e a cloranfenicol) foram feitas mini-preparações de proteína, sendo obtidas expressões das TnIs mutantes em níveis compatíveis com os já obtidos para TnI selvagem (figura 9).

Figura 9: Purificação da TnI recombinante. A. Gel 12% SDS-PAGE; (1) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pLys S não induzida, (2) Extrato total de *E.coli* BL21(DE3) pLys S induzida, (3) sobrenadante da lise com "French Press", (4) Precipitado da lise com "French Press", (5) Eluido da coluna de CM-Sepharose Fast Flow (gradiente 0-300 mM NaCl) e (M) Marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 KDa. B. Gel 15% SDS-PAGE; troponinas I recombinantes purificadas: WT, TnI selvagem e as mutantes de TnI: K105E, F106Y e R113E; (M) Marcador de peso molecular: 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 KDa.

Largas escalas das troponinas I mutantes foram preparadas e purificadas. Todas as proteínas apresentaram o mesmo comportamento durante o processo de purificação não diferindo do comportamento apresentado pela troponina I recombinante selvagem. No quadro sinótico abaixo sumariizamos o processo de preparação das proteínas recombinantes (figura 10).

Figura 10: Quadro sinótico do método de purificação das TnIs recombinantes com as modificações introduzidas.

4.5 Caracterização dos mutantes de troponina I

Obtidas as troponinas I recombinantes mutantes purificadas, passamos então aos ensaios de caracterização para definir as

alterações no comportamento da proteínas associadas às mutações introduzidas.

4.5.1 Formação dos complexos TnC/TnIs mutantes

Uma das propriedades mais características da TnI é sua alta afinidade pela TnC. Para verificar se as mutações introduzidas alteravam esta característica, procedemos ao ensaio de formação do complexo TnC/TnI utilizando as mutantes. Na reconstituição dos complexos utilizamos além da TnC selvagem as mutantes nos sítios de ligação de cálcio: D30A, D66A, D106A e D142A, descritas em (Farah et al., 1994).

Com quantidades equimolares das TnIs mutantes recombinantes e TNCs recombinantes mutantes produzidas em nosso laboratório, promovemos a formação dos complexos. Verificamos através de geis de 6M uréia que todas mutantes de troponina I formam complexos bem definidos com a TnC selvagem e com as mutantes dos sítios de baixa afinidade por cálcio, D30A e D66A, como descrito por (Head e Perry, 1974) (figura 11). Já com as mutantes dos sítios de alta afinidade por cálcio, D106A e D142, também ocorre a formação de complexos. Porém estes complexos não apresentam migração idêntica a TnI selvagem nos geis de 6M uréia, principalmente o complexo com a mutante R113E (figura 11). Não acreditamos que este resultado indique diferença de afinidade das mutantes de TnI por estas mutantes de TnC, uma vez que se observarmos as bandas de TnC livre nas canaletas dos complexos na presença de cálcio, notaremos que são todas semelhantes. Como as quantidades dos complexos aplicados aos geis é a mesma, isto indica que os complexos foram formados mas

migram de forma anormal. A explicação para este resultado talvez esteja associada ao fato dos sítios de alta afinidade por cálcio da TnC serem sítios estruturais, que não apresentam estrutura definida sem a ligação de cálcio. Como as mutantes D106A tem o sítio III de ligação de cálcio inativado e D142A tem o sítio IV inativado, os complexos formados por estas proteínas com as TnIs mutantes devem deixar expostos segmentos das duas proteínas que não estão expostos no complexo formado com a TnC selvagem (ou mesmo as mutantes dos sítios I e II, D30A e D66A), o que provocaria a migração anormal destes complexos.

Desta forma, concluímos que os complexos formados pelas TnIs mutantes e TnCs são estáveis na presença de cálcio em 6 M uréia, desfazendo-se quando o quelante EDTA é adicionado. Podemos concluir que as mutações introduzidas na troponina I não bloquearam a interação entre a TnC e TnI, mesmo quando a troponina C empregada na formação do complexo tem um de seus sítios de ligação de cálcio inativado (figura 11). Entretanto não podemos excluir a possibilidade de que as mutações tenham introduzido pequenas alterações nas afinidades entre TnC e TnI não detectáveis através deste método.

Figura 11: Formação dos complexos das troponinas I selvagem e mutantes com a troponina C selvagem e as troponinas C mutantes nos sítios de ligação de cálcio. Geis de 6M uréia e 8% PAGE. Amostras com 5 mM cálcio (C) ou 5 mM EDTA (E). IC, complexo TnI/TnC e C, TnC livre. (Head e Perry, 1974). TnC wt: complexos formados pela TnC selvagem com a TnI selvagem e mutantes K105E, F106Y e R113E; TnC C, troponina C mais cálcio; TnC E, troponina C mais EDTA; WT C, complexo TnC com TnI selvagem mais cálcio; WT E, complexo TnC com TnI selvagem mais EDTA; K105E C, complexo TnC com mutante K105E mais cálcio; K105E E, complexo TnC com mutante K105E mais EDTA; F106Y C, complexo TnC com mutante F106Y mais cálcio; F106Y E, complexo TnC com mutante F106Y mais EDTA; R113E C, complexo TnC com mutante R113E mais cálcio; R113E E, complexo TnC com mutante R113E mais EDTA. D30A: complexos TnC D30A com as TnIs selvagem e mutantes. D66A: complexos TnC D66A com TnIs selvagem e mutantes. D106A: complexos TnC D106A com TnIs selvagem e mutantes. D142A: complexos TnC D142A com TnIs selvagem e mutantes.

4.5.2 Inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da acto-miosina pelas TnIs mutantes

No segundo ensaio de caracterização das mutantes de troponina I, investigamos que tipo de alterações ocorreram na capacidade da proteína em inibir a Mg^{2+} ATPase da actomiosina na presença e ausência de tropomiosina. Os ensaios foram realizados segundo a padronização estabelecida em (Quaggio et al., 1993).

Figura 12: Ensaio de inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da acto-miosina pela troponina I recombinante selvagem e pelas TnIs mutantes. Inibição da Mg^{2+} ATPase pelas TnIs: • troponina I selvagem, ▽ mutante K105E, □ mutante F106Y e △ mutante R113E. **A** na presença de tropomiosina; **B** na ausência de tropomiosina. Os pontos representam a média de três experimentos independentes; a atividade ATPásica é expressa em porcentagem da atividade da actomiosina na ausência de TnI.

Verificamos que nos ensaios na presença de tropomiosina (figura 12, A), os mutantes de troponina I K105E e R113E têm suas

capacidades de inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina diminuídas, sendo necessário $2\mu M$ de proteína para atingir 50% de inibição enquanto que para obter o mesmo nível de inibição a TnI selvagem necessita de $1\mu M$. Já o mutante F106Y comporta-se como a troponina I selvagem, (figura 12,A).

Nos ensaios de inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina na ausência de tropomiosina, o comportamento dos mutantes K105E e F106Y foi semelhante ao da troponina I recombinante selvagem, todos necessitando de aproximadamente $3\mu M$ para atingir 50% de inibição (figura 12,B). Contudo a mutante R113E não é capaz de inibir a Mg^{2+} ATPase na ausência de tropomiosina (figura 12,B) apresentando apenas uma pequena inibição em concentrações altas de proteína. Também fica evidente nestes experimentos, a importância da interação com a tropomiosina para a inibição da ATPase. Os resultados obtidos na ausência de tropomiosina são menos reprodutíveis (erros maiores) do que os na presença de tropomiosina, indicando que a interação da TnI com o filamento de actina sem tropomiosina é menos específica.

Estes resultados demonstram a importância da carga nas posições 105 e 113 para a atividade inibitória da troponina I, pois a substituição de um aminoácido básico por um ácido alterou o padrão de inibição das mutantes quando comparadas à TnI selvagem na presença de tropomiosina. Na ausência de tropomiosina a mutante K105 apresentou um comportamento semelhante à TnI selvagem, mas a mutante R113E não foi capaz de inibir, indicando que as mutações introduzidas estão atuando em pontos diferentes do mecanismo de inibição (vide discussão).

Quanto a mutação F106Y, os resultados obtidos demonstram que a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina, ou seja, um aminoácido hidrofóbico por um polar não interfere na ação inibitória do mutante comparada à selvagem tanto na ausência quanto na presença de tropomiosina.

4.5.3 Liberação da inibição da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pela troponina C

Neste ensaio analisamos o comportamento da ação inibitória das proteínas na presença de concentrações crescentes de troponina C, na ausência (EGTA) e presença de cálcio (Ca^{2+}). Estes ensaios seguiram as padronizações estabelecidas em (Farah et al., 1994).

Figura 13: Ensaio de liberação da inibição pela troponina I da atividade Mg^{2+} ATPásica da acto-miosina pela adição de troponina C. Na ausência de cálcio (símbolos cheios) e na presença de cálcio (símbolos vazados). ○ troponina I selvagem, ▽ mutante K105E, □ mutante F106Y e △ mutante R113E. Os pontos representam a média de três experimentos independentes; a atividade ATPásica é expressa em porcentagem da atividade da actomiosina na ausência de TnI e TnC.

Nos ensaios com a mutante F106Y na ausência e presença de cálcio, verificamos que ela comporta-se de modo semelhante à TnI selvagem. Há a recuperação de aproximadamente 50% da atividade Mg^{2+} ATPásica quando adicionamos TnC ausência de cálcio para F106Y enquanto a selvagem tem uma recuperação de 40%. Já no ensaio na presença de cálcio, o perfil das curvas de recuperação de atividade contra adição de TnC de F106Y e da selvagem é igual, havendo uma recuperação de 100% na atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina com a adição de TnC. Nos dois ensaios o máximo de recuperação da atividade ATPásica foi atingido com a proporção molar TnC:TnI de 1:1 (figura 13,A).

Quando comparadas, as mutantes K105E e R113E apresentaram comportamento semelhantes, mas claramente diferentes da troponina I selvagem (figura 13,B). Nos ensaios de recuperação da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina na ausência de cálcio elas apresentaram uma recuperação de mais de 70% com a adição de troponina C, enquanto na TnI selvagem a recuperação não ultrapassa 40%. Nos ensaios na presença de cálcio a recuperação também é de 100% de atividade Mg^{2+} ATPásica como o da selvagem, porém, quando analisamos o perfil das curvas de recuperação das mutantes K105E e R113E, elas apresentam perfis diferente da TnI selvagem, necessitando de concentrações menores de troponina C para a recuperação da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina. Nestes ensaios o máximo de recuperação da atividade ATPásica foi atingido na proporção 1:2 de TnC:TnI (figura 13,B).

Estes resultados indicam que as mutações nos resíduos 105 e 113 diminuíram a afinidade das TnIs pela actina-tropomiosina, uma vez que concentrações mais baixas de TnC são capazes de remover a inibição. Resultado compatível com os resultados do ensaio anterior.

4.5.4 Formação do complexo troponina: TnC, TnT e TnIs mutantes

Reconstituímos o complexo troponina com TnC recombinante, TnT recombinante produzidas em nosso laboratório e as troponinas I selvagem e mutantes com o objetivo de verificar se os mutantes são capazes de formar complexos ternários estáveis. Para tanto, combinamos quantidades equimolares de cada uma das sub-unidades na presença de 6 M uréia. As soluções são então dialisadas, reconstituindo os complexos.

Para verificar se o complexo foi reconstituído, analisamos as amostras das troponinas em FPLC, na presença e na ausência de cálcio. Verificamos que todos os complexos contendo as mutantes de TnI foram reconstituídos, sendo eluídos em pico único da coluna de FPLC (figura 14).

Figura 14: Eluição da coluna de FPLC dos complexos troponina reconstituídos com a TnI selvagem e as TnIs mutantes. As amostras dos complexos troponina reconstituídos com TnC, TnT e as diferentes TnIs: Tn wt, TnI selvagem; K105E, TnI K105E; F106Y, TnI F106Y; R113E, TnI R113E, foram eluídas na presença de $5\mu\text{M CaCl}_2$ (A) ou de 5mM EDTA (B). Nas duas condições todas as amostras dos complexos troponina eluíram em picos únicos. (C) Gel de 15% SDS-PAGE com as amostras dos picos de eluição da coluna de FPLC na presença de CaCl_2 ou de EDTA. M, marcador de peso molecular 66, 45, 36, 29, 24, 20 e 14 kDa.

4.5.5 Regulação da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pelos complexos troponina contendo TnIs mutantes

Após a reconstituição do complexo troponina (TnC, TnI e TnT) com as troponinas I mutantes, os complexos foram então testados quanto a sua capacidade de regular a Mg^{2+} ATPase da actomiosina de modo cálcio dependente como descrito em (Farah et al., 1994).

Todas os mutantes se mostraram capazes, quando reconstituídas no complexo troponina, de regular a Mg^{2+} ATPase da actomiosina de modo cálcio dependente, mas nenhuma apresentou comportamento idêntico à troponina I recombinante selvagem (figura 15).

O mutante K105E apresenta um perfil de regulação com o mesmo perfil da proteína selvagem, mas este perfil está deslocado apresentando uma atividade Mg^{2+} ATPásica aproximadamente 20% superior à apresentada pela selvagem em todos os pCas (figura 15).

Figura 15: Ensaio de regulação por cálcio da atividade Mg^{2+} ATPásica da actomiosina pela troponina. Regulação da Mg^{2+} ATPase pela troponina com: • troponina I selvagem, ▽ mutante K105E, □ mutante F106Y e △ mutante R113E. Os pontos representam a média de três experimentos independentes; a atividade ATPásica é expressa em porcentagem da atividade da actomiosina na ausência de troponina.

No caso do mutante F106Y, o perfil da regulação em pCas baixos coincide com o apresentado pela TnI selvagem, mas na medida que a concentração de cálcio aumenta há um aumento de atividade Mg^{2+} ATPásica maior no mutante que na selvagem, ou seja, o mutante necessita de concentrações menores de cálcio para uma mesma atividade Mg^{2+} ATPásica, havendo um deslocamento para a esquerda no perfil de regulação do mutante em relação à selvagem a partir de pCa 7 (figura 15).

Já o comportamento da mutante R113E difere das outras duas mutantes e também não é idêntico à TnI selvagem. Ela apresenta um perfil deslocado em relação à selvagem mas não o mesmo apresentado pelo mutante K105E. Em baixos pCas a diferença nas atividades ATPásica entre R113E e a TnI selvagem é em torno de 5%, mas na medida em que o pCa aumenta a diferença também aumenta chegando em pCa 4, a 25%, enquanto que com K105E o deslocamento é de 20% em relação a TnI selvagem todos os pCas.

Apesar das diferenças que encontramos entre todas as mutantes quando comparadas à TnI selvagem, todas são capazes de regular a inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina. Isto fica demonstrado quando analisamos as curvas de regulação e verificamos que todas regulam entre pCa 5 e pCa 7, apresentando 50% da atividade ATPásica máxima em pCa 6 como a TnI selvagem, indicando que o mecanismo de regulação não foi alterado pela mutação na troponina I, mas só o mecanismo de inibição: as mutantes, K105E e R113E, são incapazes de inibir como a TnI selvagem em todos os pCas. Assim, provavelmente, as diferenças que observamos na regulação da atividade Mg^{2+} ATPásica pelas troponinas reconstituídas

com as TnIs mutantes, se devem especificamente à interação da TnI com a actina-tropomiosina no mecanismo de inibição.

4.5.6 Ensaio de ligação da troponina I ao filamento de actina

No último ensaio de caracterização das troponinas I mutantes, foi verificado o comportamento das proteínas em experimentos de ligação ao filamento de actina, na presença e ausência de tropomiosina.

Inicialmente as TnIs mutantes foram marcadas com N-(C¹⁴)etil maleimida , depois foram feitas soluções com proporções de concentração entre TnI:Tmy:actina variando de 0,25:2:7 a 7:2:7. Estas soluções foram então ultracen-trifugadas, sendo determinada a fração de troponina I ligada à actina-Tmy, pela diferença de contagem de cpms do sobrenadante da solução antes e depois da centrifugação.

Os resultados que obtivemos nos experimentos de ligação (figura 16, A), mostram que a mutante F106Y liga-se ao filamento de actina-tropomiosina como a TnI selvagem, com uma curva de ligação semelhante à da TnI selvagem. As outras duas mutantes, K105E e R113E, ligam-se menos ao filamento de actina-tropomiosina que a TnI selvagem, apresentando curvas de ligação não só diferentes da TnI selvagem, mas diferentes entre si, reforçando a idéia de que as mutações atingiram pontos diferentes da interação TnI-actina-tropomiosina (figura 16, A).

Estes resultados quando confrontados com os outros dados obtidos nos experimentos de inibição da Mg²⁺ATPase da actomiosina,

estabelecem uma relação direta entre ligação da troponina I ao filamento de actina-tropomiosina com o mecanismo de inibição. A mutante F106Y liga-se ao filamento de actina-tropomiosina como a TnI selvagem e inibe a ATPase como a TnI selvagem. Já as mutantes K105E e R113E, ligam-se menos ao filamento de actina-tropomiosina que a TnI selvagem e também inibem menos que a selvagem.

Figura 16: Ligação das diferentes troponinas I à actina-tropomiosina. • troponina I selvagem, ▽ mutante K105E, □ mutante F106Y e △ mutante R113E. **A** ligação das TnIs mutantes marcadas com C^{14} à actina-tropomiosina, os pontos representam médias de três experimentos independentes. **B** análise por "Scatchard plot" dos resultados dos experimentos de ligação.

Analizamos então estes resultados de ligação através de Scatchard plots (figura 16, B), para estabelecer os parâmetros estequiométricos e identificar que tipo de alterações foram introduzidas pelas mutações no comportamento da troponina I. Na análise por scatchard plots utilizamos o modelo de ligação de

proteínas a homopolímeros descrito nos trabalhos de Zasedatelev e colaboradores (1971) e de McGhee e von Hippel (1974), que estabelecem quatro parâmetros de ligação: n número de monômeros do polímero que fazem parte do sítio de ligação, k a constante de associação da ligação da proteína ao polímero, w fator de cooperatividade da ligação e wk constante de associação da proteína pelo sítio vizinho a um sítio já ocupado por outra molécula da proteína. Quando não existe cooperatividade na ligação o fator w é igual a 1.

Os resultados dos ajustes dos dados experimentais de ligação da troponina I ao filamento de actina-tropomiosina aos parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 2. Analisando estes resultados verificamos que a troponina I selvagem apresenta uma curva de scatchard plot com a forma côncava o que indica, pelo modelo de ligação de Zasedatelev e colaboradores (1971) e de McGhee e von Hippel (1974), que a ligação da TnI ao filamento de actina-tropomiosina é cooperativa, ligando-se a aproximadamente 6 monômeros de actina. Estas características da troponina I ainda não haviam sido descritas quantitativamente, somente existiam dados qualitativos da estequiometria de ligação que determinava uma proporção de 1 TnI ligada para aproximadamente 7 actinas (Potter e Gergely, 1974). Assim sendo, estes resultados indicam que a interação da TnI com a tropomiosina e filamento de actina estabelece um único sítio de ligação para cada seis monômeros de actina. E portanto, quando a TnI liga-se a este sítio impede a interação dos seis monômeros de actina com a miosina, inibindo a ATPase.

Quando analisamos os parâmetros obtidos para as mutantes de TnI, verificamos que os parâmetros da mutante F106Y são muito próximos aos obtidos para a TnI selvagem (tabela 2), resultado compatível com todos dados que já obtivemos para a mutante, indicando que F106Y não difere da troponina I selvagem. Já os resultados obtidos para K105E e R113E indicam que as mutações introduzidas provocaram o desaparecimento da ligação cooperativa à actina-tropomiosina ($w = 1$), as mutantes não apresentam curvas de scatchard plot côncavas como a TnI selvagem e a mutante F106Y. Também houve uma redução na constante de associação das duas mutantes à actina-tropomiosina e do número de monômeros de actina cobertos pela ligação, K105E com n igual a 1,5 e R113E com n igual a 2,9, resultados que interpretamos como a diminuição da especificidade da ligação das mutantes à actina-tropomiosina, ou seja, as mutações interferiram na capacidade das mutantes em reconhecer o sítio de ligação (tabela 2).

Repetimos os ensaios de ligação sem a adição de tropomiosina, para verificar como as mutações interferiam na ligação das mutantes ao filamento de actina. Os experimentos foram feitos de modo análogo aos experimentos com adição de tropomiosina, ou seja, soluções contendo proporções de concentração de TnI:actina variando de 0,25:7 a 7:7, foram ultracentrifugadas e determinou-se a fração de troponina I ligada pela diferença de contagem de cpms no sobrenadante antes e depois da centrifugação (figura 17, A).

Neste experimento a troponina I selvagem liga-se a ao filamento de actina de modo mais instável que nos experimentos de ligação com tropomiosina. O experimento é menos reprodutível, como pode ser observados pelas barras de erros da curva de ligação (figura 17, A). O mesmo ocorre com os experimentos utilizando as

proteínas mutantes que apresentam um comportamento instável semelhante à troponina I selvagem.

As curvas de ligação de todas as mutantes são semelhantes a curva da TnI selvagem (figura 17, A), indicando não haver diferenças significativas entre a troponina I selvagem e as mutantes quando ligam-se ao filamento de actina sem tropomiosina.

Figura 17: Ensaio de ligação troponina I actina sem tropomiosina. • troponina I selvagem, ▽ mutante K105E, □ mutante F106Y e Δ mutante R113E. **A** ligação das TnIs mutantes marcadas com C^{14} à actina, os pontos representam médias de três experimentos independentes. **B** análise por scatchard plot dos resultados do experimento de ligação

Também ajustamos os dados dos experimentos de ligação sem tropomiosina ao modelo de interação proteína-homopolímero, obtendo os parâmetros apresentados na Tabela 2. Quando analisamos a curva de scatchard plot da troponina I selvagem, verificamos que a proteína não liga-se ao filamento de actina de modo cooperativo

($w = 1$) como nos experimentos na presença de tropomiosina, pois a curva não tem a forma côncava observada naqueles experimentos (figura 17, B). Sua constante de associação também é menor e o número de monômeros de actina cobertos pela ligação também diminui, passando de aproximadamente 6 monômeros na ligação na presença de tropomiosina para 2 na ausência (tabela 2). Estes resultados indicam que a TnI selvagem na ausência de tropomiosina liga-se à actina com menor afinidade e de modo menos específico, pois parece poder se ligar a todos os monômeros de actina. Estas características da troponina I, como as obtidas na ligação na presença de tropomiosina, ainda não haviam sido descritas de modo quantitativo, mas somente de forma qualitativa por Potter e Gergely (1974), que observaram uma diminuição na ligação da TnI à actina na ausência de tropomiosina.

Ao analisarmos as curvas e os parâmetros de ajuste ao modelo obtidos para as mutantes, verificamos que K105E e F106Y apresentam curvas e parâmetros muito próximos aos da troponina I selvagem (figura 17, B; tabela 2), o que indica que as duas mutantes não diferem da TnI selvagem quando ligam-se ao filamento de actina sem tropomiosina. Já R113E apesar de ter n semelhante ao da TnI selvagem apresenta uma constante de associação menor, indicando que R113E liga-se menos ao filamento de actina que a TnI selvagem na ausência de tropomiosina (tabela 2).

Estes resultados são compatíveis com os dados obtidos nos experimentos de inibição da Mg^{2+} ATPase da actomiosina na ausência de tropomiosina. Ou seja, as mutantes K105E e F106Y ligam-se ao filamento de actina sem tropomiosina e inibem a ATPase como a TnI

selvagem. Já a mutante R113E liga-se com menor afinidade ao filamento, contudo ela não inibe. Isto indica que o resíduo 113 é necessário a inibição da ATPase, porém sua falta não impede a mutante de se ligar ao filamento, apenas reduz a afinidade da ligação. Portanto podemos concluir que existe um outro ponto de interação da TnI com o filamento de actina além do resíduo 113. De qualquer forma podemos estabelecer uma relação direta entre a ligação da troponina I ao filamento de actina, com ou sem tropomiosina, e o mecanismo de inibição.

	+ tropomiosina				- tropomiosina			
	n	k ($10^3 M^{-1}$)	w	wk ($10^3 M^{-1}$)	n	k ($10^3 M^{-1}$)	w	wk ($10^3 M^{-1}$)
wt	5,6±0,2	17,6±1	7,6±1,9	133,8±34,3	2,1±0,8	9,2±0,9	1	9,2±0,9
k105E	1,5±0,2	14,4±0,6	1	14,4±0,6	3,4±0,6	10,6±0,8	1	10,6±0,8
F106Y	4,9±0,4	17,1±5	4,8±2,3	82,1±46,1	2,6±1,5	10,2±2	1	10,2±2
R113E	2,9±0,6	9,3±0,7	1	9,3±0,7	2,3±0,7	6,9±0,5	1	6,9±0,5

Tabela 2: Parâmetros da análise por Scatchard plot dos experimentos de ligação da troponina I ao filamento de actina. Os parâmetros foram obtidos pelo ajuste dos dados experimentais à equação do modelo de Zasedatelev e Gurskii (1971) e de McGhee e von Hippel (1974), descrita no item 3.25. n número de monômeros de actina cobertos pela ligação, k constante de associação, w fator de cooperatividade e wk constante de associação de um sítio vizinho a um sítio já ocupado.

Syska e colaboradores (1974) estabeleceram que o fragmento CN4 obtido a partir da digestão da troponina I com brometo cianogênio, era o segmento da proteína capaz de inibir a Mg^{2+} ATPase da actomiosina. A partir deste trabalho, a ação inibitória da troponina I passou a ser estudada através deste fragmento e de peptídeos sintéticos desta região em detrimento da proteína inteira (Cachia et al., 1983; Talbot e Hodges, 1981; Van Eyk e Hodges, 1988; Talbot e Hodges, 1981; Van Eyk et al., 1993; Grand et al., 1982; Dalgarno et al., 1982). A clonagem do gene da TnI e a expressão da proteína recombinante em bactéria (Quaggio et al., 1993; Sheng et al., 1992), viabilizou o estudo da proteína inteira através de mutações sítio-dirigidas. Nosso primeiro resultado com esta abordagem é o trabalho de Farah e colaboradores (1994), onde estudamos mutantes de deleção da troponina I, analisando o papel dos diferentes domínios da proteína no mecanismo de regulação.

Nesta tese estudamos o mecanismo de inibição da troponina I através de mutações sítio-dirigidas. Substituímos três resíduos na região do peptídeo inibitório e analisamos o efeito de cada substituição no comportamento da proteína mutante comparada à troponina I selvagem.

Analisamos o comportamento das troponinas I mutantes segundo parâmetros estabelecidos em nossos trabalhos anteriores (Quaggio et al., 1993; Farah et al., 1994). Além disso estabelecemos novos parâmetros para caracterizar a interação entre a troponina I selvagem e o filamento de actina, na presença e ausência de tropomiosina. Estes novos parâmetros associados aos anteriormente

definidos, nos permitiram estabelecer um modelo de interação entre a troponina I, a tropomiosina e o filamento de actina e sua relação com o mecanismo de inibição.

5.1 Troponina I

Potter e Gergely (1974) demonstraram de modo qualitativo que a troponina I liga-se ao filamento de actina, na presença de tropomiosina com uma estequiometria de aproximadamente uma TnI para sete monômeros de actina. Determinaram também que na ausência de tropomiosina está estequiometria aumentava. Em nossos ensaios determinamos de modo quantitativo a ligação da troponina I ao filamento de actina, na presença e ausência de tropomiosina. A partir destes ensaios foi possível não só determinar a estequiometria de ligação da TnI à actina, como também determinar algumas características desta interação ainda não descritas.

Encontramos uma estequiometria de uma TnI para aproximadamente seis monômeros de actina, na presença de tropomiosina. Na ausência de troponiosina, a estequiometria da ligação passou para uma TnI para dois monômeros de actina. Estes resultados quantitativos concordam com os apresentados por Potter e Gergely (1974). Estabelecemos também que a ligação da troponina I ao filamento de actina, na presença de tropomiosina, se faz de modo cooperativo e que na ausência de tropomiosina esta cooperatividade desaparece. Ou seja, a troponina I liga-se ao filamento de actina de modo diferente na presença ou ausência de tropomiosina, e esta diferença no modo de ligação é visível pela mudança na afinidade, cooperatividade e estequiometria da ligação (Figura 18).

Figura 18: Ligação da troponina I ao filamento de actina. A, na ausência de tropomiosina a TnI pode liga-se a todos os monômeros de actina. B, na presença de tropomiosina, a TnI liga-se ao sítio de inibição formado pela tropomiosina e filamento de actina, atuando sobre seis monômeros de actina.

Quando confrontamos os resultados dos experimentos de ligação e inibição da ATPase na presença de tropomiosina, verificamos que o máxima de inibição é atingido quando apenas uma troponina I esta ligada a seis monômeros de actina. Já na ausência de tropomiosina, o máximo de inibição é atingido somente quando existe uma TnI ligada para dois monômeros de actina. Esta diferença na estequiometria de inibição, demonstra a existência de uma interação entre a troponina I e a tropomiosina no mecanismo de inibição.

Sem tropomiosina a troponina I precisa ligar-se praticamente a todos os monômeros de actina para exercer o máximo de inibição. Ou seja, a inibição a ATPase da actomiosina é feita pela ligação de uma molécula de TnI ao sítio de inibição de cada um dos monômero de actina. Esta ligação é de baixa afinidade e não cooperativa, resultando em ligação e inibição sujeitas a flutuações, como podemos observar nos experimentos na ausência de tropomiosina.

A presença de tropomiosina organiza o mecanismo de inibição de forma diferente. Não é mais necessário que uma molécula de troponina I ligue-se a cada monômero de actina para haver a inibição. A inibição máxima é atingida quando existe uma TnI ligada para seis monômeros de actina. Este resultado indica que a presença de tropomiosina estabelece um único sítio de inibição para cada seis monômeros. A troponina I liga-se a este sítio com afinidade maior e de forma cooperativa. Nesta interação, a TnI age como um inibidor mais potente, não ocorrendo as flutuações que observamos nos ensaios na ausência de tropomiosina.

Estes resultados demonstram que a ação inibitória da troponina I sobre a Mg^{2+} ATPase da actomiosina é feita pela ligação da TnI ao sítio de inibição formado pela tropomiosina e o filamento de actina, atuando simultaneamente sobre seis monômeros. Esta ligação é específica e de alta afinidade, e influi na ligação da próxima molécula de TnI gerando a cooperatividade observada nas curvas dos experimentos de inibição e ligação na presença de tropomiosina.

A importância da interação tropomiosina troponina I no processo de inibição, já havia sido descrita pelo lado da tropomiosina por Eaton e colaboradores (1975). Neste trabalho foi analisada a interação da tropomiosina com o filamento de actina, concluindo-se que a adição da TnI aumentava a afinidade da tropomiosina pela actina e também a inibição. Em nosso trabalho confirmamos este resultado demonstrando quantitativamente, pela primeira vez, como se organiza esta interação do ponto de vista da troponina I.

5.2 Mutantes de troponina I

A análise do comportamento das mutantes de troponina I com substituições na região do peptídeo inibitório, nos forneceu novas informações sobre o domínio inibitório da proteína e como este domínio se organiza e interage com a tropomiosina e filamento de actina no mecanismo de inibição.

Já havíamos determinado com mutantes de deleção da TnI que a região delimitada pelo peptídeo inibitório (resíduos 105 a 114), é essencial à ação inibitória da troponina I sobre Mg^{2+} ATPase da actomiosina (Farah et al., 1994). Já a análise do comportamento das mutantes K105E e R113E demonstra que a região do peptídeo inibitório não só participa do mecanismo de inibição, mas também é o sítio de ligação da troponina I ao filamento de actina na presença de tropomiosina. As mutações provocaram a redução tanto da ação inibitória quanto da afinidade de ligação das duas mutantes quando comparadas à troponina I selvagem, ou seja, estabeleceram uma relação direta entre a ligação da troponina I à actina-tropomiosina e sua ação inibitória sobre a ATPase. Portanto,

podemos concluir que a ação inibitória da TnI é o resultado da ligação do domínio inibitório da proteína ao filamento de actina-tropomiosina.

As mutantes também nos permitiram identificar o papel dos resíduos substituídos no mecanismo de inibição. Apesar de inibirem a ATPase na presença de tropomiosina e serem removidas pela TnC de modo semelhante, as mutantes K105E e R113E não se comportam de modo semelhante nos demais ensaios. Estas diferenças indicam que cada substituição atingiu um ponto diferente do mecanismo de inibição.

O comportamento da mutante K105E nos permite uma interpretação direta. Ao analisarmos os resultados obtidos para a mutante K105E, verificamos que ela só apresenta comportamento diferente da troponina I selvagem nos ensaios na presença de tropomiosina. A partir destes dados postulamos que a substituição da lisina na posição 105 por um ácido glutâmico, prejudicou a interação da TnI especificamente com a tropomiosina. Porém a proteína ainda é capaz de inibir a ATPase, o que nos leva a concluir que a mutação não prejudicou o mecanismo de inibição diretamente.

Quando analisamos o comportamento da mutante R113E, percebemos que este é mais complexo. Ela tem comportamento semelhante à mutante K105E nos ensaios de inibição na presença de tropomiosina e é removida pela TnC também de forma semelhante, mas comporta-se de modo diferente nos ensaios de ligação na presença de tropomiosina. Ela liga-se com menor afinidade e apresenta uma curva de ligação diferente de K105E. Nos ensaios na ausência de

tropomiosina, ela liga-se a actina com uma afinidade um pouco menor que a da TnI selvagem, porém esta pequena diferença a torna incapaz de inibir a ATPase. Este conjunto de resultados da mutante R113E, nos levam a postular que pelo menos três diferentes fatores determinam o seu comportamento.

O primeiro fator é definido pela mutação propriamente dita. O resíduo de arginina da posição 113 quando substituído por um ácido glutâmico, prejudica a interação da TnI com os monômeros de actina. Esta substituição torna a proteína incapaz de inibir a ATPase da actomiosina na ausência de tropomiosina. Podemos concluir que provavelmente a interação do resíduo 113 com a actina, é parte do mecanismo de inibição.

O segundo fator é percebido na análise dos experimentos de ligação na ausência de tropomiosina. A mutante não é capaz de inibir a ATPase sem tropomiosina, apesar de ainda ligar-se à actina na ausência de tropomiosina. Este resultado nos leva a concluir, que existe pelo menos um outro ponto de interação entre a TnI e os monômeros de actina além do resíduo 113, que não influencia na capacidade inibitória.

O terceiro fator relaciona-se à interação da TnI com a tropomiosina. Na presença de tropomiosina, R113E passa a inibir a ATPase da actomiosina. Este resultado indica que a interação da mutante com a tropomiosina minimiza o efeito da mutação, permitindo que ela apresente ação inibitória. Mas esta interação não é suficientemente forte para fazer com que a mutante ligue-se ao filamento de actina como a TnI selvagem ou mesmo como a mutante

K105E. Desta forma, podemos concluir que a interação com a tropomiosina, permite que a molécula de TnI se posicione no sítio de inibição em uma interação de baixa afinidade, o que explica porque a mutante é capaz de inibir mas não de ligar na ausência de tropomiosina.

Outra questão importante definida pelos mutantes K105E e R113E, é que mesmo atuando em pontos distintos do mecanismo de inibição, os resíduos 105 e 113 são necessários à ligação cooperativa da troponina I ao filamento de actina-tropomiosina. A substituição de qualquer um dos dois resíduos por um ácido glutâmico, faz com que a cooperatividade de ligação da troponina I desapareça. Isto indica que é necessário que a troponina I interaja tanto com a actina quanto como a tropomiosina para haver cooperatividade na ligação, caso contrário, não havendo uma das interações a ligação não será cooperativa.

A terceira e última mutante que analisamos, F106Y, não difere em termos substanciais da troponina I selvagem. A substituição de um resíduo de fenilalanina na posição 106 por uma tirosina, não produziu nenhuma alteração significativa no comportamento da mutante comparado à TnI selvagem. Isto sugere que o resíduo 106 talvez não participe do mecanismo de inibição, apesar de pertencer à região do peptídeo inibitório. Esta conclusão é compatível com o modelo de estrutura do peptídeo inibitório proposto por Campbell e Sykes (1991). Este modelo não só se aplica ao resíduo 106, mas também é compatível com nossos resultados das outras duas mutantes. Os autores propõem que o peptídeo inibitório tem a estrutura de uma α -hélice anfifílica truncada pelas duas

prolinas centrais, com os resíduos hidrofóbicos formando um núcleo que interage com a TnC. O resíduo 106 faz parte deste núcleo hidrofóbico e, portanto, interagiria com a TnC. Os outros resíduos, 105 e 113, estendem suas cadeias laterais em sentido oposto à troponina C e interagiriam com a actina e tropomiosina.

As mutações também demonstraram que o complexo troponina pode ser dividido em dois domínios: inibitório e regulatório. Esta conclusão vem da análise dos resultados dos experimentos com o complexo troponina. Primeiramente, nenhuma das mutações interferiu na formação do complexo troponina, todas as mutantes reconstituíram complexos estáveis. Quando analisamos os experimentos de regulação da Mg^{2+} ATPase da actomiosina, verificamos que nenhuma das troponinas reconstituídas comporta-se como a TnI selvagem. Contudo, todas são a grosso modo capazes de regular a ATPase. As mutantes regulam a ATPase entre pCas 5 e 7 e apresentam 50% da atividade ATPásica máxima em pCa 6 tal qual a TnI selvagem, ou seja, se normalizarmos os experimentos de regulação, obteremos curvas iguais para todas as troponinas reconstituídas. Desta forma, as diferenças na atividade ATPásica que observamos em todos os pCas em relação a TnI selvagem, estão associadas ao mecanismo de inibição propriamente e não à regulação.

A análise das curvas de regulação dentro desta perspectiva, acrescenta outras informações sobre o comportamento individual das mutantes. Sabemos que as mutações de K105E e R113E, interferem em pontos distintos do mecanismo de inibição. Elas também produzem efeitos diferentes nas curvas de regulação. A regulação da troponina contendo K105E, apresenta-se deslocada no sentido

vertical (atividade ATPásica), sendo 20% maior que a TnI selvagem em todos os pCas. Este resultado indica que a alteração na interação entre K105E e a tropomiosina produzida pela mutação, não é minimizada pelos outros componentes do complexo troponina.

Já no caso da mutante R113E, o efeito da mutação sobre a interação com a actina é minimizado pelos outros componentes em baixos pCas. Há uma diferença de menos de 10% na atividade ATPásica da mutante comparada à TnI selvagem em pCa 8, diferença que chega a 25% em pCa 4. Associamos esta diferença entre os perfis de regulação das duas mutantes à interação do complexo troponina com a tropomiosina através da TnI. Assim, em pCas baixos a mutante R113E interage com a tropomiosina e apresenta atividade ATPásica com pequena diferença em relação à TnI selvagem. Na medida que o pCa é aumentado, a interação com a tropomiosina diminui pelo deslocamento da TnI pelos outros componentes do complexo troponina (Tao et al., 1990), resultando no aumento da diferença na atividade ATPásica em relação a TnI selvagem. O comportamento de R113E em altos pCas fica próximo do da mutante K105E que tem a interação com a tropomiosina prejudicada pela mutação. Desta forma, podemos concluir que a interação entre a troponina I e tropomiosina é essencial para o correto posicionamento da TnI no sítio de inibição.

5.3 Conclusão

A análise deste conjunto de resultados nos leva a propor um modelo para as interações entre a troponina I, tropomiosina e filamento de actina no mecanismo de inibição (figura 18).

Nós mapeamos duas interfaces diferentes de interação entre a TnI e o sítio de inibição. No modelo o sítio de inibição seria formado pela tropomiosina e pela actina. Estas interfaces definem como a troponina I se liga ao sítio e inibe a Mg^{2+} ATPase da actomiosina.

Figura 19: Modelo de interação entre troponina I, tropomiosina e filamento de actina. Os resíduos 105 e 113 da troponina I exercem papéis diferentes no mecanismo de inibição. O resíduo 105 interage com a tropomiosina dando especificidade ao sítio de ligação. O resíduo 113 interage com a actina, participando diretamente ao mecanismo de inibição. Os dois resíduos são necessários a ligação cooperativa e com alta afinidade da troponina I ao sítio de inibição.

5.3.1 Interface TnI-tropomiosina

A primeira interface é definida pelo resíduo 105 da troponina I. Este resíduo é envolvido no ancoramento da proteína ao sítio de inibição através da interação com a tropomiosina. O papel do resíduo 105 pode ser apreendido do comportamento da mutante K105E. O fato de K105E inibir a ATPase na ausência de tropomiosina como a TnI selvagem, demonstra que a mutante não perdeu a capacidade de inibir. No modelo propomos que a mutante K105E inibe menos a ATPase que a TnI selvagem na presença de tropomiosina porque ela não é capaz de reconhecer completamente o sítio de inibição como a TnI selvagem, ou seja, a mutação diminuiu a afinidade pelo sítio causando a diminuição da atividade inibitória. Propomos portanto que a mutação reduziu a atividade inibitória da proteína devido ao comprometimento da interação da TnI com a tropomiosina.

Os resultados com a mutante R113E confirmam esta hipótese. R113E não é capaz de inibir a ATPase na ausência de tropomiosina, mas na presença de tropomiosina ela inibe como K105E. No modelo isto aconteceria porque R113E é capaz de reconhecer parcialmente o sítio de inibição, já que seu resíduo 105 não foi alterado e interage como a tropomiosina. Desta forma, apesar de ter sua capacidade de inibição comprometida, R113E é capaz de ancorar-se ao sítio de inibição através da tropomiosina e posicionar-se corretamente, revertendo parcialmente o efeito deletério da mutação.

Concordam também com esta interpretação os resultados dos experimentos de regulação. O complexo troponina reconstituído com

a mutante K105E, apresenta uma curva de regulação deslocada em relação ao perfil da TnI selvagem de modo constante em todos os pCas. Isto significaria que a mutante K105E não é capaz de posicionar-se corretamente no sítio de inibição porque sua interação com a tropomiosina esta prejudicada, assim a mutante não é capaz de inibir a ATPase como a TnI selvagem em todos os pCas. Já a troponina reconstituída com a mutante R113E inibe de forma muito próxima da TnI selvagem em pCas baixos. Isto aconteceria porque a interação com a tropomiosina a posiciona no sítio de inibição e minimiza o efeito da mutação. Contudo, na medida em que o pCa aumenta, os outros componentes do complexo troponina (TnC e TnT), deslocam a mutante em relação ao sítio de inibição, o que faz com que diminua a interação com a tropomiosina, diminuindo também sua atividade inibitória.

5.3.2 Interface TnI-actina

A outra interface de interação é definida pelo resíduo 113 da troponina I. Este resíduo interagiria diretamente com o filamento de actina no processo de inibição. Isto pode ser percebido no comportamento da mutante R113E, que na ausência de tropomiosina é incapaz de inibir a ATPase. O resíduo 113 provavelmente não é o único resíduo da região que participa do processo de inibição, contudo o fato de R113E necessitar do ancoramento à tropomiosina para inibir, indica que o resíduo 113 é parte do mecanismo de inibição. Esta hipótese é também confirmada pelo experimento de ligação ao filamento de actina na ausência de tropomiosina. Neste experimento verificamos que apesar da mutação, R113E ainda liga-se ao filamento apresentando uma redução na afinidade. Desta forma, concluímos que a mutação afeta diretamente

a atividade inibitória da mutante e apenas interfere em sua capacidade de ligar-se ao filamento de actina.

As duas interfaces são necessárias ao funcionamento preciso do mecanismo de inibição, uma vez que mutações em qualquer das interfere na atividade inibitória da troponina I. Tanto a mutação no resíduo 105 como no 113, provoca a redução da afinidade da TnI pelo sítio de inibição, reduzindo a inibição da ATPase. As mutações também provocam o desaparecimento da ligação cooperativa da TnI ao filamento de actina-tropomiosina. Ou seja, a troponina I posiciona-se no sítio de inibição através da interação do resíduo 105 com a tropomiosina, que possibilita a interação do resíduo 113 com o filamento de actina resultando na inibição da ATPase. Concluimos portanto que existem duas interfaces de interação da troponina I com o filamento de actina-tropomiosina, que atuam conjuntamente para permitir a ligação da troponina I no filamento e a inibição da ATPase.

BIBLIOGRAFIA

Cachia, P.J., Sykes, B.D., and Hodges, R.S. (1983).

Calcium-dependent inhibitory region of troponin: a proton nuclear magnetic resonance study of the interaction between troponin C and the synthetic peptide N-acetyl [FPhe¹⁰⁶]TnI-(104-115) amide. *Biochemistry* 22, 4145-4152.

Campbell, A.P. and Sykes, B.D. (1991). Interaction of troponin I and troponin C. Use of the two-dimensional nuclear magnetic resonance transferred nuclear Overhauser effect to determine the structure of the inhibitory troponin I peptide when bound to skeletal troponin C. *J. Mol. Biol.* 222, 405-421.

Carter, P. (1987). Improved oligonucleotide-direct mutagenesis using M13 vectors. *Meth. Enzymol.* 154, 382-403.

Carter, P., Bedouelle, H., and Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors.. *Nucleic Acids Res.* 13, 4431-4443.

Chandra, M., McCubbin, W.D., Oikawa, K., Kay, C.M., and Smillie, L.B. (1994). Ca²⁺, Mg²⁺, and troponin I inhibitory peptide binding to a Phe-154 to Trp mutant of chicken skeletal muscle troponin C. *Biochemistry* 33, 2961-2969.

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

cysteine 190 of α -tropomyosin. J. Biol. Chem. 257, 9152-9160.

Dalgarno, D.C., Grand, R.J.A., Levine, B.A., Moir, A.J.G., Scot, G.M.M., and Perry, S.V. (1982). Interaction between troponin I and troponin: definition of the topography by proton magnetic resonance spectroscopy. FEBS Lett. 150, 54-59.

Drapeau, G.R., Brammar, W.J., and Yanofsky, C. (1968). Amino acid replacements of the glutamic acid residue at position 48 in tryptophan synthetase A of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 35, 357-367.

Eaton, B.L., Kominz, D.R., and Eisenberg, E. (1975). Correlation between the inhibition of the acto-heavy meromyosin ATPase and the binding of tropomyosin to F-actin: effects of Mg^{2+} , KCl, Troponin I, and troponin C. Biochemistry 14, 2718-2725.

Farah, C.S., Miyamoto, C.A., Ramos, C.H.I., 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.

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

Grand, R.J.A., Levine, B.A., and Perry, S.V. (1982). Proton-magnetic-resonance studies on the interaction of rabbit

skeletal-muscle troponin I with troponin C and action. *Biochem. J.* 203, 61-68.

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

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.

Heald, R.W. and Hitchcock-DeGregori, S.E. (1988). The structure of the amino terminus of tropomyosin is critical for binding to actin in the absence and presence of troponin. *J. Biol. Chem.* 263, 5254-5259.

Heinonen, 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.

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

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

Hogue, C.W.V., Rasquinha, I., Szabo, A.G. and MacManus, J.P. (1992). A new intrinsic fluorescent probe for proteins - Biosynthetic incorporation of 5-hydroxytryptophan into oncomodulin. FEBS Lett. 310, 269-272.

Horwitz, J., Bullard, B., and Mercola, D. (1979). Interaction of troponin subunits. J. Biol. Chem 254, 350-355.

Johnson, J.D., Charlton, S.C., and Potter, J.D. (1979). A fluorescence stopped flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin C. J. Biol. Chem. 254, 3497-3502.

Katayama, E. (1979). Interaction of troponin I with troponin T and its fragments. J. Biochem. 85, 1379-1381.

Katayama, E. (1980). Its regulatory mechanism. In Muscle contraction. S. Ebashi, ed. (Tokyo: Springer-Verlag, Berlin and New York; Japan Sci. Soc. Press), pp. 251-258.

Katayama, E. and Nozaki, S. (1982). Ca^{2+} - dependent binding of synthetic peptides corresponding to some regions of troponin-I to troponin-C. J. Biochem. 91, 1449-1452.

Kobayashi, T., Tao, T., Gergely, J., and Collins, J.H. (1994). Structure of the troponin complex. Implications of photocross-linking of troponin I to troponin C thiol mutants. J. Biol. Chem. 269, 5725-5729.

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

Leavis, P.C. and Gergely, J. (1982). Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit.Rev.Biochem.* 16, 235-305.

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

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

MacLachlan, L.K., Reid, D.G., Mitchell, R.C., Salter, C.J., and Smith, S.J. (1990). Binding of a calcium sensitizer, bepridil, to cardiac troponin C. A fluorescence stopped-flow kinetic, circular dichroism, and proton nuclear magnetic resonance study. *J. Biol. Chem.* 265, 9764-9770.

McGhee, J.D. and Von Hippel, P.H. (1974). Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol.*

Biol. 86, 469-489.

McLachlan, A.D. and Stewart, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure. J. Mol. Biol. 98, 293-304.

Moir, A.J.G., Ordidge, M., Grand, R.J.A., Trayer, I.P., and Perry, S.V. (1978). Characterization of region of the primary sequence of troponin C involved in calcium ion-dependent interaction with troponin I. Biochem. J. 173, 449-457.

Monteiro, P.B., Lataro, R.C., Ferro, J.A., and Reinach, F.C. (1994). Functional alfa-tropomyosin produced in E.coli. A di-peptide extension can substitute the N-terminal acetyl group.. J. Biol. Chem. 269, 10461-10466.

Morano, I. and Rüegg, J.C. (1991). What does TnC_{DANZ} fluorescence reveal about the thin filament state. Pflugers Arch. 418, 333-337.

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

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

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

Pearlstone, J.R., Borgford, T., Chandra, M., Oikawa, K., Kay, C.M., Herzberg, O., Moulton, J., Herklotz, A., Reinach, F.C., and Smillie, L.B. (1992). Construction and characterization of a spectral probe mutant of troponin C: Application to analyses of mutants with increased Ca^{2+} affinity. *Biochemistry* 31, 6545-6553.

Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F., and Wilson, F.J. (1973). Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 251-262.

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

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.

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.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - Laboratory manual (New York: Cold Spring Harbor

Laboratory Press).

Sheng, Z., Pan, B.-S., Miller, T.E., and Potter, J.D. (1992). Isolation, expression, and mutation of a rabbit skeletal muscle cDNA clone for troponin I. The role of the NH₂ terminus of fast skeletal muscle troponin I in its biological activity. J. Biol. Chem. 267, 25407-25413.

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

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189, 113-130.

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

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.

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

Talbot, J.A. and Hodges, R.S. (1981b). Comparative studies on the inhibitory region of selected species of troponin I. *J. Biol. Chem* 256, 12374-12378.

Tanokura, M. and Ohtsuki, I. (1982). Location of troponin I binding on troponin T sequence. *FEBS Lett.* 145, 147-149.

Tao, T., Gong, B.-J., and Leavis, P.C. (1990). Calcium-induced movement of troponin-I relative to actin in skeletal muscle thin filaments. *Science* 247, 1339-1341.

Van Eyk, J.E. and Hodges, R.S. (1988). The biological importance of each amino acid residue of the troponin I inhibitory sequence 104-115 in the interaction with troponin C and tropomyosin-actin. *J. Biol. Chem.* 263, 1726-1732.

Van Eyk, J.E., Strauss, J.D., Hodges, R.S., and Rüegg, J.C. (1993). A synthetic peptide mimics troponin I function in the calcium-dependent regulation of muscle contraction. *FEBS Lett.* 323, 223-228.

Wang, Z., Sarkar, S., Gergely, J., and Tao, T. (1990). Ca^{2+} -dependent interactions between the C-helix of troponin-C and troponin-I. Photocross-linking and fluorescence studies using a recombinant troponin-C. *J. Biol. Chem.* 265, 4953-4957.

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

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

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

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

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

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

Zasedatelev, A.S., Gurskii, G.V., and Vol'Kenshtein, M.V. (1971). Theory of one-dimensional adsorption - I. Adsorption of small molecules on a homopolymer. *Mol. Biol.* 5, 245-251.

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

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.

Zot, H.G. and Potter, J.D. (1987). Calcium binding and fluorescence measurements of dansylaziridine-labelled troponin C in reconstituted thin filaments. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 8, 428-436.

Anexo 1 - Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: The role of rare codons on the expression level

FOR THE RECORD

Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: The role of rare codons on the expression level

RONALDO B. QUAGGIO, JESUS A. FERRO,¹ PATRICIA B. MONTEIRO,
AND FERNANDO C. REINACH

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20.780,
CEP 01498, São Paulo, Brazil

(RECEIVED December 15, 1992; REVISED MANUSCRIPT RECEIVED February 19, 1993)

Contraction of skeletal muscle is regulated by intracellular Ca^{2+} levels. This regulation is mediated by the troponin-tropomyosin complex present in the actin filament. Troponin is composed of three different polypeptides: a calcium-binding component (troponin C, TnC), an inhibitory component (troponin I, TnI), and a tropomyosin-binding component (troponin T, TnT). Although the general mechanism and the role played by each component is understood (Zot & Potter, 1987), the molecular details of the conformational changes responsible for the regulation are not. The fact that the three troponin subunits can refold and reassociate in vitro (Greaser & Gergely, 1971) has allowed the use of troponin subunits produced in *Escherichia coli* to study the molecular mechanism of this regulatory complex. Expression of TnC in bacteria (Chen et al., 1988; Reinach & Karlsson, 1988; Xu & Hitchcock-DeGregori, 1988) and the analysis of site-directed mutants (Fujimori et al., 1990; Grabarek et al., 1990; Putkey et al., 1991; Sheng et al., 1991; Negele et al., 1992; Pearlstone et al., 1992; Silva et al., 1993) in conjunction with the determination of the crystal structure of TnC (Herzberg & James, 1985; Sundarlingam et al., 1985) has provided a better understanding of the calcium-induced conformational change in TnC (Silva & Reinach, 1991; Grabarek et al., 1992). This conformational change is responsible for the modulation of the inhibitory action of TnI.

We have isolated a cDNA containing the complete coding region for TnI. The nucleotide sequence of the cDNA (see Supplementary material on the Diskette Appendix) agrees with the chicken gene sequence (Nikovits et al.,

1986) and with the protein sequence determined by Wilkinson and Grand (1978). Using this cDNA, a series of vectors based on the pET system were constructed in order to obtain TnI expression (see Supplementary material on the Diskette Appendix). Constructs containing 12 amino acids of S10 and 7 amino acids of the factor Xa cleavage site fused to the N-terminus of TnI (pET 501.4 and pET 508.7) expressed the fusion protein after induction (Fig. 1A). The fusion protein was purified and shown to have the predicted N-terminal sequence with the initiation methionine removed (results not shown). However, if the 19 amino acids fused to the N-terminal of TnI were removed (pET-R1), TnI could not be expressed (Fig. 1A).

After a series of frustrated attempts to express TnI, two rare codons for arginine (AGG) in positions 8 and 9 of the cDNA were shown to be responsible for the lack of expression. When these two codons were substituted for the frequently used arginine codon (CGT), a high level of TnI expression was observed (construct pET-R18 in Fig. 1).

Rare arginine codons are known to reduce translation efficiency in *E. coli* (Bonekamp & Jensen, 1988) and have been implicated in the control of translation when present in the first 25 codons after the initiation methionine (Chen & Inouye, 1990), but we are not aware of an example where they completely abolished protein accumulation as observed with this chicken TnI cDNA. Recently a rabbit cDNA has been used to express TnI in a pET plasmid (Sheng et al., 1992). The rabbit cDNA has a single AGG codon in position 9, position 8 being an asparagine. An arginine is present in position 7, but the codon used (CGC) is not a rare one. In the chicken, the DNA sequence around the two sequential Arg codons (AAG-AGGAG) is very similar to the Shine-Dalgarno sequence present in the pET vectors (AAGAAGGAG) (Studier et al., 1990),

Reprint requests to: Fernando C. Reinach, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20.780, CEP 01498, São Paulo, Brazil.

¹Present address: Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de São Paulo, CEP 14870, Jaboicabal, São Paulo, Brazil.

and this may also interfere with expression in this particular case. A detailed analysis of other regulatory mechanisms known to be involved in the initiation of protein synthesis can be found in de Smit and van Duin (1990) and Wikström et al. (1992).

Recombinant TnI was purified to homogeneity (Fig. 1B) with a final yield of 25 mg of pure protein per liter of culture. In contrast to the 19-amino acid fusion TnI, the non-fusion protein was present in inclusion granules (Fig. 1B). N-terminal sequence analysis of the purified protein confirmed its identity and showed that the initiation methi-

onine was removed. The primary sequence of recombinant TnI is therefore identical to the muscle protein except for the lack of acetylation of the N-terminal amine found in muscle TnI (Wilkinson & Grand, 1978).

We have compared recombinant and muscle TnI with respect to three TnI properties: calcium-dependent association of TnI to TnC in the presence of 6 M urea, concentration-dependent inhibition of actomyosin ATPase, and the increase in TnC affinity for calcium upon TnI binding.

TnI binds TnC in urea gels in a calcium-dependent fashion (Head & Perry, 1974). As shown in Figure 1C, in the presence of Ca^{2+} , a stable complex between recombinant TnC and recombinant TnI can be observed in polyacrylamide gels containing 6 M urea. In the absence of Ca^{2+} , this complex is not stable and only uncomplexed TnC can be observed in the gel. No difference in behavior was observed when recombinant and muscle TnI were compared.

TnI inhibits the acto-myosin ATPase (Schaub & Perry, 1969). Figure 2A shows the inhibition of actomyosin ATPase by varying concentrations of TnI. Recombinant and muscle TnI inhibit the ATPase with a similar concentration dependence. At 1:1 molar ratio of TnI:actin ($4 \mu\text{M}$) the inhibition is close to maximum. The TnI concentration necessary for 50% inhibition was slightly lower for recombinant TnI when compared with the muscle protein, but the inhibitions reached at high TnI concentrations are not significantly different (Fig. 2A).

Fig. 1. TnI expression in *E. coli* (methods are described in the Supplementary material, Diskette Appendix). **A:** Expression by different plasmids. Total extracts of bacteria harboring the different expression vectors were run on sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue. Samples obtained before induction (NI) and after induction (I) are shown side by side for the different vectors. Bacteria containing the plasmid pET-501.4 and pET-508.7 encoding fusion TnI expressed the fusion protein upon induction. Bacteria containing the plasmid pET-R1 encoding the nonfusion TnI showed no accumulation of TnI. An induced sample of bacteria containing the plasmid pET-R18 (nonfusion TnI after substitution of the two Arg codons) was run side by side to show the accumulation of nonfusion TnI (*). Molecular weight markers (M) of 66, 45, 36, 29, 24, and 20.1 kDa are shown. **B:** Purification of recombinant TnI. SDS-polyacrylamide gel of samples from the purification steps of recombinant TnI obtained with the plasmid pET-R18. Extracts obtained from cells before induction (NI) show no TnI, which accumulates after induction (I). After cell lysis and centrifugation, TnI is found in the inclusion granules (Pel.). No TnI is observed in the supernatant (Sup.). Pure TnI obtained after CM-Sepharose chromatography is also shown (Col.). Molecular weight markers (M) of 66, 45, 36, 29, 24, and 20.1 kDa are shown. **C:** Complex formation between TnC and TnI. Urea polyacrylamide gel of TnC (TnC). TnC/TnI complex produced with recombinant TnC and chicken muscle TnI (C/I Nat), and TnC/TnI complex obtained with recombinant TnC and recombinant TnI (C/I Rec). Each sample was run in the presence (Ca^{2+}) or absence (EDTA) of Ca^{2+} . The band corresponding to the TnC/TnI complex can be observed in the presence of Ca^{2+} . In the absence of Ca^{2+} a band corresponding to TnC is observed, and TnI does not enter the gel.

Fig. 2. Functional characterization of recombinant TnI (methods are described in the Supplementary material, Diskette Appendix). **A:** Inhibition of actomyosin ATPase activity. ATPase activity as a function of TnI concentration is shown for chicken muscle TnI ($\bullet$) and recombinant TnI ($\blacktriangledown$). Actin concentration is $4 \mu\text{M}$. The data points are means from three independent determinations. The SEM is shown by the bars. The absolute values for the ATPase assay with no TnI were the same for both curves ($0.4 \mu\text{M Pi/min/mg}$ of myosin). In some points the SEM is smaller than the symbols used. **B:** Direct calcium-binding measurements. Calcium binding to recombinant chicken TnC ($\bullet$), TnC/TnI complex prepared with muscle TnI ($\blacksquare$), and TnC/TnI complex prepared with recombinant TnI ($\blacktriangledown$) as a function of calcium concentration. The data points are means from three independent determinations. The SEM is shown by the bars. In some points the SEM is smaller than the symbols used. The lines are curves fitted to the averaged data according to the equation given on the Diskette Appendix.

We measured the binding of Ca^{2+} to TnC and to TnC/TnI complexes prepared with recombinant and muscle TnI using flow dialysis. Recombinant TnI and muscle TnI, when complexed to TnC, are capable of increasing the calcium affinity of TnC (Fig. 2B). A 10-fold increase in affinity was observed for the high affinity sites, and a 15-fold increase was observed for the low affinity sites when the complexes are compared with isolated TnC (see Table 1). An apparently larger increase in affinity was observed with recombinant TnI when compared with muscle TnI (Fig. 2B), but the dissociation constants obtained for the two complexes are not statistically different (Table 1). The dissociation constants obtained for recombinant chicken TnC are in agreement with the ones we determined by equilibrium dialysis (Fujimori et al., 1990) and flow dialysis (Silva et al., 1993). The constants re-

ported here, in Fujimori et al. (1990), and in Silva et al. (1993) are lower than the ones reported for rabbit TnC and rabbit TnC/TnI complex (Potter & Gergely, 1975) probably due to differences in protein sequence between rabbit and chicken TnC and TnI.

We conclude that the major impediment for expression of chicken recombinant TnI in *E. coli* resides in the two sequential AGG codons present in positions 8 and 9 of the cDNA. Recombinant TnI binds TnC, inhibits actomyosin ATPase, and increases TnC affinity for Ca^{2+} in a manner similar to chicken muscle TnI.

Acknowledgments

We thank Dr. Ordahl for the TnI cDNA and Dr. F.W. Studier for the pET vectors. This work was supported by grants from FAPESP, PADCT, CNPq, and The Rockefeller Foundation.

Table 1. Calcium binding to TnC and TnC/TnI complexes^a

Protein	n_1	$k_1 (\times 10^{-6} \text{ M})$	n_2	$k_2 (\times 10^{-8} \text{ M})$
TnC	1.94 ± 0.07	40.11 ± 5.5	1.93 ± 0.06	90.4 ± 6.04
C/I natural	2.42 ± 0.48	$2.69 \pm 1.26^*$	1.81 ± 0.58	$7.12 \pm 5.39^*$
C/I recombinant	1.97 ± 0.18	$2.78 \pm 0.73^*$	$2.70 \pm 0.35^*$	$8.02 \pm 0.80^*$

^a The apparent dissociation constants for the low affinity (k_1) and high affinity (k_2) calcium-binding sites and the number of sites (n_1 and n_2) are presented as average $\pm$ SEM of the individual fitted curves. * indicates $P < 0.05$ with respect to recombinant TnC.

References

- Bonekamp, F. & Jensen, F.K. (1988). The AGG codon is translated slowly in *E. coli* even at very low expression levels. *Nucleic Acids Res.* 16, 3013–3024.
- Chen, G.-F.T. & Inouye, M. (1990). Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Res.* 18, 1465–1473.
- Chen, Q., Taljanidisz, J., Sarkar, S., Tao, T., & Gergely, J. (1988). Cloning, sequencing and expression of a full-length rabbit fast skeletal troponin-C cDNA. *FEBS Lett.* 228, 22–26.
- de Smit, H.M. & van Duin, J. (1990). Control of prokaryotic translation initiation by mRNA secondary structure. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38, 1–35.
- Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moul, J., & Reinach, F.C. (1990). Probing the Ca^{2+} induced conformational transition of troponin C with site directed mutants. *Nature* 345, 182–184.
- Grabarek, Z., Tan, R.-Y., Wang, J., Tao, T., & Gergely, J. (1990). Inhibition of mutant troponin C activity by an intra-domain disulphide bond. *Nature* 345, 132–135.
- Grabarek, Z., Tao, T., & Gergely, J. (1992). Molecular mechanism of troponin-C function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13, 383–393.
- Greaser, M.L. & Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* 246, 4226–4233.
- Head, J.F. & 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.
- Herzberg, O. & James, M.N.G. (1985). Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature* 313, 653–659.
- Negele, J.C., Dotson, D.G., Liu, W., Sweeney, H.L., & Putkey, J.A. (1992). Mutation of the high affinity calcium binding sites in cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 267, 825–831.
- Nikovits, W., Jr., Kuncio, G., & Ordahl, C.P. (1986). The chicken fast skeletal troponin I gene: Exon organization and sequence. *Nucleic Acids Res.* 14, 3377–3390.
- Pearlstone, J.R., Borgford, T., Chandra, M., Oikawa, K., Kay, C.M., Herzberg, O., Moul, J., Henklotz, A., Reinach, F.C., & Smillie, L.B. (1992). Construction and characterization of a spectral probe mutant of troponin C: Application to analyses of mutants with increased Ca^{2+} affinity. *Biochemistry* 31, 6545–6553.
- Potter, J.D. & Gergely, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar ATPase. *J. Biol. Chem.* 250, 4628–4633.
- Putkey, J.A., Liu, W., & Sweeney, H.L. (1991). Function of the N-terminal calcium-binding sites in cardiac/slow troponin C assessed in fast skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 266, 14881–14884.
- Reinach, F.C. & Karlsson, R. (1988). Cloning, expression, and site-directed mutagenesis of chicken skeletal muscle troponin C. *J. Biol. Chem.* 263, 2371–2376.
- Schaub, M.C. & Perry, S.V. (1969). The relaxing protein system of striated muscle. Resolution of the troponin complex into inhibitory and calcium ion-sensitizing factors and their relationship to tropomyosin. *Biochem. J.* 115, 993–1004.
- Sheng, Z., Francois, J.-M., Hitchcock-DeGregori, S.E., & Potter, J.D. (1991). Effects of mutations in the central helix of troponin C on its biological activity. *J. Biol. Chem.* 266, 5711–5715.
- Sheng, Z., Pan, B., Miller, T.E., & Potter, J.D. (1992). Isolation, expression, and mutation of a rabbit skeletal muscle cDNA clone for troponin I. *J. Biol. Chem.* 267, 25407–25413.
- Silva, A.C.R., Araujo, A.H.B., Herzberg, O., Moul, J., Sorenson, M., & Reinach, F. (1993). Troponin C mutants with increased calcium affinity. *Eur. J. Biochem.*, in press.
- Silva, A.C.R. & Reinach, F.C. (1991). Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16, 53–57.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., & Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89.
- Sundarlingam, M., Bergstrom, R., Strasburg, G., Rao, S.T., Roychowdhury, P., Greaser, M., & Wang, B.C. (1985). Molecular structure of troponin C from chicken skeletal muscle at 3 Å resolution. *Science* 227, 945–948.
- Wikström, P.M., Lind, L.K., Berg, D.E., & Björk, G.R. (1992). Importance of mRNA folding and start codon accessibility in the expression of genes in a ribosomal protein operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 224, 949–966.
- Wilkinson, J.M. & Grand, R.J.A. (1978). Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 271, 31–35.
- Xu, G.-Q. & Hitchcock-DeGregori, S.E. (1988). Synthesis of a troponin C cDNA and expression of wild-type and mutant proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 13962–13969.
- Zot, A.S. & Potter, J.D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 16, 535–559.

Supplementary material for:

CLONING AND EXPRESSION OF CHICKEN SKELETAL MUSCLE TROPONIN I
IN *E. coli*. THE ROLE OF RARE CODONS IN THE EXPRESSION LEVEL.

Ronaldo B. Quaggio, Jesus A. Ferro, Patricia B. Monteiro
and Fernando C. Reinach

This supplementary material is divided in two parts. Part 1
contains a detailed description of the methods used. Part 2
contains a figure and the corresponding legend.

Part 1: Material and Methods

- **cDNA cloning, sequencing and mutagenesis** - A cDNA library
constructed with mRNA from 2-week post-hatch chicken pectoralis
muscle (Reinach and Fischman, 1985) was screened with a partial
cDNA containing the C-terminal half of TnI (Nikovits *et al.*, 1986).
A full length cDNA (J003) was isolated and both strands were
sequenced (Sanger *et al.*, 1977). Site directed mutagenesis was
performed in a single stranded template derived from M13 using
standard procedures (Carter *et al.*, 1985).

- **Construction of TnI expression vectors** - The cDNA (J003) was
subcloned in the vector M13K11RX (Waye *et al.*, 1985) and the
oligonucleotide TCCATCGAGGGTAGGTCTGATGAAGAGAAA was used to delete
the 5'untranslated sequence and juxtapose the first serine of the
coding sequence to the arginine of the factor Xa cleavage sequence

(Reinach and Karlsson, 1988). EcoK selection (Reinach and Karlsson, 1988; Waye et al., 1985) was used to isolate a clone (J361) containing the appropriate deletion. This construct was used as a template for further mutagenesis. Two oligonucleotides CCCTCCCAGGGTCCATGCAGG and TGTGCAAAAACTTCATGCCA were used to modify the internal BamHI and HindIII sites present in the cDNA resulting in the construct J501. The BamHI/EcoRI fragment of J501 (containing the sequence FXTnI) was cloned into BamHI/EcoRI cut pET-3a (Studier et al., 1990) resulting in the plasmid pET-501.4. A similar construct preserving the transcription termination signal from pET-3a in the final construct was also produced. For that purpose, first a BamHI linker (CGGATCCG) was cloned into the single EcoRV site of J501 producing M13-508. The BamHI fragment of M13-508 was then subcloned into the BamHI site of pET-3a producing the construct pET-508.7. To construct a second derivative of pET capable of expressing TnI as a non fusion protein, a NdeI site was introduced into the border of the sequence FX and TnI using the oligonucleotide GGATCCATCGAGCATATGTCTGATGAAGAG to mutagenize the construct M13-508, producing the construct M13-R1. To mutate the AGG codons in positions 8 and 9 of the cDNA into CGT codons we used the oligonucleotide GATGAAGAGAAAAAGCGTCGTGCAGCCACCGCC to further mutagenize the construct M13-R1, producing the construct M13-R18. We finally used the NdeI/BamHI fragment of constructs M13-R1 and M13-R18 to substitute the NdeI/BamHI fragment of pET-3a producing respectively the constructs pET-R1 and pET-R18. All constructs were confirmed by restriction analysis and complete DNA sequencing.

- **Construction of TnC expression vector with the T7 promotor** - A BamHI linker was first cloned into the single EcoRV site of the M13mp11 RF825 containing the cDNA for TnC linked to the FXa cleavage site (Reinach and Karlsson, 1988), producing the construct M13 RF825-3. An oligonucleotide (GGATCCATCGAGGGTCATATGGCGTCAATGAC) was used to introduce a NdeI site between the FXa and the TnC sequence in construct M13 RF825-3 producing M13 RF825-3.1. The NdeI/BamHI fragment of this last construct was subcloned in pET-3a using the same enzymes producing the expression vector pET-TnC.

- **Purification of recombinant TnI and TnC and N-terminal sequence determination** - Protein expression with the constructs containing the pL promotor was described before (Reinach and Karlsson, 1988). For expression using constructs derived from pET we used the *E.coli* strain BL21(DE3) pLysS since plasmid stability tests (Studier et al., 1990) showed that the plasmids are not stable in leaky strains as BL21(DE3). A single colony from a fresh plate was inoculated into 50ml of 2xTY (Reinach and Karlsson, 1988) with 50µg/ml of ampicillin and 200µg/ml chloramphenicol and grown for 3hr at 37°C. A liter of 2xTY was inoculated with 10ml of this culture and grown until O.D.₆₀₀ was 0.8-0.9. IPTG was added to a final concentration of 0.4mM and incubation was continued for another 3hr. Cells were pelleted (4.500xg 10 min) and resuspended in 30ml of 50mM Tris-Cl pH 7.0; 1mM EDTA; 10mM β-mercaptoethanol and lysed in a French Press (3x 16.000psi). The inclusion granules containing TnI were collected (60.000xg, 40min, 4°C) and resuspended in 50mM Tris-HCl pH 7.0; 1mM EDTA; 10mM β-mercaptoethanol; 8M urea. The protein was loaded into a CM-sepharose fast flow column equilibrated with the same buffer and eluted with a NaCl gradient (0-300mM). The protein

was pooled, dialysed into 50mM Tris-Cl pH 7.0; 1mM MgCl₂; 0.5M KCl and stored at -20°C. The final yield was 25mg of pure TnI per liter of bacterial culture. Recombinant TnC was produced in *E.coli* BL21(DE3) pLySS using the plasmid pET-TnC and purified as described (Reinach and Karlsson, 1988; Fujimori et al., 1990). Up to 150mg of purified TnC per liter of culture was obtained with this plasmid; a three fold increase when compared with our previous method (Reinach and Karlsson, 1988). The N-terminal sequence of recombinant TnI and TnC was determined by Edman degradation.

- **Purification of muscle proteins** - Skeletal muscle TnC, TnI, actin and myosin were purified from pectoralis muscle of adult chickens as described (Potter, 1982; Pardee and Spudich, 1982; Reinach et al., 1982). α -tropomyosin was purified from adult chicken hearts (Smillie, 1982).

- **Preparation and gel analysis of the TnC/TnI complex (Xu and Hitchcock-DeGregori, 1988)** - TnC (5-10mg/ml) was dialysed into 10mM Tris-Cl pH 7.5; 2mM MgCl₂; 0.1mM CaCl₂; 100mM NaCl; 3mM β -mercaptoethanol. TnI (5-10mg/ml) was dialysed into the same buffer containing 500mM NaCl. Urea was added to a final concentration of 6M to the TnI solution and to 4M in the TnC solution. The protein solutions were mixed to obtain a molar ratio of 2:1 TnI:TnC. This TnI excess reduces to a minimum the concentration of uncomplexed TnC. The mixture is dialysed into 10mM Tris-Cl pH 7.5; 100mM NaCl; 2mM MgCl₂; 0.01mM CaCl₂, 3mM β -mercaptoethanol at 4°C to remove the urea and centrifuged at 12.000xg for 40 min. to remove the excess TnI that precipitates at low salt. The complex was analysed in a 6M

urea-8% polyacrylamide gel in the presence (5mM CaCl_2) or absence of calcium (5mM EDTA) (Head and Perry, 1974).

- **ATPase measurements** - ATPase measurements were performed in 20mM Imidazole pH 7.0, 60mM KCl, 3.5mM MgCl_2 , 0.5mM EGTA, 1.0mM DTT and 2mM ATP. Actin ($4.0\mu\text{M}$), myosin ($0.2\mu\text{M}$) and tropomyosin ($1.15\mu\text{M}$) were kept constant while the TnI concentration was varied from 0- $8.0\mu\text{M}$. The reaction was started by the addition of ATP and proceeded for 25 minutes at 25°C . Phosphate release was measured as described (Heinonen and Lahti, 1981).

- **Calcium binding to TnC and to the TnC/TnI complexes** - Calcium binding to TnC and to the TnC/TnI complexes prepared with either endogenous or recombinant TnI was measured using a flow dialysis apparatus (Colowick and Womack, 1969; Womack and Colowick, 1973; Silva *et al.*, 1992). In experiments where TnC and TnC/TnI complex were compared, the TnC concentration was kept at $18.5\mu\text{M}$ and the concentration of the TnC/TnI complex at $7.5\mu\text{M}$ in order to maintain the TnC concentration constant. Calculations were performed as described (Colowick and Womack, 1969; Womack and Colowick, 1973). Each protein and protein complex was assayed in three independent experiments. Each data set was fitted using a regression procedure (Potter and Gergely, 1975; Fujimori *et al.*, 1990) using the equation where y is the number of sites filled at each $[\text{Ca}^{2+}]$; k_1 and k_2 are the association constants for the high and low affinity sites and n_1 and n_2 are the number of sites in each category. Since saturation occurred between 4 and 5 mols of Ca^{2+} per mol of protein, the values of n_1 and n_2 were not fixed during the fitting procedure.

- Bibliography

Carter, P., Bedouelle, H. and Winter, G. (1985). Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443.

Colowick, S.P. and Womack, F.C. (1969). Binding of diffusible molecules by macromolecules: rapid measurement by rate of dialysis. *J.Biol.Chem.* 244:774-777.

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

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.

Heinonen, 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.

Nikovits, W., Jr., Kuncio, G. and Ordahl, C.P. (1986). The chicken fast skeletal troponin I gene: exon organization and sequence. *Nucleic Acids Res.* 14:3377-3390.

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

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

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

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

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.

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

Silva, A.C.R., Araujo, A.H.B., Herzberg, O., Moulton, J., Sorenson, M. and Reinach, F. (1992). Troponin C mutants with increased calcium affinity. *Eur.J.Biochem.* (submitted):

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

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. *Meth.Enzymol.* 185:60-89.

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

Womack, F.C. and Colowick, S.P. (1973). Rapid measurement of binding of ligands by rate dialysis. *Meth.Enzymol.* 25:464-471.

Xu, G.-Q. and Hitchcock-DeGregori, S.E. (1988). Synthesis of a troponin C cDNA and expression of wild-type and mutant proteins in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 263:13962-13969.

Part 2:

```

-                                     M S D E E K K R R A
- CGGACTCGGGTTTACAACCATCTAAAGCAAGATGTCTGATGAAGAGAAAAAGAGGAGGGC
-      10      20      30      40      50      60
-
-   A T A R R Q H L K S A M L Q L A V T E I
- AGCCACCGCCCGGCCAGCACCTGAAGAGTGCTATGCTCCAGCTTGTCTCACTGAAAT
-      70      80      90     100     110     120
-
-   E K E A A A K E V E K Q N Y L A E H C P
- AGAAAAAGAACGAGCTGCTAAAGAAGTGGAAAAGCAAACTACCTGGCAGAGCATTGCCC
-     130     140     150     160     170     180
-
-   P L S L P G S M Q E L Q E L C K K L H A
- TCCTCTGTCCCTCCCAGGATCCCATGCAGGAACCTCAGGAACCTGTGCAAAAAGCTTCATGC
-     190      Bam HI    210      220      Hind III 240
-
-   K I D S V D E E R Y D T E V K L Q K T N
- CAAGATAGACTCAGTGGATGAGGAAAGGTATGACACAGAGGTGAAGCTACAGAAGACTAA
-     250     260     270     280     290     300
-
-   K E L E D L S Q K L F D L R G K F K R P
- CAAGGAGCTGGAGGACCTGAGCCAGAAGCTGTTTGACCTGAGGGGCAAGTTCAGAGGGCC
-     310     320     330     340     350     360
-
-   P L R R V R M S A D A M L R A L L G S K
- ACCTCTGCGCGGGTGCGCATGTCTGCTGATGCCATGCTGCGTGCCCTGCTGGGCTCCAA
-     370     380     390     400     410     420
-
-   H K V N M D L R A N L K Q V K K E D T E
- GCACAAGGTCAACATGGACCTCCGGGCCAACCTGAAGCAAGTCAAGAAGGAGGACACGA
-     430     440     450     460     470     480
-
-   K E K D L R D V G D W R K N I E E K S G
- GAAGGAGAAGGACCTCCGCGATGTGGGTGACTGGAGGAAGAACATTGAGGAGAAATCTGG
-     490     500     510     520     530     540
-
-   M E G R K K M F E A G E S *
- CATGGAGGGCAGGAAGAAGATGTTTGAGGCCGCGAGTCCTAAGCACTGGTCTCTCCACT
-     550     560     570     580     590     600
-
-   CTTGCCATTACCACCTCTTCCATCCCTCCTGAGCATGGCCACAGCTGTGATCATGGCC
-     610     620     630     640     650     660
-
-   ACCTCCCTGCGCTGAACCTCAACATGTCCTCACCATGCATTGAACCCACTGACTGGGTGC
-     670     680     690     700     710     720
-
-   TGTITCTCTGATTTTGTGAAGAGCTGCAGTCTGGAAGCAGCAGTGTAATAAAGCTTTCA
-     730     740     750     760      Hind III
-
-   TGGGAGAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
-     790     800     810     820     830     840
-
-   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
-     850     860

```

Figure Legend - Sequence of the cDNA encoding chicken skeletal muscle TnI and the corresponding protein sequence. The two arginine (AGG) codons that have been modified to obtain expression are indicated in bold. The position of the Hind III and Bam HI sites within the coding sequence that have been removed are also indicated.

Anexo 2 - Lisogenização com λ DE3 das cepas *E.coli* CY15077 e *E.coli* W3110 A33

Vários trabalhos com troponina C analisando aspectos cinéticos e mesmo de mudanças conformacionais, utilizam nos ensaios técnicas de fluorescência (Pearlstone et al., 1992; Chandra et al., 1994; Zot e Potter, 1987; Johnson et al., 1979; Wang et al., 1990; MacLachlan et al., 1990; Morano e Rüegg, 1991). Pensando em também utilizar estas técnicas em nosso laboratório, com a troponina C recombinante e mesmo com as outras sub-unidades do complexo troponina, construímos um novo sistema de expressão de proteínas recombinantes em bactérias baseado no sistema pET (Studier et al., 1990) capaz de incorporar análogos de triptofano em mutantes contendo um único triptofano.

Este sistema de expressão se baseou no trabalho de Hogue e colaboradores (1992) que expressa proteínas recombinantes em bactérias auxotróficas para triptofano. Neste trabalho, as bactérias são crescidas em meio de cultura onde foi adicionado um análogo do triptofano, 5-hidroxi-triptofano, que é incorporado à proteína sintetizada no lugar do triptofano. Este análogo possui absorvância significativa entre 310-320nm, diferente do triptofano que não absorve nesta faixa. Desta forma uma proteína que possua 5-hidroxi-triptofano incorporado, pode ser identificada e analisada através de ensaios de fluorescência na presença de outras proteínas que contenham triptofano.

Duas cepas de bactérias auxotróficas para triptofano nos foram cedidas pelo Dr. Szabo, *E.coli* W3110trp A33 (Drapeau et al., 1968) e *E.coli* CY15077 (W3110 Δ trpEA2), para serem utilizadas na construção de hospedeiros para a expressão de vetores do sistema pET. Inicialmente testamos se as cepas eram auxotróficas para

triptofano crescendo ambas as cepas em placas de meio mínimo sem triptofano e outras suplementadas com 4 μ g/ml de L-triptofano. Verificamos que as duas cepas só produziram colônias nas placas que contenham L-triptofano, confirmando que ambas as cepas eram auxotróficas para triptofano.

Depois de confirmado o genótipo das cepas, passamos a construção de hospedeiras para o sistema pET. Para a produção das hospedeiras é necessário incorporar ao genoma da bactéria o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do promotor de lacUV5, induzível por IPTG.

A incorporação do gene da T7 RNA polimerase ao genoma da bactéria foi feita pela lisogenização do fago λ DE3 que possui o gene, e que uma vez em estado lisogênico não é capaz de reverter a forma lítica sem a ajuda de um fago "helper", o que torna a hospedeira estável.

Lisogenizamos as duas cepas de bactéria, infectando as culturas com o fago λ DE3. Depois da infecção as culturas foram espalhadas com alça de Drigalski em meio sólido e incubadas. Recolhemos as colônias isoladas para testar se eram lisogênicas. Após o teste de lisogenização, selecionamos uma colônia de cada cepa para serem utilizadas no sistema de expressão denominando-as: *E.coli* A33(DE3) e *E.coli* CY15077(DE3).

Com as hospedeiras prontas, testamos suas capacidades de expressarem proteínas clonadas em vetores pET. Utilizamos neste teste o vetor de expressão da troponina C, pET-TNC (Quaggio et al., 1993). Transformamos as duas hospedeiras com o vetor pET-TNC e com os clones positivos (resistentes a ampicilina), foi feita uma mini-indução de proteínas. Verificamos que as duas hospedeiras, *E.coli* A33(DE3) e *E.coli* CY15077(DE3) foram capazes de expressar a TnC

quando a cultura foi induzida com IPTG (resultados não apresentados), demonstrando serem viáveis como hospedeiras para os vetores do sistema pET.

A partir deste ponto, passamos as cepas e os resultados obtidos para o colega de laboratório Michael Felix Lee, que está dando continuidade ao trabalho.

Materiais e Métodos

Os materiais e métodos básicos utilizados neste projeto estão descritos nos itens 2 e 3 desta tese, os específicos do processo de lisogenização descritos abaixo.

1 Linhagens de Bactérias

1.1 *E.coli* W3110trp A33 (Drapeau et al, 1968)

1.2 *E.coli* CY15077 (W3110ΔtrpEA2)

1.3 Fago λDE3 (Studier e Moffatt, 1986; Novagem)

2 Lisogenização com λDE3 (Studier e Moffatt, 1986)

Crescer a bactéria hospedeira em 2xTY suplementado com 0,2% maltose e 10mM MgSO₄ até OD₆₀₀ de 0,5. Misturar 5μl de λDE3, 3μl de λB10 (fago helper) e 3μl λB482 (fago de seleção) a 1-10μl da cultura de bactéria (o fago λB10 auxilia na integração do fago λDE3 ao genoma da bactéria e o fago λB482, possuindo a mesma imunidade do fago λDE3, mata as bactérias não infectadas por λDE3). Plaquear em TYE e incubar a 37°C por 12 horas. Transferir colônias isoladas para nova placa de TYE e verificar lisogenização de λDE3 na bactéria hospedeira.

3 Verificação da lisogenização de λ DE3

Crescer a bactéria hospedeira selecionada após lisogenização em 2xTY suplementado com 0,2% maltose e 10mM MgSO_4 até OD_{600} de 0,5. Misturar 100 μ l da cultura de bactéria com 100 μ l de uma diluição de 10^6 do fago T7 4107 (fago de teste). Plaquear em TYE suplementada com 4mM de IPTG e incubar a 37°C por 12 horas. As bactérias hospedeiras que possibilitarem o crescimento do fago de teste T7 4107, possuem λ DE3 lisogênico.