UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**FUNÇÕES ESTRUTURAIS E REGULATÓRIAS
DAS REGIÕES N- E C-TERMINAL
DA TROPONINA I**

CHUCK SHAKER FARAH

Tese de Doutorado submetida ao

Departamento de Bioquímica do

Instituto de Química da

Universidade de São Paulo.

Orientador: *Prof. Dr. Fernando C. Reinach*

SÃO PAULO

1994

**"FUNÇÕES ESTRUTURAIS E REGULATÓRIAS DAS REGIÕES N- E
C-TERMINAL DA TROPONINA I"**

CHUCK SHAKER FARAH

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. Mario José Politi
IQ-USP

Profa. Dra. Martha Meriwether Sorenson
UFRJ

Prof. Dr. Roy Edward Larson
FMRP-USP

SÃO PAULO, SP
13 DE JUNHO DE 1994

AGRADECIMENTOS

A sala 1206 do IQ-USP é mais do que um laboratório: é uma escola, um ponto de encontro desde onde estudantes de iniciação científica até pós-doutorandos e professores visitantes podem participar de uma "enterprise" científica vibrante e estimulante. Fernando criou e cultivou esta escola. Eu quero agradecê-lo por ter me deixado entrar e participar deste ambiente, especialmente pelos primeiros meses quando eu estava sem visto de permanência, sem bolsa e sem falar ou entender português.

A todo pessoal do laboratório - Patrícia, Ronaldo, Kumie, Ana, Martin, Carlos, Catarina, Bettina, Claudio, Tharin, Michael, e Ricardo - eu quero agradecer a amizade e o esforço que me apoiaram tanto dentro como fora do laboratório. Também quero agradecer a todos que leram esta tese e corrigiram o português, inclusive esta página de agradecimentos. Claro, assumo toda a responsabilidade sobre quaisquer erros sobreviventes.

Além das discussões diárias sobre todos os aspectos deste projeto, eu quero agradecer a ajuda que recebi nos experimentos e material de meus colegas, especificamente: Catarina (ATPases), Carlos (ligação de TnI e actina), Ronaldo (wt-TnI e TnI₁₋₁₅₆), Ana (mutantes da TnC D30A, D66A, D106A, D142A), e Kumie (TnT). Mando um grande abraço e obrigação para a minha "bench-mate" Patrícia que sobreviveu às minhas bagunças, sempre com alegria e tolerância, desde o momento que entrei no laboratório.

Quero agradecer ao Dr. Lawrence Smillie (University of Alberta) pelas proteínas N-TnC, C-TnC e pelos mutantes fluorescentes de TnC e também por ter me recebido com muita hospitalidade em Edmonton durante o verão (canadense) de 1993. A Dra. Joyce Pearlstone (University of Alberta) que me ajudou muito nos experimentos de fluorescência e forneceu os resultados dos experimentos com F154W-TnC e F154W-Cdom. Quero agradecer ao Dr. Jesus A. Ferro (UNESP-Jaboticabal) por ter ensinado como medir a atividade ATPásica da actomiosina e como purificar actina e miosina a partir da galinha viva.

Quero agradecer às pessoas dos outros laboratórios do Departamento de Bioquímica, especialmente do bloco 12T, que sempre emprestaram ou cederam material e equipamento. Também quero agradecer à FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, irmã e irmão por me apoiarem com amor e confiança, apesar da longa distância durante os últimos anos. Finalmente, e mais importante, quero agradecer à Lourdes e à Sara por todo o amor e carinho que me deram e por terem aguentado os meus *ups and downs* com paciência. Esta tese é dedicada a elas.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS - - - - -	vi
RESUMO - - - - -	vii
SUMMARY - - - - -	viii
PREFÁCIO - - - - -	ix
 INTRODUÇÃO - - - - -	 1-27
Visão geral da contração muscular - - - - -	1
Actina - - - - -	4
Miosina - - - - -	5
Cinética e termodinâmica da interação ATPásica da acto-miosina - - - - -	7
Modelos moleculares da interação acto-miosina - - - - -	8
Regulação da interação acto-miosina no músculo esquelético dos vertebrados - - - - -	10
Tropomiosina - - - - -	10
Troponina T- - - - -	13
Troponina C - - - - -	16
Troponina I - - - - -	19
Figuras 1-7 - - - - -	27B-I
 MATERIAS E MÉTODOS - - - - -	 28-41
Métodos gerais - - - - -	28
Purificação das proteínas musculares de galinha - - - - -	28
Miosina - - - - -	28
Actina - - - - -	29
α -tropomiosina - - - - -	30
TnCs recombinantes - - - - -	30
TnT recombinante - - - - -	31
O cDNA de TnI - - - - -	31
Cepas de <i>E.coli</i> - - - - -	31

Crescimento bacteriano - - - - -	32
Mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeo - -	32
Reações com S1 nuclease - - - - -	32
Análise das construções derivadas do pET-3a com enzimas de restrição - - - - -	33
Expressão e purificação das proteínas mutantes da TnI em larga escala - - - - -	33
Expressão bacteriana - - - - -	33
Lise das células e separação dos componentes solúveis e insolúveis - - - - -	34
Precipitação com sulfato de amônia - - - - -	34
Cromatografia em CM-sepharose - - - - -	35
Produção de TnI ₁₀₃₋₁₈₂ e TnI ₁₋₁₁₆ marcadas com ¹⁵ N - - - - -	36
Sequenciamento das extremidades N-terminais das proteínas mutantes - - - - -	36
Análise dos complexos binários TnI-TnC nos géis de poliacrilamida-uréia e poliacrilamida-glycerol - -	36
Reconstituição dos complexos terciários TnI-TnC-TnT - -	36
Medidas da atividade Mg ²⁺ -ATPásica da acto-miosina - -	36
Inibição da atividade ATPásica pela TnI e os complexos TnI-TnC - - - - -	37
Regulação pelos complexos terciários TnI-TnC-TnT - - - - -	38
Estudos dos complexos TnI-TnC por espectroscopia de fluorescência - - - - -	39
Preparação das proteínas - - - - -	39
Espectros de emissão de fluorescência - - - - -	39
Titulações de fluorescência das TnCs com as TnIs - - - - -	40
Derivação da equação para "curve-fitting"-	40

RESULTADOS	-	-	-	-	-	-	-	42-56
Sub-clonagem do cDNA da TnI em M13mp18	-	-	-	-	-	-	-	42
Introdução de codons de terminação e sítios de restrição no cDNA da TnI por mutação sítio-dirigida por oligonucleotídeos	-	-	-	-	-	-	-	42
Subclonagem dos cDNAs mudados de TnI no vetor de expressão pET-3a	-	-	-	-	-	-	-	43
Expressão e purificação dos fragmentos recombinantes de TnI	-	-	-	-	-	-	-	45
TnI ₁₋₁₁₆	-	-	-	-	-	-	-	45
TnI ₁₋₉₈	-	-	-	-	-	-	-	45
TnI ₁₀₃₋₁₈₂	-	-	-	-	-	-	-	45
TnI ₁₂₀₋₁₈₂	-	-	-	-	-	-	-	45
ΔI-TnI	-	-	-	-	-	-	-	46
Determinação das condições de ensaio da atividade Mg ²⁺ -ATPásica da acto-miosina	-	-	-	-	-	-	-	46
Regulação da atividade Mg ²⁺ -ATPásica da acto-miosina pelos mutantes de TnI	-	-	-	-	-	-	-	47
Reconstituição e análise dos complexos terciários de troponina	-	-	-	-	-	-	-	48
Análise dos complexos entre fragmentos de TnI e mutantes de TnC usando géis de poliacrilamida-uréia e poliacrilamida-glicerol	-	-	-	-	-	-	-	48
Figuras 8-21	-	-	-	-	-	-	-	49B-P
Espectros de fluorescência dos complexos entre fragmentos da TnI e mutantes de TnC	-	-	-	-	-	-	-	50
TnI ₁₋₉₈	-	-	-	-	-	-	-	50
TnI ₁₋₁₁₆	-	-	-	-	-	-	-	51
TnI ₁₋₁₅₆	-	-	-	-	-	-	-	52
TnI ₁₀₃₋₁₈₂	-	-	-	-	-	-	-	52
Determinação das constantes de ligação entre os fragmentos da TnI e a TnC através de titulações de fluorescência	-	-	-	-	-	-	-	53
TnI ₁₋₉₈	-	-	-	-	-	-	-	53
TnI ₁₋₁₁₆	-	-	-	-	-	-	-	54

TnI ₁₋₁₅₆ - - - - -	54
TnI ₁₀₃₋₁₈₂ - - - - -	54
Titulações de forma sigmoideal - - -	55
Estequiometria dos complexos - - -	55
Figuras 22-29 e Tabelas 1-5 - - -	56B-O
DISCUSSÃO - - - - -	57-77
Estrutura do complexo TnI-TnC - - -	57
Estudos de eletroforese - - -	58
Estudos de fluorescência:	
I) Características gerais dos espectros de emissão das TnCs fluorescentes -	60
II) Espectros de emissão dos complexos entre fragmentos de TnI e as TnCs fluorescentes - - -	62
III) Titulações de fluorescência - -	65
IV) Comparação dos resultados dos estudos de electroforese e fluorescência - - -	66
Mais um modelo da interação entre a região inibitória e a TnC - - -	67
Interações entre TnI e TnT e a organização do complexo terciário da troponina - - -	69
Reconstituição dos complexos terciários - -	69
Modo de interação entre TnI e TnT. Uma possível interação "coiled-coil"? - - -	70
Propriedades regulatórias dos fragmentos da TnI - -	73
Conclusão - - - - -	76
Figuras 30-31 - - - - -	77B-D
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - - - - -	78

PUBLICAÇÃO - - - - - 87

CURRICULUM VITAE - - - - - 88

ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

ATP: adenosina trifosfato

CaM: calmodulina

DANZ: danzyl aziridina

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno-diamino-tetracético

EGTA: ácido etileno-glicol-bis (β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetracético

ELC: cadeia leve essencial da miosina

HMM: meromiosina pesada (heavy meromyosin)

Ip: peptídeo inibitória da TnI (aminoácidos 104-115)

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kb: quilobase

MLCK: quinase da cadeia leve da miosin

PAGE: gel de poliacrilamida

pCa: $-\log[\text{Ca}^{2+}]$

Pi: fosfato inorgânico

O.D.: densidade óptica

RF: forma replicativa do vírus M13

RLC: cadeia leve regulatória da miosina

SDS: dodecil sulfato de sódio

TCA: ácido tricloroacético

Tn: troponina

TnC: troponina C

TnI: troponina I

TnT: troponina T

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

Xgal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosídeo

wt: tipo selvagem ("wild-type")

RESUMO

O complexo troponina-tropomiosina regula a contração muscular esquelética e cardíaca. A ligação do cálcio nos sítios regulatórios localizados no domínio N-terminal da troponina C (TnC) induz uma mudança conformacional que remove a ação inibitória da troponina I (TnI) e inicia a contração muscular. Nós usamos fragmentos recombinantes da TnI e uma série de mutantes da TnC para estudar as interações estruturais e regulatórias das diferentes regiões da TnI com os domínios da TnC, TnT e actina-tropomiosina. Nossos resultados indicam que a TnI é organizada em regiões que apresentam funções estruturais e regulatórias e que se ligam de modo antiparalelo com os correspondentes domínios estruturais e regulatórios da TnC. Estudos funcionais mostram que a região inibitória (aminoácidos 103-116) em combinação com a região C-terminal da TnI (TnI₁₀₃₋₁₈₂) pode regular a atividade ATPásica da acto-miosina de maneira dependente de Ca^{2+} . A regulação não é observada com a região inibitória em combinação com a região N-terminal (TnI₁₋₁₁₆). Estudos de ligação mostram que a região N-terminal da TnI (TnI₁₋₉₈) interage com o domínio C-terminal da TnC na presença e na ausência de Ca^{2+} e também interage com a TnT. A região inibitória/C-terminal da TnI (TnI₁₀₃₋₁₈₂) interage com o domínio N-terminal da TnC de maneira dependente de Ca^{2+} . Baseados nestes resultados, propomos um modelo para a mudança conformacional induzida pelo Ca^{2+} . Neste modelo, a região N-terminal da TnI está ligada fortemente com o domínio C-terminal da TnC na presença ou na ausência de Ca^{2+} . As regiões inibitórias e C-terminal da TnI ligam-se à actina-tropomiosina na ausência de Ca^{2+} e nos domínios N-terminal e C-terminal da TnC na presença de Ca^{2+} .

SUMMARY

The troponin-tropomyosin complex regulates skeletal and cardiac muscle contraction. Calcium binding to the regulatory sites in the N-terminal domain of troponin C (TnC), induces a conformational change which removes the inhibitory action of troponin I (TnI) and initiates muscular contraction. We used recombinant TnI fragments and a series of TnC mutants to study the structural and regulatory interactions between different TnI regions and the domains of TnC, TnT and actin-tropomyosin. Our results indicate that TnI is organized into regions with distinct structural and regulatory functions which bind, in an antiparallel manner, with the corresponding structural and regulatory domains of TnC. Functional studies show that a fragment containing the inhibitory and C-terminal regions of TnI (TnI₁₀₃₋₁₈₂) can regulate the actomyosin ATPase in a Ca²⁺-dependent manner. Regulation was not observed with a fragment containing the N-terminal and inhibitory regions (TnI₁₋₁₁₆). Binding studies show that the N-terminal region of TnI (TnI₁₋₉₈) interacts with the C-terminal domain of TnC in the presence of Ca²⁺ or Mg²⁺. The inhibitory/C-terminal region of TnI (TnI₁₀₃₋₁₈₂) binds to the N-terminal domain of TnC in a Ca²⁺-dependent manner. Based on these results, we propose a model for the Ca²⁺-induced conformational change. In this model the N-terminal region of TnI is bound strongly to the C-terminal domain of TnC in the presence or absence of Ca²⁺. The inhibitory and C-terminal regions of TnI bind to actin-tropomyosin in the absence of Ca²⁺ and to the N- and C-terminal domains of TnC in the presence of Ca²⁺.

PREFÁCIO

Esta tese está dividida em quatro seções principais: *Introdução*, *Materiais e Métodos*, *Resultados* e *Discussão*. A seção de *Resultados* é dividida em duas partes. A primeira parte trata de resultados relacionados com a construção e expressão de mutantes da TnI e caracterização dos mesmos com respeito às atividades regulatórias e à formação de complexos entre mutantes da TnI e mutantes da TnC. Tais resultados já foram publicados e estão apresentados resumidamente. Uma cópia deste trabalho encontra-se anexada no final da tese. A segunda parte dos *Resultados* apresenta estudos flourimétricos da interação TnI-TnC. Estes estudos ainda não foram publicados e estão apresentados com todo os detalhes. Para facilitar a leitura da tese as Figuras e Tabelas estão agrupadas no final da *Introdução*, no final de cada parte dos *Resultados* e no final da *Discussão*.

INTRODUÇÃO

Como a energia química do ATP é convertida em movimento ou em força mecânica pelo músculo? Quais são os mecanismos pelos quais a interação entre a actina e a miosina é controlada pelo níveis intracelulares do íon Ca^{2+} ?

Cinquenta anos após Szent-Gyorgyi (1942) ter descoberto que a acto-miosina se contrai em uma solução contendo ATP e trinta anos após Ebashi (1963) ter demonstrado que os níveis de Ca^{2+} regulam a interação acto-miosina, estas duas perguntas ainda são centrais para a biologia molecular do músculo. Quanto mais descobrimos sobre estes mecanismos, mais entendemos que eles estão intimamente interligados e que não podemos entender um sem compreender o outro.

Com este trabalho pretendemos avançar um pouco em relação à segunda pergunta acima, ou seja, compreender melhor o mecanismo regulatório da contração muscular.

O complexo troponina é o interruptor da interação acto-miosina, respondendo aos níveis de Ca^{2+} nos músculos esqueléticos e cardíacos dos vertebrados (Ebashi e Kodama, 1966). Situado nos filamentos finos destes músculos estriados, este complexo terciário inibe a contração muscular na ausência de Ca^{2+} e libera a interação entre a actina e a miosina na presença de níveis micromolares de Ca^{2+} . Neste projeto utilizamos subunidades recombinantes de troponina para investigar a estrutura e o mecanismo regulatório deste interruptor molecular.

Visão geral da contração muscular

O músculo esquelético dos vertebrados é um tecido altamente organizado e diferenciado, sendo caracterizado por estrias transversais de zonas anisotrópicas (bandas A) e zonas isotrópicas (bandas I) (Fig. 1D). A unidade básica da organização da miofibrila é o sarcômero. Do centro de cada sarcômero (a linha M no meio da banda A) irradiam os filamentos grossos de miosina, que se interdigitam com os filamentos finos da actina, os

quais se originam nas linhas Z (no meio da banda I). Quando o músculo contrai, a zona de interdigitação aumenta em tamanho e a distância entre a linha Z e a linha M diminui, ou seja, a banda A não muda em tamanho, mas a banda I diminui em comprimento (Figs. 1A, C).

Para explicar as mudanças nas dimensões das regiões do sarcômero e como a geração de força é correlacionada com a velocidade de encurtamento do músculo e com a quantidade de interdigitação entre os filamentos, A.F. Huxley (1957) propôs que deveriam existir geradores de força independentes agindo na zona de interdigitação causando o deslizamento relativo dos filamentos e/ou a geração da força durante a contração. Micrografias eletrônicas revelaram conexões ou pontes cruzadas ("cross bridges", Fig. 1) entre os filamentos finos e grossos, as quais foram identificadas como as geradoras de força. Nesta hipótese, a ação dos geradores de força seria cíclica, com cada ciclo acoplado à hidrólise de uma molécula de ATP (Fig. 1B).

As proteínas principais do músculo são a miosina e a actina, ambas polimerizam para formar os filamentos grossos e finos, respectivamente. As pontes-cruzadas observadas nas micrografias eletrônicas entre os dois tipos de filamentos fazem parte dos dois domínios globulares ("cabeças") de miosina que contêm os sítios de ligação da actina e do ATP. Os filamentos finos e grossos são arranjados em uma matriz hexagonal, onde cada filamento fino é cercado por três filamentos grossos e cada filamento grosso é cercado por seis filamentos finos (Fig. 1D; Huxley, 1969). Esta organização supramolecular garante que cada cabeça de miosina esteja sempre próxima a um filamento de actina.

Em todos os tipos de músculo, a transição do estado relaxado para o estado contraído é mediada pelas concentrações intracelulares de Ca^{2+} . No músculo esquelético e cardíaco dos vertebrados, o sensor destes níveis é o complexo troponina-tropomiosina associado com os filamentos de actina (Fig. 2A). Cada complexo troponina-tropomiosina funciona como um interruptor que regula o estado de pelo menos sete actinas, inibindo ou ativando a interação ATPásica entre a actina e a miosina de uma maneira dependente de Ca^{2+} . A actina associada ao complexo troponina-tropomiosina ("actina regulada") pode ser purificada a partir de tecido muscular ou reconstituída a partir de seus componentes purificados *in vitro* (Greaser e Gergeley, 1971, 1973). Quando a actina regulada se combina com a miosina ou com as

cabeças de miosina (S1), exibe muitas propriedades físicas, enzimáticas e regulatórias das fibras musculares. A atividade Mg^{2+} -ATPásica da acto-miosina regulada *in vitro* pode ser correlacionada com a contração muscular *in vivo* (Adelstein e Eisenberg, 1980; Brenner, 1990).

A troponina-tropomiosina tem quatro componentes: a tropomiosina e as três subunidades do complexo troponina (Fig. 2A). A tropomiosina é uma proteína com estrutura tipo "coiled-coil" formada por duas α -hélices paralelas. A molécula forma filamentos a partir de interações cabeça-cauda das extremidades N- e C-terminais das moléculas vizinhas (McLacelan e Stewart, 1975) e estes filamentos ligam-se a cada uma das duas fitas de actina no filamento fino (Fig. 2A; Squire, 1981). O último terço C-terminal de cada molécula de tropomiosina liga-se à uma troponina. Cada troponina consiste de três subunidades: TnI (21 kDa), TnC (18 kDa), e TnT (31 kDa). A TnI é a subunidade necessária para a atividade inibitória da troponina. É uma proteína globular e básica mas a sua estrutura terciária ainda não é conhecida. A TnI liga-se à actina e a todas as outras subunidades do complexo troponina-tropomiosina (Ohtsuki et al, 1986; Zot et Potter, 1987). A ligação dos íons de Ca^{2+} à subunidade TnC remove a inibição. A TnT é responsável pela forte interação da troponina com a tropomiosina. Os 158 aminoácidos N-terminais da TnT têm uma estrutura altamente helicoidal e assimétrica, fazendo contatos com a tropomiosina. A região C-terminal da TnT é globular e faz contatos com a tropomiosina, com a TnI e com a TnC no complexo troponina (Tanokura et al., 1983; Pearlstone e Smillie, 1983; Tanokura e Ohtsuki, 1984; Heeley et al., 1987).

Uma visão geral do mecanismo regulatório da contração muscular é apresentada a seguir: Em concentrações fisiológicas de ATP e Mg^{2+} e em concentrações submicromolares de Ca^{2+} , o músculo é mantido no estado relaxado principalmente pela ação da TnI na actina-tropomiosina (Greaser e Gergeley, 1971, 1973; Perry et al., 1972). Neste estado, o complexo troponina-tropomiosina atua, ou bloqueando a ligação das cabeças de miosina na actina, ou mantendo o filamento da actina em uma determinada conformação na qual a ativação da atividade ATPásica da miosina pela actina fica inibida. Sob estimulação nervosa, o Ca^{2+} é liberado do retículo sarcoplasmático e liga-se à TnC. Uma mudança na conformação de TnC induzida pelo Ca^{2+} resulta em uma maior afinidade por TnI, que acaba diminuindo as

interações entre a TnI e a actina-tropomiosina. Através da tropomiosina, e possivelmente da TnT, a conformação do filamento fino muda de tal forma que permite a interação forte entre as cabeças da miosina e da actina e a contração é iniciada. Ciclos de contração e hidrólise de ATP (Fig. 1B) continuam até que a estimulação nervosa cesse e a concentração de Ca^{2+} diminua devido ao rebombeamento deste íon para o interior do retículo sarcoplasmático, resultando na restauração da inibição e no relaxamento da fibra muscular.

Em vários músculos de invertebrados e em músculo liso de vertebrados, a atividade ATPásica da acto-miosina e a contração muscular são reguladas não pela troponina-tropomiosina, mas pela fosforilação dependente de Ca^{2+} das cadeias leves da miosina. Em alguns músculos de invertebrados, especialmente em moluscos, a contração é regulada pela ligação do Ca^{2+} nas cadeias leves de miosina (Adelstein e Eisenberg, 1980; Kendrick-Jones e Scholey, 1981). Estes sistemas de regulação não serão discutidos neste trabalho. Segue-se uma revisão mais detalhada dos estudos dos componentes regulatórios do músculo esquelético de vertebratos.

Actina

A actina é uma proteína ubíqua presente em todas as células eucarióticas. Ela tem um papel central na manutenção da estrutura celular, na motilidade e, em adição, uma função mais especializada na contração muscular. Esta proteína tem aproximadamente 375 aminoácidos, altamente conservados durante a evolução. Existem seis isoformas de actina nos mamíferos: a esquelética e a cardíaca dos músculos estriados, a vascular e a visceral dos músculos lisos e as isoformas β e γ das células não-musculares (Kabsch e Vandekerckhove, 1992).

Em baixa força iônica, a actina existe na forma monomérica (G-actina). No entanto, nas forças iônicas fisiológicas, ela se polimeriza em filamentos (F-actina). O Mg^{2+} -ATP liga-se à actina e é hidrolizado quando a actina se polimeriza. *In vivo*, a polimerização/despolimerização da actina é central para as funções regulatórias da molécula, sendo regulada pelos íons divalentes e pelas várias proteínas que se ligam à actina.

A G-actina foi recentemente cristalizada na forma complexada com a DNaseI e a estrutura determinada com uma resolução de 2.8 Å (Kabsch et al., 1990). A molécula tem dois domínios: o domínio chamado "pequeno" e o domínio chamado "grande", de tamanhos aproximadamente iguais. O domínio "pequeno" é formado pelos sub-domínios 1 e 2 e o domínio "grande" é formado pelos sub-domínios 3 e 4. A orientação relativa dos domínios é estabilizada pelas interações com o nucleotídeo e o íon metálico divalente (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) ligados no centro da molécula (Kabsch et al., 1990). A importância dos contatos da proteína com o nucleotídeo é ilustrada pelo fato de que a retirada do nucleotídeo induz a desnaturação irreversível da actina (Kabsch e Vandekerckhove, 1992). Os sub-domínios 1 e 3 têm homologias significantes em sequência e estrutura e são relacionados por um eixo de simetria dupla (Kabsch e Vandekerckhove, 1992).

A estrutura da fibra da F-actina foi obtida em baixa resolução por microscopia eletrônica (Hanson e Lowy, 1963) e por difração de raios-X (Moore et al., 1970), fornecendo assim as dimensões do polímero. Um modelo atômico da F-actina foi construído usando-se a estrutura de alta resolução da G-actina e o mapa de densidade eletrônica da F-actina (Holmes et al., 1990). A fibra (diâmetro ~ 100 Å) pode ser visualizada como uma hélice de fita simples com uma rotação de $-166^\circ/\text{monômero}$ (2,2 monômeros por volta) ou como uma hélice de fita dupla com uma rotação de $27,4^\circ/\text{monômero}$ (13 monômeros por volta, Fig. 2A) (Holmes et al., 1990). Neste modelo, o domínio pequeno está localizado distalmente ao eixo da fibra, enquanto o domínio grande está localizado no interior da fibra.

Miosina

As miosinas pertencem a uma das três famílias de motores moleculares. Junto com as dineínas e kinesinas, as miosinas acoplam a hidrólise do ATP com o movimento das células, de membranas, de organelas, e de estruturas macromoleculares. Entre estas moléculas, a miosina é a melhor conhecida devido a uma longa história de pesquisa sobre a fisiologia da contração muscular e sobre a interação acto-miosina (Needham, 1971; Squire, 1981).

A miosina muscular (520 kDa) é uma proteína hexamérica composta por duas cadeias pesadas (2 x 220 kDa) e por dois pares de duas cadeias leves diferentes: a cadeia leve essencial (2 isoformas: ELC1 e ELC2 ou ALC1 e ALC2 ou LC1 e LC3; 20.7 e 16.6 kDa) e a cadeia leve regulatória (1 isoforma: RLC ou LC2 ou DTNB-LC, 19 kDa) (Wagner, 1982). Sob o microscópio eletrônico, monômeros de miosina (1700 - 1800 Å em comprimento) aparecem como caudas ("rods") compridas com duas cabeças na mesma extremidade. A cauda e as cabeças (fragmento S1) de miosina podem ser separadas pela digestão com papaína (Margossian and Lowey, 1982).

A cauda possui uma estrutura em "coiled-coil" da qual participam as duas cadeias pesadas (de 1500 Å de comprimento). As α -hélices da "coiled-coil" têm repetições de sete aminoácidos (**abcdefg**). Interações entre resíduos hidrofóbicos nas posições **a** e **d** estabilizam esta estrutura. Conforme demonstrado por Lowey et al. (1969), as caudas de miosina purificadas têm a habilidade de polimerizar, mas não têm atividade ATPásica e não se ligam à actina.

A cabeça globular da miosina obtida com papaína (S1, ~ 130 kDa) contém a região N-terminal de uma cadeia pesada (95 kDa) e duas cadeias leves (Fig. 2B). Esta região contém os sítios de ligação para actina; também possui atividade ATPásica e pode substituir a miosina em um ensaio de motilidade *in vitro* (Toyoshima et al., 1989). O tratamento de S1 com tripsina libera três fragmentos da cadeia pesada que, começando do N-terminal do polipeptídeo, têm pesos moleculares de 25, 50 e 20 kDa (Fig. 2B). A região correspondente ao fragmento de 25 kDa está envolvida com a ligação do nucleotídeo (Szilagyi et al., 1979) e as regiões 50 e 20 kDa estão envolvidas com a ligação de actina (Mornet et al., 1981; Sutoh, 1982).

A S1 foi recentemente cristalizada (Fig 2B; Rayment et al., 1993a). Este complexo terciário é globular e alongado com dimensões de 98 Å x 124 Å x 274 Å e com a forma de uma pêra. A molécula é curvada ao longo do eixo maior, revelando superfícies côncavas e convexas. O lado mais fino tem as duas cadeias leves ligadas a uma hélice longa (85 Å) que corresponde à última parte do fragmento de 20 kDa da cadeia pesada. As estruturas destas duas cadeias leves estão relacionadas com outras proteínas da família das "EF-hand" que

ligam Ca^{2+} (da Silva e Reinach, 1992).

O lado mais grosso da S1 é formado pelas regiões de 25 e 50 kDa e a primeira parte da região 20 kDa da cadeia pesada (Fig. 2B). A região 25 kDa está localizada no centro da cabeça da miosina e forma o sítio de ligação de ATP que se abre na superfície côncava. Os resíduos que interagem com o fosfato do ATP estão localizados no centro do domínio globular, portanto a ligação da base do nucleotídeo ocorre perto da superfície. A região 50 kDa está localizada na ponta mais grossa da cabeça da miosina e pode ser dividida em dois domínios: superior e inferior. Estes domínios são separados por uma fenda ("cleft") longitudinal que começa perto do fundo do sítio de ligação de ATP e abre-se na extremidade mais grossa da cabeça (Fig. 2B). Os resíduos da miosina localizados na abertura desta fenda estão associados com a interação com a actina. Esta estrutura da miosina S1 revela que os sítios de ligação de ATP e actina estão separados por uma distância significativa (40-60 Å) e sugere que uma possível rota de comunicação entre os sítios pode estar localizada entre o fundo do sítio de ATP e o começo da fenda no centro da molécula (Rayment et al., 1993b).

Cinética e termodinâmica da interação ATPásica da acto-miosina

Os filamentos de actina e de miosina podem ser reconstituídos *in vitro* a partir de actina e miosina purificada. Os filamentos de miosina têm atividade ATPásica baixa, entretanto, uma mistura de filamentos de miosina e actina apresenta atividade ATPásica alta e insensível à presença de Ca^{2+} . No caso do músculo esquelético, a adição dos componentes do complexo regulatório troponina-tropomiosina resulta na atividade ATPásica dependente de Ca^{2+} .

A cinética e a termodinâmica das várias etapas do ciclo ATPásico da acto-miosina foram estudadas, tanto em fibras de músculo como em sistemas reconstituídos *in vitro*, usando-se actina e miosina (ou fragmentos de miosina) purificadas (vide revisões de Adelstein & Eisenberg, 1980; Brenner, 1990; Geeves, 1991; Chalovich, 1993). Estes estudos demonstraram que cada etapa do ciclo (ligação do ATP, hidrólise, e liberação dos produtos) pode acontecer com a miosina ligada ou não ligada à actina (Fig. 2C). O que realmente

acontece é determinado pela afinidade das várias espécies diferentes de miosina pela actina. Estes estudos de cinética e termodinâmica são consistentes com as seguintes características do ciclo ATPásico (Fig. 2C): i) Na ausência do nucleotídeo, a afinidade da miosina pela actina é alta. ii) A ligação do ATP na acto-miosina diminui a afinidade da miosina pela actina. iii) A hidrólise do ATP ligado à miosina ocorre mais rápido do que a reação total, tanto na presença como na ausência da actina. iv) Na ausência de actina, as constantes de dissociação, tanto para Pi como para ADP, são baixas e a velocidade da reação total é limitada pela liberação dos produtos (Lymn and Taylor, 1971). v) O complexo miosina-ADP-Pi liga actina com aproximadamente a mesma afinidade da miosina-ATP, no entanto com a ligação da actina, a liberação dos produtos ADP e Pi é acelerada. A aceleração destas etapas é a base da ativação da ATPase da miosina pela actina. vi) As mudanças conformacionais na cabeça da miosina ligada à liberação dos produtos é chamada de "power stroke." Durante a liberação dos produtos, a interação acto-miosina está fortalecida em aproximadamente 3000 vezes ($K_{A-M_{ADP-Pi}} < K_{A-M_{ADP}} < K_{A-M}$) e é provavelmente importante para acoplar a energia liberada na hidrólise do ATP com o movimento dos filamentos. No fim deste "power stroke", a miosina pode ligar ATP de novo e dissociar-se da actina para recomeçar o ciclo da ATPase (Adelstein & Eisenberg, 1980; Brenner, 1990; Geeves, 1991, Chalovich, 1993).

Modelos moleculares da interação acto-miosina

A estrutura atômica da miosina S1 na ausência do nucleotídeo (Rayment et al., 1993a; Fig. 2B), o modelo atômico do filamento da actina (Holmes et al., 1990) e o mapa eletrônico de baixa resolução do filamento de actina decorada com a miosina S1 na ausência do nucleotídeo (Vale, 1992) foram usados para construir um modelo atômico da interação entre a actina e a miosina (Rayment et al., 1993b). Deste estudo surgiu uma hipótese sobre as mudanças estruturais que ocorrem na cabeça durante o ciclo ATPásico (Fig. 2D; Rayment et al., 1993b). As características principais desta hipótese são:

i) No começo do ciclo a cabeça da miosina está ligada fortemente ao filamento da actina no *rigor* - uma conformação onde o sítio do ATP está aberto e vazio, a fenda entre os domínios superior e inferior fechada, e o eixo comprido da cabeça da miosina formando

um ângulo agudo com o eixo comprido do filamento fino.

ii) A ligação do ATP na cabeça da miosina é um processo de duas etapas (Geeves, 1991). Inicialmente, a ligação do grupo fosfato no fundo do sítio do ATP faz com que a fenda entre os domínios superior e inferior abra e consequentemente enfraqueça a interação da miosina com a actina, resultando na dissociação do complexo acto-miosina.

iii) A ligação da base adenina ao sítio de ligação do nucleotídeo causa o fechamento deste sítio, resultando em uma mudança conformacional na cabeça da miosina que se move em um arco de aproximadamente 50 Å na direção da linha M no centro do sarcômero ("pointed end" do filamento fino). No fim deste movimento, o eixo maior da cabeça da miosina está perpendicular ao eixo maior do filamento fino. Durante esta mudança conformacional, o ATP é hidrolisado mas os produtos ADP e Pi continuam ligados na miosina.

iv) A ligação do complexo miosina-ADP-Pi à actina é um processo de várias etapas que primeiro envolve o domínio inferior da cabeça da miosina, seguido pela ligação do domínio superior. Esta ligação abre a fenda entre os dois domínios, diminuindo a interação com o fosfato ligado. A dissociação do grupo fosfato fortalece a interação acto-miosina e inicia o "power stroke".

v) O "power stroke" é essencialmente o reverso da mudança conformacional induzida na cabeça da miosina quando o ATP se liga. Contudo, esta mudança conformacional ocorre quando a cabeça da miosina se encontra ligada fortemente à actina. A dissociação do ADP resulta em uma abertura do sítio da ligação do ATP e num movimento angular de 50 Å da cabeça da miosina na direção da linha Z e o deslizamento relativo dos filamentos finos e grossos. O fim do "power stroke" corresponde ao estado do *rigor* e o começo de um novo ciclo.

Uma preparação de miosina contendo apenas a cadeia pesada completa, sem os dois tipos de cadeias leves, foi recentemente preparada por Lowey et al. (1993). Esta cadeia pesada também possui atividade Mg^{2+} -ATPásica ativada pela actina, mas reduz a velocidade dos filamentos da actina em 90%. Foi proposto que, no músculo esquelético dos vertebrados, as cadeias leves não sejam importantes para a interação acto-miosina *per se*, mas são necessárias para a conversão da mudança conformacional na cabeça da miosina em movimento relativo dos dois filamentos. Lowey et al. (1993) propuseram que as cadeias leves

podem realizar esta função pelo endurecimento da dobradiça ("hinge") entre a cabeça da miosina ligada na actina e a cauda da miosina no corpo principal do filamento grosso. Deve ser lembrado que a contração de músculo liso é controlada pela fosforilação da cadeia leve regulatória e a contração de músculo de molusco é controlado pela ligação de Ca^{2+} à cadeia leve essencial (Adelstein e Eisenberg, 1981; Kendrick-Jones e Scholey, 1981).

Regulação da interação acto-miosina no músculo esquelético dos vertebrados.

A contração do músculo esquelético é regulada pela ligação de Ca^{2+} ao complexo troponina-tropomiosina ligado no filamento fino da actina (Fig. 2; vide revisões de Ohtsuki et al, 1986; Leavis e Gergely, 1984; Zot e Potter, 1987; da Silva e Reinach, 1991; Chalovich, 1992). Na ausência de Ca^{2+} , o complexo troponina-tropomiosina inibe a interação actomiosina, caracterizada pelo baixos níveis de atividade Mg^{2+} -ATPásica. Na presença da Ca^{2+} ($> 10^{-6}\text{M}$), a ligação deste íon à troponina remove a inibição e induz uma ativação da atividade ATPásica maior que a observada na ausência de troponina.

Em seguida, apresentamos uma revisão do que é conhecido sobre as estruturas e funções das subunidades do complexo regulatório troponina-tropomiosina.

Tropomiosina

A tropomiosina muscular é um dímero "coiled-coil" de duas cadeias polipeptídicas de 284 aminoácidos (Fig. 2A). No músculo esquelético, existem duas isoformas de tropomiosina (α e β) que diferem em 39 resíduos e todas as diferenças são conservativas (Mak et al., 1980). O músculo cardíaco de vertebrados possui só a isoforma α e o músculo esquelético apresenta as duas isoformas em proporções tecido-específicas (Cummins e Perry, 1972, 1973, 1974).

A sequência primária de todas as tropomiosinas musculares revela repetições de sete aminoácidos (**abcdefg**) sem interrupções, onde os resíduos nas posições **a** e **d** são

invariavelmente hidrofóbicos, os resíduos **e** e **g** tendem a ser carregados e os resíduos **b**, **c** e **f** tendem a ser polares (Smillie, 1979). Interações entre os resíduos hidrofóbicos das duas fitas estabilizam a estrutura "coiled-coil" que é adicionalmente estabilizada pelas pontes salinas entre os resíduos **e** e **g**.

Uma característica da tropomiosina é a tendência em polimerizar por meio de interações cabeça-cauda (McLachlan e Stewart, 1975), produzindo soluções viscosas devido à formação de filamentos, observados por difração de raios-X de baixa resolução (Phillips et al., 1979; White et al., 1987; Whitby et al., 1992). Outra evidência da interação cabeça-cauda é que deleções dos resíduos C-terminais de tropomiosina drasticamente reduzem a polimerização (Mak e Smillie, 1981; Bartegi et al., 1990).

Foi demonstrado que a acetilação do grupo α -amino é importante para a função da tropomiosina porque, na ausência de troponina, a tropomiosina recombinante não-acetilada não polimeriza e não liga actina. Contudo, a tropomiosina recombinante ainda pode ser usada para reconstituir a acto-miosina regulada pelo Ca^{2+} na presença de troponina (Hitchcock-DeGregori e Heald, 1987; Heald e Hitchcock-DeGregori, 1988; Cho et al., 1990; Monteiro et al., 1994). Fusões grandes no N-terminal recuperam a polimerização e a afinidade pela actina, mas abolem a regulação (Hitchcock-DeGregori, 1987; Heald e Hitchcock-DeGregori, 1988; Monteiro et al., 1994). Monteiro et al. (1994) demonstraram recentemente que uma tropomiosina recombinante com somente dois aminoácidos extras no N-terminal exibe todas as propriedades de tropomiosina nativa. Isto sugere que a neutralização da região N-terminal da proteína é importante para interações actina-tropomiosina e tropomiosina-tropomiosina. O deslocamento desta carga positiva pela pequena fusão de dois aminoácidos pode ser suficiente para recuperar as interações corretas.

A tropomiosina liga actina com alta afinidade (K_a intrínseco = $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e cooperatividade (K_a total = $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$; Hill et al., 1992) com a proporção de ligação actina:tropomiosina = 7:1 (Potter, 1974; Potter e Gergely, 1974). Esta razão é consistente com a ligação de um polímero de tropomiosina em cada uma das duas hélices "long-pitch" de actina. Neste esquema, cada tropomiosina faz contatos com sete actinas (Fig. 2; Cohen et al., 1972; Parry e Squire, 1973). Alterações nas pontes entre tropomiosinas, que diminuem

a afinidade intrínseca para a actina, afetam relativamente pouco a cooperatividade da ligação (Willadsen et al., 1992; Butters et al., 1993). Esta observação colocou em dúvida o pensamento tradicional de que as interações cabeça-cauda sejam responsáveis pela cooperatividade da ligação da tropomiosina com a actina. Tobacman e colaboradores sugerem que a cooperatividade é mediada pelas mudanças conformacionais na estrutura da actina induzida pela tropomiosina (Butters et al., 1993).

A tropomiosina inibe a atividade Mg^{2+} -ATPásica da acto-miosina, quando a razão da miosina:actina é baixa, mas ativa a ATPase em altas proporções de miosina:actina (Eaton et al., 1974; Côté e Smillie, 1981). Este efeito duplo pode estar relacionado com as duas posições diferentes de ligação da tropomiosina nos filamentos de actina observadas por difração de raio X (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972; Parry e Squire, 1973) e com reconstruções em três dimensões de micrografias eletrônicas de filamentos finos na presença e na ausência de Ca^{2+} (Lehman et al., 1994). A Figura 3 mostra um modelo das posições adotadas pela tropomiosina no músculo relaxado (Fig 3A) e no músculo contraído (Fig 3B). No músculo relaxado, a tropomiosina está localizada fora da fenda ("groove") da hélice "long pitch" longe do eixo do filamento fino. Nesta posição, a tropomiosina está bloqueando fisicamente a interação entre a actina e a miosina. No músculo ativamente contraído, a tropomiosina está mais próxima da fenda e mais próxima ao eixo da fibra. Nesta posição, o sítio de ligação de miosina na actina está exposto. Esta hipótese é chamada de "modelo de bloqueamento estérico" (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972, Parry e Squire, 1973) porque a regulação é feita graças à interferência física da interação acto-miosina. Este modelo assume a ligação da tropomiosina e da miosina nos mesmos sítios ou a sítios próximos na actina. A evidência que apóia este modelo foi obtida a partir de estudos de proteção química que demonstraram que alguns resíduos de actina protegidos pela ligação de S1 também estão protegidos pela tropomiosina (El-Saleh et al., 1984; Szilagyi e Lu, 1982; Johnson e Blazyk, 1978; Kabsch e Vandekerckhove, 1992). Por outro lado, estudos de cinética e termodinâmica da interação acto-miosina na presença de troponina-tropomiosina demonstraram que, nas condições onde a atividade ATPásica é sensível ao nível de Ca^{2+} , as afinidades entre miosina (com ATP ou ADP+Pi ligada) e actina-tropomiosina-troponina, na presença e na ausência de Ca^{2+} , são aproximadamente iguais (Chalovich e Eisenberg, 1982), ao contrário do que deveria ser observado com o mecanismo de bloqueamento estérico.

O complexo terciário de troponina tem várias interações com a tropomiosina e com a actina. Uma troponina associa-se com cada molécula de tropomiosina e o sítio de ligação está localizado a 2/3 de distância do N-terminal da tropomiosina perto da cisteína 190 (Ohtsuki, 1979; Flicker et al., 1982). A ligação entre troponina e tropomiosina é devida a uma forte interação entre a tropomiosina e a subunidade TnT (vide abaixo). No músculo esquelético, a ligação de Ca^{2+} na troponina regula a interação acto-miosina. Segundo o modelo de bloqueamento estérico, a troponina regula a posição da tropomiosina na fibra de actina e inibe a etapa da ligação entre miosina-ADP-Pi e actina na ausência de Ca^{2+} (etapa (3) em Fig. 1B). Segundo modelos de regulação cinética, o complexo troponina-tropomiosina inibe uma etapa cinética, que ocorre depois de ligação de miosina-ADP-Pi (durante etapa (4) em Fig. 1B), provavelmente o desligamento de Pi, na ausência de Ca^{2+} (Chalovich e Eisenberg, 1982). Os dois tipos de modelo não são necessariamente excludentes. Mudanças Ca^{2+} -dependentes na posição do complexo troponina-tropomiosina podem regular a interação acto-miosina pela inibição de uma transição durante o "power stroke" (Fig. 2D).

Em seguida, faremos uma revisão da estrutura e função das subunidades do complexo troponina.

Troponina T

A TnT é a subunidade da troponina na qual a tropomiosina se liga (Greaser e Gergely, 1971, 1973). Esta proteína é assimétrica em termos de estrutura e carga (Zot e Potter, 1987). A região N-terminal da TnT (fragmento T1; aminoácidos 1-158) tem carga total negativa e uma estrutura altamente assimétrica. Esta região espalha-se ao longo do último terço C-terminal da tropomiosina, chegando à região de sobreposição da cabeça-cauda da tropomiosina (Wakabayashi et al., 1975; Mak et al., 1983; White et al., 1987). A região C-terminal da TnT (fragmento T2; aminoácidos 159-258) tem carga positiva, é globular e faz contatos tanto com a tropomiosina como com a TnI e TnC (Tanokura et al., 1983; Pearlstone e Smillie, 1983; Tanokura e Ohtsuki, 1984; Heeley et al., 1987). TnTs recombinantes foram expressas recentemente por vários grupos (Hill et al., 1992; Pan e Potter, 1992; Farah et al., 1994).

A TnT aumenta a afinidade da tropomiosina pela actina e recupera a habilidade das tropomiosinas não-polimerizáveis de ligar actina (Heeley et al., 1987). A partir de estudos com fragmentos proteolíticos da TnT, Pearlstone e Smillie (1982) propuseram que os aminoácidos 71-151 podem representar o sítio onde a TnT interage com a região cabeça-cauda da tropomiosina. Estudos da interação da região N-terminal da TnT com a tropomiosina revelaram que os primeiros 45 aminoácidos não são necessários para a TnT se ligar à tropomiosina, nem para as propriedades regulatórias do complexo troponina (Pan et al., 1991).

A interação entre TnT e TnC acontece tanto na presença como na ausência de metais divalentes (Grabarek et al., 1981). Muitos estudos foram feitos para determinar se existem interações entre TnT e TnC que sejam dependentes de Ca^{2+} ou $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Utilizando geis de eletroforese, van Erd e Kawasaki (1973) observaram maiores bandas mais intensas de complexos entre TnT e TnC na presença de Ca^{2+} do que na ausência de Ca^{2+} . O experimento na presença de Mg^{2+} não foi feito. Utilizando uma sistema semelhante, B. Malnic (comunicação pessoal) observou complexos TnT-TnC na presença de Ca^{2+} , mas não na presença de Mg^{2+} . Pearlstone e Smillie (1978) observaram que fragmentos proteolíticos derivados do lado C-terminal da TnT ligam-se a uma coluna da afinidade da TnC mais fortemente na presença de Ca^{2+} do que na presença de Mg^{2+} . Pearlstone e Smillie (1983) demonstraram que a interação entre a tropomiosina e o complexo T2-TnC-TnI é mais forte na ausência do que na presença de Ca^{2+} . Eles interpretaram este resultado como evidência para uma interação Ca^{2+} -dependente entre T2 e TnC. Infelizmente, neste estudo a ligação não foi medida na presença de Mg^{2+} (condição fisiológica do músculo relaxado). Ingraham e Swenson (1984), utilizando subunidades de troponina marcadas com grupos fluorescentes, determinaram as constantes de associação entre TnT e TnC na presença de Ca^{2+} , na presença de Mg^{2+} ($K_{a_{\text{Ca}}} = K_{a_{\text{Mg}}} \sim 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) e na ausência de íons divalentes ($K_{a_{\text{EDTA}}} \sim 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), concluindo que não existe uma interação Ca^{2+} -específica entre estas duas proteínas. Cheung et al. (1987), num estudo semelhante obtiveram a mesma conclusão, observando somente um pequeno aumento na estabilidade na presença de Ca^{2+} ($K_{a_{\text{Ca}}} = 7.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $K_{a_{\text{Mg}}} = 4.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $K_{a_{\text{EGTA}}} = 5.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). É difícil reconciliar os resultados diferentes dos estudos de eletroforese e de cromatografia, que detectaram efeitos dependentes de Ca^{2+} , e as titulações fluorométricas que mediram constantes de afinidade semelhantes na presença de

Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Uma possível explicação para isso é que as constantes cinéticas de ligação e desligamento na presença de Mg^{2+} podem ser menores do que na presença de Ca^{2+} . Se isto for o caso, os métodos de eletroforese e cromatografia, que tendem a separar fisicamente os componentes durante o experimento, podem dar a impressão de que a constante de associação é menor na presença de Mg^{2+} .

As proteínas TnT e TnI associam-se com uma constante de afinidade de aproximadamente $0.5-1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Ingraham e Swenson, 1984). As regiões da TnI onde a TnT se liga foram investigadas pela proteção química de lisinas (Hitchcock-DeGregori, 1982) ou cisteínas (Chong e Hodges, 1982). Os dois grupos concluíram que a TnT liga-se aos aminoácidos 40-98 da TnI.

A adição de TnC à uma mistura de actina, tropomiosina e TnI resulta na dissociação de TnI do filamento fino (Potter e Gergely, 1974; Hitchcock, 1975). A TnT é necessária para fixar TnI e TnC no filamento fino na presença de Ca^{2+} (Potter e Gergely, 1974). Este fato provavelmente explica por que a TnT é necessária para reconstituir a acto-miosina regulada nas proporções fisiológicas de actina, tropomiosina e troponina (Greaser e Gergely, 1971, 1973; Farah et al., 1994).

Ainda não está bem definido se o papel da TnT é simplesmente aumentar a afinidade do complexo TnI-TnC pelo filamento fino ou localizar o complexo troponina na posição certa com respeito à tropomiosina e às sete actinas. Também não é bem conhecido se a TnT tem um papel específico no processo de inibição na ausência de Ca^{2+} ou na ativação na presença de Ca^{2+} . Uma evidência para um papel regulatório da TnT é que, na presença de Ca^{2+} , o complexo terciário de troponina ativa a atividade ATPásica de acto-miosina-tropomiosina a níveis acima do que é observado na ausência de troponina ou na presença do complexo binário de TnI-TnC ($+\text{Ca}^{2+}$) (Greaser e Gergely, 1971, 1974; Potter, 1982; Farah et al., 1994; Malnic e Reinach, 1994).

Troponina C

A troponina C (TnC) é a subunidade que liga Ca^{2+} (Greaser e Gergeley, 1971, 1973). Esta ligação é a primeira etapa da remoção da inibição da contração muscular.

A TnC é uma proteína ácida e globular com uma alta quantidade de α -hélice. Sua estrutura foi determinada por cristalografia (Fig. 4.; Herzberg e James, 1988; Sundaralingham et al., 1988). A estrutura está ilustrada na Figura 4. A TnC tem dois domínios: o domínio N-terminal (resíduos 1-89) e o domínio C-terminal (resíduos 90-162), conectados entre si por uma hélice central de 31 aminoácidos. A TnC é um membro da família das proteínas que ligam Ca^{2+} através de uma estrutura denominada "EF-hand." Outros membros desta família são a calmodulina, a parvalbumina e as cadeias leves de miosina (vide as revisões de Kretsinger, 1992; Strynadka e James, 1989, 1990; Marsden et al., 1990; da Silva e Reinach, 1991).

Cada domínio de TnC é constituído essencialmente de duas "EF-hands" (Strynadka e James, 1989). Esta estrutura é caracterizada por uma alça de 12 aminoácidos flanqueados por duas α -hélices perpendiculares. Os ligantes para os íons metálicos divalentes são fornecidos pelo resíduos 1, 3, 5, 7, 9 e 12 desta alça, utilizando os oxigênios das cadeias laterais, da cadeia principal, ou uma ponte de água. Quando o Ca^{2+} ocupa o sítio, está coordenado por sete oxigênios num arranjo pentagonal-bipirimidial; quando o Mg^{2+} ocupa o sítio, ele é cercado por seis oxigênios em arranjo octaédrico. Em cada domínio, os dois sítios de "EF-hands" estão ligados por um "linker" de 5 aminoácidos com estrutura de "random coil". Os sítios são numerados por ordem de localização na sequência primária: sítios I e II no domínio N-terminal e sítios III e IV no domínio C-terminal. As oito hélices das quatro "EF-hands" também são chamadas por ordem de aparecimento na sequência primária -hélices A e B do sítio I, hélices C e D do sítio II, hélices E e F do sítio III e hélices G e H do sítio IV. A TnC também tem uma hélice (hélice N) que precede a hélice A no domínio N-terminal (Fig. 4).

As duas "EF-hands" no domínio N-terminal de TnC ligam Ca^{2+} com uma afinidade relativamente baixa ($K_a = 10^5 \text{ M}^{-1}$; Potter e Gergely, 1975; Leavis et al., 1978). Estes sítios

também ligam Mg^{2+} , mas com afinidade muito baixa ($K_a = 2 - 3 \times 10^2 M^{-1}$; Johnson et al., 1978; Zot e Potter, 1987b). Os dois sítios no domínio C-terminal ligam Ca^{2+} com uma afinidade alta ($K_a = 10^7 M^{-1}$) e também podem ligar Mg^{2+} ($K_a = 10^3 M^{-1}$; Potter e Gergely, 1975). Os níveis de Mg^{2+} intracelular são suficientemente altos ($> 1 mM$) para ocupar os sítios III e IV mas não os sítios I e II (Zot e Potter, 1987a). Johnson et al. (1979) e Robertson et al., (1981) demonstraram que a cinética de trocar Mg^{2+} por Ca^{2+} nos sítios de alta afinidade ($5 s^{-1}$) não era suficientemente rápida para explicar a cinética de desenvolvimento de força nas fibras musculares quando Ca^{2+} é adicionado. Estes autores concluírem que a ligação de Ca^{2+} nos sítios Ca^{2+} -específicos (I e II) de baixa afinidade no domínio N-terminal da TnC é o primeiro acontecimento no filamento fino no processo de remover a inibição da interação acto-miosina.

A TnC pode ser seletivamente removida de fibras de músculo pelo tratamento com EDTA resultando numa fibra dessensibilizada que não pode ser ativada pelo Ca^{2+} (Cox et al., 1981; Zot e Potter, 1982). A TnC pode ser readicionada para produzir fibras que contraem na presença de Ca^{2+} (Zot e Potter, 1982). Utilizando-se este método, mutantes recombinantes de TnC foram estudados para determinar a importância das várias regiões de sua molécula. Fibras dessensibilizadas e reconstituídas com TnCs onde os sítios I ou II foram destruídos não recuperam a sensibilidade ao Ca^{2+} (Sheng et al., 1990; da Silva et al., 1994). Por outro lado, TnCs com sítios III ou IV destruídos podem ser usadas para ressensibilizar estas fibras; contudo, a ligação destas TnCs na fibra está enfraquecida (Negele et al., 1992; da Silva et al., 1994). Logo, como os sítios N-terminais de TnC são regulatórios, os sítios C-terminais têm uma função estrutural.

As estruturas da TnC na presença de Ca^{2+} , de Mg^{2+} , ou na ausência de metais, foram estudadas pelos vários métodos de espectroscopia incluindo dicroísmo circular, fluorescência e ressonância magnética nuclear (N.M.R.). Os resultados demonstraram que os estados dos dois domínios são sensíveis à espécie de íon ligado. As estimativas da quantidade de α -hélice na TnC sugerem que, na ausência de metais, o domínio C-terminal de TnC, mas não o domínio N-terminal, perde muito de sua estrutura α -helicoidal (vide revisões de Leavis e Gergely, 1984; Grabarek et al., 1992). Smillie e colaboradores criaram mutantes de TnC que têm triptofanos introduzidos nos domínios N-terminal ou C-terminal. A fluorescência destes

triptofanos é sensível à ligação de íons nos sítios onde estão localizados, mas são insensíveis à ligação de metais nos sítios de outro domínio (Pearlstone et al., 1992; Li et al., 1994; Chandra et al., 1994).

Muita atenção foi direcionada à elucidação da natureza da mudança estrutural induzida na TnC pela ligação de Ca^{2+} . Utilizando o fato fortuito de que, na estrutura da TnC cristalizada, os sítios do domínio C-terminal estão ocupados pelo Ca^{2+} , enquanto os sítios N-terminais estão vazios (Fig. 4B), Herzberg et al. (1986) propuseram que a estrutura do domínio N-terminal assume uma conformação semelhante ao domínio C-terminal quando o Ca^{2+} se liga (Fig. 4C). Na estrutura cristalográfica da TnC, o domínio C-terminal tem uma superfície hidrofóbica exposta ao solvente (Herzberg e James, 1988). Uma superfície hidrofóbica também existe no domínio N-terminal, mas está escondida. A característica chave deste modelo é que a ligação de Ca^{2+} resulta num movimento das hélices B e C e do "linker" entre elas, expondo a superfície hidrofóbica que estava escondida na estrutura do domínio N-terminal sem Ca^{2+} (Fig. 4C).

O modelo de Herzberg et al. (1986) foi testado em vários estudos usando-se mutantes recombinantes de TnC. Fujimori et al. (1990) converteram uma ponte carboxil-carboxilato entre as hélices C e D observada na estrutura cristalina (pH 5) para uma ponte salina. Estas pontes salinas devem estabilizar o estado Apo do domínio N-terminal e, como esperado, estes mutantes diminuíram a afinidade por Ca^{2+} dos sítios I e II. Grabarek et al. (1990) criaram uma TnC com uma ponte dissulfeto entre as hélices B e C para também estabilizar o estado Apo e bloquear a propriedade regulatória da proteína. A forma oxidada deste mutante não desinibiu a atividade ATPásica da acto-miosina na presença de Ca^{2+} . Da Silva et al. (1993) criaram dois mutantes que diminuíram a superfície hidrofóbica no domínio N-terminal de TnC, mudanças que devem estabilizar a ligação de Ca^{2+} . De acordo com o modelo de Herzberg et al (1986), estes mutantes demonstraram afinidades aumentadas pelo Ca^{2+} . Esta superfície hidrofóbica exposta, quando o Ca^{2+} se liga, presumivelmente é um sítio de ligação para os outros componentes regulatórios (possivelmente TnI, vide abaixo e da Silva e Reinach, 1992).

Os detalhes das diferentes estruturas da TnC com Mg^{2+} e/ou Ca^{2+} ligados e na

ausência de metais divalentes poderão ser brevemente elucidados a partir dos resultados de estudos realizados com espectroscopia de ressonância magnética dos domínios N-terminal e C-terminal, quando concluídos pelo grupo de Dr. Brian D. Sykes do University of Alberta, Canadá (comunicação particular).

A TnC não liga actina nem tropomiosina. Consequentemente, a mudança estrutural na TnC induzida pela ligação de Ca^{2+} é transmitida à actina pelas outras subunidades do complexo troponina.

Troponina I

A Troponina I foi originalmente caracterizada por Greaser e Gergely (1971, 1973) pelo seu efeito inibitório na atividade ATPásica da acto-miosina. É uma proteína altamente carregada e básica. Existem três isoformas em vertebratos: esquelética rápida, esquelética lenta e cardíaca. As isoformas esqueléticas de mamíferos e aves têm aproximadamente 180 aminoácidos e a isoforma cardíaca tem uma extensão N-terminal de aproximadamente 30 aminoácidos (Leszyk et al., 1988b; Kobayashi et al., 1989). Esta extensão N-terminal está também presente nas TnIs de invertebrados (Beall e Fryberg, 1991). A metade N-terminal de TnI é menos conservada do que a metade C-terminal (Fig. 5; Wilkinson e Grand, 1976; Baldwin et al., 1985; Leszyk et al., 1988b; Koppe et al., 1989; Kobayashi et al., 1989; Wade et al., 1990; Beall e Fyrberg, 1991).

O efeito inibitório da TnI está relacionado com a sua habilidade de interagir com actina e com actina-tropomiosina de maneira independente de Ca^{2+} (Perry et al., 1972, Greaser e Gergely, 1971, 1973). A inibição pela TnI é aumentada na presença de tropomiosina (Perry et al., 1972) e a atividade inibitória de TnI sozinha é bem menor do que a do complexo troponina inteiro (Ebashi et al., 1971; Farah et al., 1994). Logo, existe a possibilidade de que os mecanismos de inibição por TnI sozinha e no contexto do complexo troponina-tropomiosina sejam diferentes.

Syska et al. (1976) analisaram fragmentos proteolíticos de TnI e identificaram um

fragmento (CN4), correspondente aos resíduos 96-116, que liga actina e inibe a atividade ATPásica da acto-miosina. A atividade inibitória de CN4 corresponde a 45-75 % da atividade inibitória de TnI inteira. Syska et al. (1976) demonstraram que a atividade inibitória de CN4 é acentuada pela tropomiosina. Talbot e Hodges (1979, 1981) produziram peptídeos sintéticos correspondentes às sequências de CN4 e demonstraram que resíduos 104-115 contêm a sequência mínima requerida para a atividade inibitória. Este peptídeo inibitório (Ip) possui 45% de atividade inibitória da TnI.

Vários estudos foram feitos para mapear os resíduos desta região que interagem com a actina. Grand et al. (1982), utilizando espectroscopia de N.M.R., demonstraram que o ambiente em volta das argininas, localizadas predominantemente na metade C-terminal do fragmento CN4, mudam, quando a actina é adicionada (entretanto as argininas envolvidas não foram identificadas). Os espectros dos outros fragmentos de TnI não foram afetados pela actina. Grand et al. (1982) também observaram que os sinais dos aminoácidos Arg, Leu e/ou Val, Lys e Glu de TnI inteira são sensíveis à presença de actina, sugerindo que, depois da ligação na região inibitória, sequências fora desta região podem estar interagindo com a actina. Van Eyk e Hodges (1988) mudaram cada aminoácido do Ip para glicina e concluíram que cada cadeia lateral é importante para conseguir inibição máxima e alguns deles (resíduos 107, 111, 112, 114, 115) são essenciais.

A TnI liga-se fortemente à TnC (Potter, 1974; Potter e Gergely, 1974; Hitchcock, 1975; Head e Perry, 1976). A estabilidade do complexo é dependente da ligação de cátions divalentes à TnC (Head e Perry, 1976; Grabarek et al., 1981; Katayama e Nozaki, 1982). A ligação é mais forte na presença de Ca^{2+} ($K_a = 1.7 - 7.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), menos forte na presença de Mg^{2+} ($K_a = 0.6 - 1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) e menos forte ainda na ausência de cátions divalentes ($K_a = 0.8 - 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Ingraham e Swenson, 1984; Wang e Cheung, 1985). A TnC remove toda a atividade inibitória da TnI na presença de Ca^{2+} , mas não na ausência de Ca^{2+} (Perry et al., 1972; Greaser e Gergely, 1971, 1973; Ngai et al., 1992; Farah et al., 1994). Isto indica que mudanças conformacionais dependentes de Ca^{2+} no complexo TnI-TnC são centrais para o mecanismo de regulação do sistema troponina-tropomiosina. Além disso, interações entre TnI e TnC na ausência de Ca^{2+} devem ter uma função estrutural (vide revisões de Ohtsuki et al., 1986; Zot e Potter, 1987; Grabarek et al., 1992; da Silva e

Reinach, 1991).

O complexo TnI-TnC pode ser visualizado em géis de poliacrilamida. Na presença de Ca^{2+} , este complexo persiste mesmo na presença de 6M uréia (Head e Perry, 1974). Na ausência de Ca^{2+} , a uréia dissocia este complexo. Utilizando fragmentos proteolíticos de TnC, esta metodologia foi utilizada para demonstrar que os dois domínios de TnC podem ligar TnI (Weeks e Perry, 1976; Leavis et al., 1978; Grabarek et al., 1981). Os resultados destes estudos levaram Grabarek et al. (1981) a sugerirem que a presença dos aminoácidos 89-100 de TnC (hélice E, ao lado do sítio III no domínio C-terminal) é necessária para substituir a TnC inteira em reconstituições de acto-miosina sensível ao Ca^{2+} . Isto deu início à idéia de que a interação regulatória principal no complexo TnI-TnC ocorre entre a região inibitória da TnI e a hélice E da TnC.

Grabarek et al. (1981) também demonstraram que a interação entre a TnI inteira e sítios II ou III da TnC é dependente de Ca^{2+} , mas a presença de ambos os sítios III e IV confere ligação na ausência de metais divalentes (usando-se tampão contendo EDTA). É interessante notar que o sítio IV sózinho não ligou TnI em nenhuma condição. Infelizmente, estas investigações não estudaram os complexos na presença de Mg^{2+} (ausência de Ca^{2+}) para distinguir entre as interações dependentes de Ca^{2+} e aquelas dependentes de íons divalentes ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependentes).

Syska et al. (1976) demonstraram que existem pelo menos duas regiões de TnI que ligam TnC na presença de Ca^{2+} : a região N-terminal de TnI (fragmentos CN5 de resíduos 1-21 e CF2 de resíduos 1-47) e a região inibitória (fragmento CN4 de resíduos 96-116; Fig. 5). Peptídeos sintéticos menores do região inibitória (resíduos 101-115 e 104-115 (Ip)) também ligam à TnC (Katayama e Nozaki, 1982; Cachia et al., 1983). Talbot e Hodges (1981) demonstraram que a atividade inibitória de Ip pode ser removida pela TnC.

A influência de metais divalentes nestas interações foi estudada por vários métodos incluindo-se espectroscopia de N.M.R. e fluorescência, cromatografia de afinidade e migração nos géis de poliacrilamida. Grand et al. (1982) e Dalgarno et al. (1982) observaram que os espectros de N.M.R. dos peptídeos CN4 e CN5 são perturbados pela TnC na presença

de Ca^{2+} , mas não na ausência de metais divalentes. Ngai e Hodges (1992) obtiveram o mesmo resultado com géis de poliacrimida, utilizando um fragmento maior da região N-terminal de TnI (Rp, aminoácidos 1-40). Nestes estudos, a ligação na presença do Mg^{2+} (sem Ca^{2+}) não foi investigada. Katayama e Nozaki (1982) e Van Eyk e Hodges (1987, 1988) demonstraram que peptídeos sintéticos da região inibitória podem ligar TnC na presença de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} . Katayama e Nozaki (1982) mostraram que um fragmento pequeno da região N-terminal da TnI (resíduos 10-25) se ligou à TnC na presença de Ca^{2+} , mas não na presença de Mg^{2+} (sem Ca^{2+}). Por outro lado, Sheng et al. (1992) demonstraram que a deleção dos 57 primeiros aminoácidos da TnI diminuíram as interações $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependentes de TnC.

Utilizando espectroscopia de N.M.R., Dalgarno et al. (1982) e Grand et al. (1982) demonstraram que os peptídeos CN5 e CN4 podem se ligar à TnC ao mesmo tempo. Por outro lado, Ngai e Hodges (1992) demonstraram que a adição de um peptídeo N-terminal de TnI (aminoácidos 1-40, Rp) diminui a habilidade da TnC em remover a inibição de TnI inteira na presença de Ca^{2+} e também diminui a habilidade da TnC em remover a inibição de Ip na presença ou na ausência de Ca^{2+} (com Mg^{2+}). Uma interpretação deste resultado é que o Rp pode competir com o Ip ou com a TnI inteira para ligar TnC e que a região N-terminal da TnI pode ligar TnC na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . As observações discordantes de Grand et al. (1982) e Ngai e Hodges (1992) podem ser devidas ao fato de Ngai e Hodges (1992) terem usado um fragmento relativamente grande da região N-terminal e um fragmento relativamente pequeno da região inibitória. Também, nos estudos de espectroscopia de N.M.R., as concentrações são geralmente altas (0,8 mM em Grand et al., 1982). Estes resultados sugerem que os modos de ligação dos peptídeos pequenos podem ser dependentes do tamanho do peptídeo e significativamente diferentes das ligações que acontecem no complexo TnI-TnC.

O complexo TnI-TnC foi investigado por vários estudos de "cross-linking". Em dois estudos independentes, Leszyk et al. (1987, 1988a) primeiro marcaram TnC na posição Cys⁹⁸ da hélice E (no lado N-terminal do sítio III) com um "cross-linker" heterobifuncional fotoativável, depois reconstituíram um complexo binário com TnI ou terciário com TnI e TnT, fotolizaram o complexo e determinaram a posição dos "cross-links". A maioria dos

"cross-links" foi mapeada no fragmento CN4 da região inibitória da TnI. Estes estudos apoiaram a idéia de que a região inibitória da TnI está ligando TnC na hélice E do domínio C-terminal. Esta idéia também foi apoiada pelo estudos de espectroscopia NMR. (Dalgarno et al., 1981; Cachia et al., 1983, Tsuda et al., 1992). A maior crítica destes estudos de "cross-linking" é que o protocolo utilizado somente detectaria ligações na Cys⁹⁸ de TnC. Para responder a estas críticas, Leszyk et al. (1990) usaram "zero-length cross-links" para mapear a interface entre TnI e TnC (grupos carboxilas de TnC com grupos aminos de TnI). Neste estudo, observaram "cross-links" entre os resíduos 46-78 (sítio II) de TnC e o fragmento CN4 de TnI (região inibitória). Também foi detectada, com rendimentos mais baixos, "cross-links" entre os resíduos 46-78 de TnC e os resíduos 122-152 da região C-terminal da TnI. Neste mesmo estudo, estes pesquisadores não detectaram nenhum "cross-link" entre TnI e o domínio C-terminal de TnC implicado nos estudos anteriores; nem entre a TnC e a região N-terminal de TnI implicado em vários estudos anteriores (Syska et al., 1976; Grand et al., 1982; Dalgarno et al., 1982; Katayama e Nozaki, 1982). Provavelmente, este estudo detectou somente um sub-grupo de interações entre TnI e TnC. Os mesmos pesquisadores demonstraram a formação de "cross-links" entre o resíduo 57 da hélice C de TnC e a região inibitória de TnI (Kobayashi et al., 1991). Dobrovolsky et al. (1984) isolaram um "cross-link" específico entre a Cys⁹⁸ da TnC e a Cys¹³³ de TnI.

A evidência acima implica que a região inibitória da TnI pode ligar TnC no domínio C-terminal e também no domínio N-terminal (Leszyk et al., 1990). Como um peptídeo pequeno de TnI (Ip) pode ligar domínios separados por uma hélice de 31 aminoácidos na estrutura cristalina da TnC é difícil imaginar. Este problema poderia ser resolvido se a hélice central de TnC fosse um artefato de estrutura cristalina e a estrutura em solução de TnC for mais compacta, permitindo assim a aproximação dos domínios. Evidências neste sentido foram obtidas através dos estudos de transferência de energia de fluorescência (Wang et al., 1987) e espalhamento de raios-X (Heidorn e Trewella, 1988). As implicações desta possibilidade serão discutidas abaixo.

Na ausência de conhecimento da estrutura da TnI, a organização topológica do complexo TnI-TnC foi, e ainda é, uma questão aberta (vide revisão de Grabarek et al., 1992). Grabarek et al (1981, 1986, 1992), Dalgarno et al. (1982) e Zot e Potter (1987a)

propuseram um modelo que até recentemente (vide Farah et al., 1994) foi a melhor racionalização das observações dos estudos de interação TnI-TnC. Neste modelo, duas regiões de TnI (a região inibitória e a região N-terminal, Fig. 5; Syska et al., 1976) fazem contatos com três regiões de TnC (as hélices C, E e G dos sítios II, III e IV, Grabarek et al., 1981). A Figura 6 demonstra que nestes modelos a região N-terminal de TnI liga-se ao sítio II no domínio N-terminal da TnC e a região inibitória da TnI liga-se ao sítio III no domínio C-terminal da TnC. Este esquema paralelo surgiu principalmente por que:

i) Observou-se que peptídeos inibitórios podiam ligar TnC na presença e na ausência de Ca^{2+} , implicando em uma interação com o domínio C-terminal da TnC;

ii) A ligação dos peptídeos inibitórios da TnI afeta os sinais de N.M.R. de resíduos situados principalmente na região C-terminal de TnC (Dalgarno et al., 1982, Cachia et al., 1983);

iii) Um pequeno peptídeo sintético da região N-terminal (aminoácidos 10-25) da TnI liga-se à TnC somente na presença de Ca^{2+} , mas não na presença de Mg^{2+} (Katayama e Nozaki, 1982) o que sugere uma interação Ca^{2+} -específica com a região N-terminal da TnC;

iv) Quando EGTA é titulado dentro de uma solução do complexo Ca^{2+} -TnC-CN4-CN5, as primeiras mudanças são observadas nos sinais de N.M.R. do fragmento CN5 (Dalgarno et al., 1982; Fig. 5);

v) Os sítios II e III da TnC estão associados à ligação com a TnI dependente de Ca^{2+} . O sítio IV está associado com a ligação de TnI independente de Ca^{2+} (Weeks e Perry, 1978; Grabarek et al., 1981);

vi) Resíduos 89-100 da TnC parecem ser necessários para a regulação Ca^{2+} -dependente da atividade ATPásica da acto-miosina (Weeks e Perry, 1978; Leavis et al., 1978; Grabarek et al., 1981).

Zot e Potter (1987) propuseram que neste tipo de esquema a ligação de Ca^{2+} nos sítios regulatórios da TnC aumentaria a interação entre o domínio N-terminal da TnC com a região N-terminal da TnI. Esta ligação poderia resultar em mudanças conformacionais, tanto no domínio C-terminal da TnC como na TnI, que resultariam no desligamento da região inibitória da TnI da actina e na ligação com o domínio C-terminal da TnC.

As dificuldades deste modelo surgiram recentemente com a demonstração de que:

i) Os "cross-links" podem ser formadas entre a região inibitória da TnI e o domínio N-terminal da TnC (Leszyk et al., 1990, Kobayashi et al. 1991; vide discussão acima);

ii) A ligação ocorre entre o peptídeo inibitório da TnI e os domínios N- e C-terminal isolados da TnC na presença de Ca^{2+} (Fredrickson e Swenson Fredericksen, 1992). Neste estudo, o fragmento proteolítico do domínio N-terminal da TnC incluiu parte da hélice E do domínio C-terminal;

iii) Os sinais de espectroscopia de N.M.R. dos resíduos nos domínios N- e C-terminais da TnC são afetados pela ligação de Ip (Tsuda et al., 1992);

iv) A evidência de que a região N-terminal não liga TnC na presença de Mg^{2+} (sem Ca^{2+}) é fraca porque somente foi demonstrada com um oligopeptídeo de 16 aminoácidos (Katayama e Nozaki, 1982). O estudo original de Syska et al. (1976) mencionou que peptídeos de aminoácidos 1-21 ou 1-47 de TnI ligam-se à TnC na presença de Ca^{2+} ou na ausência de metais divalentes (dados não mostrados). Outros estudos implicando interações Ca^{2+} -dependentes com peptídeos desta região não investigaram a interação na presença de Mg^{2+} (Grand et al., 1982; Ngai e Hodges, 1992). Em adição, Sheng et al. (1992) recentemente demonstraram que uma TnI sem os primeiros 57 aminoácidos retira as interações dependentes de Ca^{2+} com TnC, mas as interações na presença de Mg^{2+} (ausência de Ca^{2+}) são diminuídas.

Os únicos estudos que revelaram informação sobre a estrutura secundária da TnI por resolução atômica são os de Campbell e Sykes (1988, 1991). Eles investigaram, por espectroscopia N.M.R., a estrutura do peptídeo inibitório da TnI (aminoácidos 104-115), quando ligado à TnC ($+\text{Ca}^{2+}$). Neste modelo (Figura 7), o peptídeo tem duas regiões de α -hélice (resíduos 104-108 e 112-115) interrompidas por duas prolinas centrais (resíduos 109 e 110). Um dobramento em volta destas prolinas cria um centro hidrofóbico com as cadeias laterais de F106, P109, L111, e V114 e, no lado oposto, uma superfície hidrofílica e básica formada pelas cadeias laterais de K105, K107, R108, R112, R113, e R115.

Usando as técnicas de cristalografia e espectroscopia de NMR multidimensional respectivamente, Meador et al. (1992) e Ikura et al. (1992) determinaram recentemente a estrutura do complexo entre a calmodulina (CaM) e um peptídeo correspondente ao domínio

da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) onde a CaM se liga. CaM, uma proteína que liga Ca^{2+} , tem 4 sítios "EF-hand" e uma estrutura cristalográfica muito semelhante à TnC, com os dois domínios separados por uma hélice central (Babu et al., 1985). O peptídeo de MLCK é anfifílico e básico, como a do peptídeo inibitório da TnI. Consequentemente, o complexo CaM-peptídeo MLCK pode ser um modelo do complexo TnC-Ip. Contudo, a estrutura da CaM no complexo é diferente daquela observada no cristal na ausência do oligopeptídeo. No complexo com o oligopeptídeo, a hélice central da CaM se encontra deformada, deixando os dois domínios aproximarem-se para cobrir completamente o oligopeptídeo da MLCK. Existe a possibilidade de que, quando a TnC se liga ao Ip em solução, a hélice central da TnC se deforme, como observado na CaM, e ambos os domínios, N- e C-terminal, liguem-se ao peptídeo inibitório. Em adição, no complexo CaM-peptídeo MLCK, o oligopeptídeo não se encontra dobrado, como a Ip quando ligado na TnC, e sim reto, interagindo igualmente com os dois domínios da CaM.

Campbell e Sykes (1988, 1991) não determinaram o sítio na TnC onde o peptídeo inibitório está ligado. Eles sugeriram que o centro hidrofóbico do Ip pode estar se ligando aos resíduos hidrofóbicos no domínio C-terminal de TnC, seguindo simulações de Strynadka e James (1990) da ligação da mastoparan - uma hélice anfifílica - com a TnC. Entretanto, Cachia et al. (1986) demonstraram que mastoparan, quando se liga à TnC, adota uma conformação altamente helicoidal (como o peptídeo MLCK ligado na CaM), que não é observada quando o Ip liga-se à TnC. Logo, Cachia et al. (1986) concluíram que o modo de ligação do Ip na TnC é diferente do que ocorre com a mastoparan. O fato de Ip não ser totalmente helicoidal também implica que ele provavelmente se liga à TnC de uma maneira diferente daquela observada no complexo CaM-peptídeo MLCK. Contudo, um modelo convincente da interação entre a região inibitória da TnI e TnC ainda não existe.

A regulação da atividade ATPásica da acto-miosina pela troponina provavelmente envolve um movimento da região inibitória da TnI de sítios na actina (na ausência de Ca^{2+}) para sítios na TnC (na presença de Ca^{2+}) (Syska et al., 1976; Van Eyk e Hodges, 1988). Evidências diretas para este tipo de movimento foram fornecidas pelos estudos de transferência de energia de fluorescência que medem as distâncias entre a TnI e a actina no filamento fino (Tao et al., 1990) e entre a TnI e a TnC no complexo terciário reconstituído

da troponina (Tao et al., 1989). Estes estudos mostraram que, quando Ca^{2+} se liga à TnC, a distância entre a Cys¹³³ da TnI e a Cys³⁷⁴ da actina aumenta de 4,2 nm para 5,7 nm, enquanto que a distância entre a Cys¹³³ da TnI e a Cys⁹⁸ da TnC diminui de 4.1 nm para 3.5 nm.

Vários grupos conseguiram expressar TnI em bactéria (Quaggio et al., 1993; Sheng et al., 1992; Kluwe et al., 1993). As TnIs recombinantes têm propriedades iguais às das TnIs purificadas de músculo. Kluwe et al. (1993) construíram uma TnI de coelho que não tem cisteínas, para evitar problemas de oxidação, que poderia estar interferindo na determinação da estrutura por cristalografia ou por espectroscopia de N.M.R. Sheng et al. (1992) criaram uma TnI de coelho que tem uma deleção dos primeiros 57 aminoácidos e a atividade inibitória deste mutante (TnI_{Δ57}) é igual à do tipo selvagem. A TnI_{Δ57} exibiu interações Ca^{2+} -dependentes com a TnC, mas a interação $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ foi diminuída, o que sugere que a região N-terminal da TnI é importante para interações com a TnC na ausência de Ca^{2+} .

Nesta tese, expressamos em bactéria fragmentos de TnI correspondentes às combinações das regiões N-terminal (aminoácidos 1-98), inibitória (aminoácidos 99-116) e C-terminal (aminoácidos 117-182). Utilizamos estes fragmentos, em combinação com mutantes e fragmentos recombinantes de TnC, para investigar a estrutura do complexo troponina e as funções regulatórias das diferentes regiões da TnI.

FIGURAS 1-7

Figura 1: Organização do sarcômero. **A)** Diagrama mostrando a interdigitação dos filamentos finos ("thin filaments") compostos de actina e os filamentos grossos ("thick filaments") compostos de miosina. As cabeças da miosina ("cross-bridges") saem do filamento grosso e fazem contatos com o filamento fino. Este diagrama representa um corte longitudinal do músculo esquelético. **B)** Comparação das etapas mecânicas envolvidas na geração da força pela acto-miosina e **(a)** e as etapas bioquímicas correspondentes da hidrólise do ATP **(b)**. Na etapa 3, a cabeça da miosina, com os produtos da hidrólise do ATP (ADP e Pi), liga à actina. Na etapa 4 (o "power stroke"), a cabeça da miosina muda o ângulo da ligação com a actina e libera o ADP e o Pi. Na etapa 1 a ligação do ATP causa rompimento do complexo miosina-actina. Na etapa 2, a hidrólise do ATP reverte a mudança conformacional da etapa 4 e a miosina está pronta para se ligar de novo à actina. **C)** Aumento do "overlap" entre os dois tipos de filamento e a diminuição no comprimento do sarcômero que ocorre durante a contração isotônica. Durante a contração isométrica, as dimensões do sarcômero não mudam. **D)** As regiões do sarcômero. **a:** Os filamentos finos se originam na linhas Z ("Z-line") nos dois lados do sarcômero e os filamentos grossos se originam na banda M ("M-band") no centro do sarcômero. A região contendo os filamentos grossos é chamada Banda A ("A-band") e a região que não contém filamentos grossos é chamada Banda I ("I-band"). Na zona H ("H-zone"), no centro da Banda A, não se observa filamentos finos. Durante a contração isotônica, a banda I e a zona H diminuem em comprimento mas as dimensões da banda A, permanecem constantes. Diagramas dos filamentos que são observados em cortes transversais através das diferentes regiões do sarcômero são mostrados abaixo **(b-e)**. (Partes A e C de Stryer (1988). Partes B e D de Squire (1981))

Figura 1: Organização do sarcômero

Figura 2: O filamento fino do músculo esquelético e modelos de interação acto-miosina. **A)** Modelo do filamento fino. Monômeros de actina (esferas) polimerizam-se em filamentos pseudo-dupla-fita paralelos. À cada fita está associado um "coiled coil" de duas cadeias da tropomiosina. Cada tropomiosina faz contatos com sete monômeros de actina em uma fita do filamento da actina. À cada tropomiosina está associado um complexo troponina (TnI, TnC e TnT). As subunidades TnI e TnC são proteínas globulares. TnT tem uma região globular (TnT-2 ou T2), que faz contatos com TnI, TnC e tropomiosina, e uma região assimétrica (TnT-1 ou T1) que faz contatos extensivos com o terço C-terminal da tropomiosina, incluindo a região de "overlap" entre a cabeça de uma tropomiosina e a cauda da tropomiosina seguinte ("head to tail overlap"). **B)** Estrutura atômica da cabeça da miosina. As regiões de ligação do ATP e da actina estão indicadas. Também estão indicadas as regiões de 25kDa, 50 KDa e 20 KDa da cadeia pesada, as duas cadeias leves (ELC e RLC) e a fenda entre os domínios superior e inferior ("upper" e "lower") da região 50 KDa são indicadas (vide o texto para detalhes). **C)** Modelo mais completo das etapas bioquímicas no ciclo ATPásico da actomiosina, demonstrando que cada etapa do ciclo pode acontecer na miosina ligada ou não ligada à actina (A, actina; M, miosina; T, ATP; D, ADP; P, Pi). **D)** Modelo das mudanças estruturais na cabeça da miosina durante o ciclo na presença de actina. As esferas representam os monômeros de actina no filamento fino. A linha Z está abaixo da figura e o centro do sarcômero acima. Na ausência do nucleotídeo, a miosina está ligada à actina com a fenda fechada e o sítio do ATP vazio e aberto (A). Ligação do ATP faz a fenda abrir, diminuindo a interação com a actina (B). Desligado da actina, o sítio do ATP fecha e o ATP é hidrolizado, causando uma mudança estrutural na miosina (C). A ligação à actina inicia o "power stroke" onde Pi (D) e ADP (E) são sequencialmente liberados. Durante o "power stroke" a força pode resultar em movimento relativo dos filamentos (contração isotônica) ou na geração de tensão num componente elástico do sistema (contração isométrica). Vide o texto para detalhes. (Parte A de Heeley et al. (1987). Parte B de Rayment et al. (1993a). Parte C de Taylor (1991). Parte D de Rayment et al. (1993b).

Figura 2: O filamento fino do músculo esquelético e modelos de interação da acto-miosina

Figura 3: O modelo do bloqueamento estérico. Diagrama da interação entre a cabeça da miosina (HMM S-1) e o filamento fino visto ao longo do eixo do filamento fino. Uma hipótese para o mecanismo de controle da contração muscular em músculo esquelético propõe que a ligação do Ca^{2+} à troponina (esferas pretas) muda a posição da tropomiosina (esferas brancas pequenas) no filamento de actina (esferas brancas grandes). **a.** Na ausência de Ca^{2+} , a tropomiosina é situada distalmente em relação à fenda entre duas pseudo-fitas da actina e fisicamente bloqueia a ligação da cabeça da miosina. **b.** Na presença da Ca^{2+} , a tropomiosina muda de posição, ficando mais perto da fenda da actina, liberando assim o acesso da miosina à actina. (Figura de Squire (1981))

Figura 3: O modelo do bloqueamento estérico

Figura 4: A estrutura tridimensional da troponina C. **A)** Modelo de fita. As hélices do domínio N-terminal (A, B, C, D) e do domínio C-terminal (E, F, G, H) estão indicadas. Os dois domínios são conectados por uma hélice central (D/E). As alças dos sítios de ligação de Ca^{2+} (I, II, III, e IV) estão indicadas. Nesta estrutura, os sítios $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de alta afinidade (III e IV) estão ocupados pelo Ca^{2+} e os sítios Ca^{2+} -específicos de baixa afinidade (I e II) estão vazios. Os diagramas **B** e **C** mostram a cadeia principal da TnC com os sítios III e IV ocupados com Ca^{2+} (**B**) e o modelo da TnC com os quatro sítios ocupadas com Ca^{2+} (**C**). O modelo em **C** é baseado na hipótese de que a ligação de Ca^{2+} nos sítios I e II induz o domínio N-terminal a adotar uma estrutura semelhante ao domínio C-terminal (Herzberg et al., 1986). Com respeito ao modelo em **A**, modelos **B** e **C** são foram rodados 180° no eixo vertical. (Parte A de Herzberg e James (1985). Partes B e C de Pearlstone et al. (1992)).

Figura 4: A estrutura cristalina da troponina C

Figura 5: Regiões funcionais da troponina I. Aminoácidos 96-116 no centro da sequência da TnI se ligam à actina e são responsáveis pela atividade inibitória da TnI. Por esta razão é chamada a região inibitória (I). Esta região também se liga à TnC. As sequências no lado N-terminal da região inibitória (N) contêm sítios que ligam à TnC e à TnT. As sequências do lado C-terminal da região inibitória (C) são conservadas entre as diferentes TnIs mas não têm uma função conhecida.

Figura 5

Figura 6: Modelos da interação entre TnI e TnC propostas anteriormente. **A)** Modelo de Dalgarno et al. (1982) baseado nos estudos de N.M.R. utilizando fragmentos da TnI (CN5, aminoácidos 1-21; CN4, aminoácidos 96-116), TnC (TR2, aminoácidos 88-159) e TnC inteira. Utilizando TnCs marcadas com uma sonda paramagnética de spin ("paramagnetic spin label") na Cys⁹⁸, observaram que i) CN4 e CN5 podem ligar-se à TnC(+Ca²⁺) simultaneamente, ii) titulação com EGTA do complexo TnC(Ca²⁺)-CN4-CN5 resultou, primeiro, na diminuição do espalhamento paramagnético do fragmento CN5 (note que Mg²⁺ não estava presente), iii) os sinais de N.M.R. de CN4, mas não de CN5, foram afeoadas pelo fragmento TR2 (aminoácidos 89-159 da TnC). O modelo propõe que CN5 se liga ao domínio N-terminal da TnC e CN4 se liga no domínio C-terminal da TnC. **B)** Modelo da revisão de Zot e Potter (1987) baseado, na maior parte, nos estudos de interações entre fragmentos de TnI e TnC (Syska et al., 1976) e fragmentos de TnC e TnI (Weeks e Perry, 1978; Leavis et al., 1978; Grabarek et al., 1981). Duas regiões da TnI (1-21 e 96-116) interagem com três regiões da TnC (50-60, hélice C; 89-100, hélice E; 126-136, hélice G). Neste modelo, uma mudança na helice C da TnC, causada pela ligação de Ca²⁺ nos sítios de baixa afinidade, aumenta a afinidade dos aminoácidos 1-21 da TnI pela TnC. Estas mudanças na estrutura das duas proteínas aumentam a afinidade da região inibitória da TnI (aminoácidos 96-116) pela hélice E da TnC. A região da TnI onde a hélice G da TnC se liga de uma maneira independente de Ca²⁺ não foi definida.

Figura 6: Modelos da interação entre TnI e TnC

A: Dalgarno et al. (1982)

B: Zot e Potter (1987)

Figura 7: O modelo atômico do peptídeo inibitório. Diagrama estéreo do modelo de peptídeo inibitório da TnI (aminoácidos 104-115) quando está ligado à TnC na presença de Ca^{2+} determinado por N.M.R. (Campbell e Sykes, 1991). O peptídeo tem dois regiões alfa-helicoidais separadas pelo uma dobra devido as duas prolinas centrais. A dobra facilita a formação de um núcleo hidrofóbico das cadeias laterais de F106, P109, L111, e V114 e uma superfície básica das cadeias laterais de K105, K107, R108, R112, R113, e R115.

Figura 7: O modelo atômico do peptídeo inibitório

MATERIAS E MÉTODOS

Métodos gerais

Métodos de DNA recombinante tais como a preparação em pequena e grande escala de plasmídeos bacterianos, preparação de DNA viral de fita única e de forma replicativa (RF), digestões com enzimas de restrição, fosforilação de extremidades de DNA com T4 DNA kinase, reações de extensão com fragmento Klenow da polimerase de DNA de *E. coli*., ligações de fragmentos de DNA, hibridização de oligonucleotídeos e eletroforese em géis de agarose foram realizados, conforme sugerido pelos fabricantes das enzimas, ou conforme descrito em manuais de metodologia de DNA recombinante (Sambrook et al, 1989; Glover, 1987; Carter, 1987). O sequenciamento de DNA foi feito de acordo com Sanger et al. (1977). A transformação de *E. coli* com plasmídeo de DNA foi feita, conforme descrito por Hanahan (1985). A eletroforese de proteínas em gel de poliácridamida foi feita de acordo com Laemmli (1970). A concentração de proteína foi determinada de acordo com Hartree (1972).

Purificação das proteínas musculares de galinha

Miosina. A miosina foi preparada segundo o protocolo de Reinach et al. (1982) com pequenas modificações. Galinhas foram sacrificadas por decapitação. Os músculos peitorais maior e menor da galinha adulta foram removidos e esfriados em gelo. As etapas subsequentes foram realizadas a 4°C. Após 10 minutos, os vasos e a gordura foram retirados e, empregando-se um moedor de carne, o músculo foi então triturado duas vezes. Quatro volumes de tampão Guba-Straub (0,3 M KCl, 0,1 M KH₂PO₄, 0,05 M K₂HPO₄, 1 mM EDTA) foram colocados e misturados ocasionalmente por 10-15 min. Dois volumes de água destilada foram adicionados e misturados, e a preparação foi então filtrada usando-se 3 camadas de gaze (fervidas previamente por 10 min em 1 mM EDTA). A este filtrado foram adicionados 3 volumes de água destilada, seguido por centrifugação (23 min, 10000 x g, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 5 mL de 0,5 M KCl, 5 mM MgATP. Empregando-se um homogeneizador manual ("Potter", Thomas Scientific), homogeneizou-se a preparação. A suspensão foi então centrifugada (1 hr, 120000

x g, 4°C). Foram adicionados 11 volumes de água destilada ao sobrenadante, seguido por centrifugação (10 min, 10000 x g, 4°C). O precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de 50 mM imidazolHCl (pH 7,3), 0,6 M KCl e homogeneizado gentilmente. Para estocar por tempos prolongados a -20°C, colocamos lentamente 1 volume de glicerol e 1 mM DTT. Para usar, 5 mL desta solução foram diluídos em 50 mL de água destilada (0-4°C) e mantidos em gelo por 10 min. Centrifugou-se (15 min, 12000 x g, 4°C) para coletar a miosina. O precipitado foi lavado com 5 mM imidazolHCl (pH 7,0), 60 mM KCl e ressuspensionados em 5 mL de 50 mM imidazol (pH 7,0), 600 mM KCl, 1 mM DTT e, uma vez mantido a 0°C (em gelo), podem ser empregados por até duas semanas.

Actina. A actina foi preparada de acordo com o protocolo de Pardee e Spudich (1982) com pequenas modificações. Galinhas foram sacrificadas por decapitação. Os músculos peitorais maior e menor da galinha adulta foram removidos e esfriados no gelo. Depois de 10 minutos, os vasos e a gordura foram retiradas. (Nesta fase, o músculo pode ser congelado a -20°C). O resto do protocolo foi feito a 4°C. O músculo foi triturado duas vezes usando um moedor de carne e a preparação foi extraída com as soluções descritas abaixo. Cada extração foi feita sob agitação lenta, e em seguida foi filtrada em gaze: 1) uma vez com 1 L de 0,1 M KCl, 0,15 M K₂PO₄ (pH 6,5) por 10 min; 2) uma vez com 2 L de 0,05 M NaHCO₃ por 10 min; 3) uma vez com 1 L de 1 mM NaEDTA (pH 7,0) por 10 min; 4) duas vezes com 2 L de água destilada por 5 min; 5) cinco vezes com 1 L de acetona por 10 min à temperatura ambiente. O resíduo foi deixado por 12 hr para secar à temperatura ambiente. Este pó acetônico pode ser mantido a -20°C por mais de um ano. 2 g de pó acetônico foram extraídos com 50 mL de 2,5 mM TrisHCl (pH 8,0), 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM NaATP (pH 7,0), 0,5 mM DTT, sob lenta agitação em gelo por 10 min seguida por centrifugação (5 min, 25000 x g, 4°C). O sobrenadante foi guardado e o precipitado foi extraído por mais duas vezes. Os sobrenadantes combinados foram filtrados em membrana de Millipore GVWP04700. A esta solução foram adicionados NaCl até 50 mM, MgCl₂ até 0,7 mM, NaATP (pH 7,0) até 1 mM e TrisHCl (pH 7,5) até 10 mM de concentração final e agitou-se lentamente por 2 h à temperatura ambiente. A concentração de NaCl foi então aumentada até 600 mM e deixada sob agitação por mais 30 min à temperatura ambiente (esta etapa é importante para dissociar a tropomiosina contaminante). A solução foi centrifugada (2 hr, 125000 x g, 4°C). Os precipitados foram lavados 3 vezes com 20 mM de imidazol (pH 7,0),

6,5 mM NaCl, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,01% NaN₃, 1 mM DTT e 1 mM de NaATP (pH 7,0) e mantido em gelo por até duas semanas. Cada pellet foi ressuspendido parcialmente em 1 mL neste tampão. Depois de incubar a 0°C (no gelo) por 12 hr, as suspensões foram homogeneizadas gentilmente, usando-se uma ponteira de pipeta de 1 mL, e foram mantidas em gelo até um máximo de duas semanas.

α-tropomiosina. A *α-tropomiosina* foi purificada de corações da galinha pelo método de Smillie (1982), preparada e gentilmente cedida por Jesus A. Ferro (UF-Jaboticabal). A proteína liofilizada foi dissolvida em 20 mM imidazolHCl (pH 7,0), 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM EGTA, 0,01% NaN₃, 1 mM DTT e guardada em gelo.

TnC_s recombinantes

A TnC de músculo esquelético de galinha recombinante (Brant-Monteiro, 1991; Quaggio et al., 1993) e as mutantes de TnC (D30A, D66A, D106A e D142A; Farah et al., 1994; Silva et al., 1994; Silva et al., em preparação) foram preparadas por Ana Cláudia da Silva em nosso laboratório. Os domínios recombinantes da TnC (N-TnC, aminoácidos 1-90; C-TnC, aminoácidos 88-162; Farah et al., 1994; Li et al., 1994) foram fornecidos gentilmente pelo Dr. Lawrence B. Smillie da University of Alberta, Canadá. Dr. L. Smillie também forneceu os seguintes mutantes fluorescentes de TnC: i) F29W-TnC: Phe29 da TnC foi mudado para Trp, ii) F29W-Ndom: Phe29 da N-TnC foi mudado para Trp, iii) F105W-TnC: Phe105 da TnC foi mudado para Trp, iv) F105W-Cdom: Phe105 da C-TnC foi mudado para Trp, v) F154W-TnC: Phe154 da TnC foi mudado para Trp, vi) F154W-Cdom: Phe154 da C-TnC foi mudado para Trp (Pearlstone et al., 1992; Trigo-Gonzalez et al., 1992; Li et al., 1994; Chandra et al., 1994). A fluorescência de triptofano na posição 29 é sensível à ligação de Ca²⁺ nos sítios I e II do domínio N-terminal da TnC (Pearlstone et al., 1992; Li et al., 1994) e as fluorescências dos triptofanos nas posições 105 e 154 são sensíveis à ligação de Ca²⁺ ou Mg²⁺ nos sítios III e IV do domínio C-terminal da TnC (Trigo-Gonzalez et al., 1992; Li et al., 1994; Chandra et al., 1994).

TnT recombinante

O cDNA da isoforma 3 de TnT (TnT-3, Smillie et al., 1988) foi expressa em pET-3a (Studier et al., 1990) e purificada como descrita em Farah et al. (1994).

O cDNA de TnI

O cDNA de TnI de músculo esquelético de galinha usado neste estudo foi originalmente clonado, sequenciado e expressado em nosso laboratório (Quaggio, 1991; Quaggio et al., 1993).

Cepas de *E.coli*

A cepa JM101 foi empregada para o crescimento dos clones M13 para purificação de DNA de fita única usada para sequenciamento ou para obter RF (forma replicativa de dupla fita) de DNA, usada para sub-clonar os mutantes no vetor de expressão. A cepa JM101 é do tipo supE.

A CJ236 é uma cepa de *E. coli* do tipo *dut⁻ ung⁻* deficiente nas enzimas deoxiuridina trifosfatase (Hachhauser and Weiss, 1978) e uracila-DNA N-glicolase (Duncan et al., 1978). A cepa CJ236 foi usada para preparar o molde de fita única do M13 para mutação, conforme descrito por Kunkel (1985, 1997). A CJ236 também contém o plasmídeo pCJ105 (Sambrook et al., 1989) que mantém a produção do fator de conjugação bacteriano F' necessário para o crescimento do fago M13. Este plasmídeo é mantido por meio do crescimento de colônias de CJ236 em meio contendo 30 µg/ml de cloranfenicol. A linhagem CJ236 não é do tipo *supE*.

A cepa HMS174 (Studier et al., 1989) foi usada para preparar os plasmídeos derivados do pET-3a contendo os gens mutantes para TnI.

As cepas BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysE (Studier et al., 1989) foram empregadas para induzir a síntese das proteínas mutantes de TnI e TnT.

Crescimento bacteriano

O crescimento tanto da JM 101 como da HMS 174 foi feito em meio 2xTY (Sambrooke et al.). O crescimento CJ236 ocorreu em 2xTY contendo 30 µg/ml de cloranfenicol e 0,25 µg/ml de uridina (Kunkel, 1985). O crescimento de BL21(DE3)pLysS deu-se em 2xTY contendo 200 µg/ml de cloranfenicol. Após transformação com um plasmídeo derivado de pET-3a, tanto HMS174 como BL21(DE3)LysS, o crescimento foi realizado em meio, conforme mencionado acima, e ainda adicionados de 100 µg/ml de ampicilina ou carbenicilina.

Crescimento de pBL21(DE3)pLysS e pBL21(DE3)pLysE para produzir TnIs recombinantes marcadas pelo ¹⁵N foi feito em meio M9 (Sambrook et al, 1989) contendo 1 g/L ¹⁵N-cloreto de amônio (Cambridge Isotope Laboratories), 2 mM MgCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 25 µM ZnCl₂, 1 µM FeCl₃, 5 µg/mL tiamina 200 µg/ml de cloranfenicol 100 µg/ml de carbenicilina.

Mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeo

A mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeo foi feita de acordo com os métodos descritos por Carter (1987) com modificações sugeridas por Kunkel (1985, 1987).

Reações com S1 nuclease

Entre 50 e 200 ng de plasmídeo DNA previamente linearizado com enzimas de restrição foram ressuspensos em 50 µl de tampão para reação com S1 nuclease (30 mM de acetato de sódio, pH 5,9 contendo 0,5 mM de ZnCl₂). Então 1 µl (2 unidades) de S1 nuclease (Amersham) foi adicionado e a mistura foi então incubada por 30 a 120 min a 37°

C. As reações foram interrompidas pela adição de 5 μ l de solução de 3 M de acetato de sódio (pH 9,0), 50 mM EDTA, seguida pela extração com fenol-clorofórmio (1:1) e duas vezes com clorofórmio e precipitação com etanol.

Análise das construções derivadas do pET-3a com enzimas de restrição

A natureza correta de todas as construções feitas em plasmídeos foi confirmada pela digestão destes plasmídeos com diversas combinações de enzimas de restrição, com a finalidade de detectar a presença esperada ou a ausência de sítios de restrição, ou ainda as mudanças na distância entre os sítios para enzimas de restrição. Os tamanhos dos fragmentos, após tratamento com estas enzimas, foram determinados por comparação da mobilidade eletroforética em géis de agarose com os marcadores de peso molecular, produzidos pela digestão do fago lambda DNA com EcoR I e Hind III.

Expressão e purificação das proteínas mutantes de TnI em larga escala

Os protocolos de expressão e purificação de TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆, TnI₁₀₃₋₁₈₂, TnI₁₂₀₋₁₈₂ e Δ I-TnI são descritos em Farah et al., 1994. Existem diferenças consideráveis entre estes protocolos, em consequência das diferentes propriedades físico-químicas dos mutantes obtidos. Para purificar TnI₁₋₁₅₆ (Farah et al., 1994; Quaggio, não publicado) e wt-TnI (Quaggio et al., 1993) usamos o mesmo protocolo descrito para wt-TnI (Quaggio et al., 1993).

Expressão bacteriana. Os plasmídeos contendo as mutações feitas por deleção foram usados para transformar células competentes do tipo BL(DE3)pLysS ou BL(DE3)pLysE (Studier et al., 1990). Para TnI₁₋₉₈ e TnI₁₋₁₁₆, usamos BL(DE3)pLysE; Para TnI₁₀₃₋₁₈₂, TnI₁₂₀₋₁₈₂ e Δ I-TnI, usamos BL(DE3)pLysS. As colônias isoladas foram então utilizadas para inocular 10-50 ml de meio 2xTY com cloranfenicol e carbenicilina. Quando a densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de cultura esteve entre 0,2 e 0,6, 500mL-2000mL do mesmo meio foram inoculados com 1 % desta cultura. A cultura foi mantida sob agitação (200 rpm) a 37 °C até

$DO_{600}=0,8-1,0$. Então a síntese da proteína mutante foi induzida pela adição de IPTG (concentração final de 0,4 mM), permitindo-se o crescimento por mais 3 horas. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação a 6000 x g por 15 min a 4 °C. Após a remoção do sobrenadante, as células foram congeladas a -20 °C.

Lise das células e separação dos componentes solúveis e insolúveis. A presença da T7 lisozima nas cepas BL21(DE3)pLysS e BL21(DE3)pLysE facilita a lise das células, após congelamento-descongelamento. As células lisadas foram então ressuspensas no seguinte tampão de lise: 20 mM de TrisHCl (pH 8,0), 1 mM de EDTA, 1mM de DTT, 4% (v/v) de glicerol, 0,1 mM de PMSF (30 mL/L de cultura). A viscosidade da mistura foi reduzida pela adição de $MgSO_4$ (10 mM) e DNase I (10 mg/mL), seguida por incubação em gelo, até que as partículas não pudessem mais ser visualizadas. Adicionou-se então EDTA (20 mM, pH 8,0) e a solução foi homogeneizada, após 10-20 passagens no homogeneizador manual ("Potter", Thomas Scientific) em gelo. Os componentes solúveis e insolúveis foram separados por centrifugação a 15000 rpm (Sorval GS34) por 30 min a 4 °C. As frações solúveis e insolúveis foram analisadas individualmente por electroforese em SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), para se localizar a proteína mutante induzida. Nos casos onde as proteínas mutantes da TnI encontravam-se na fração insolúvel, o precipitado foi ressuspendido no tampão de coluna (pH 5,0): 50 mM acetato de sódio (NaOAc, pH 5,0), 1 mM de EDTA, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 8 M de uréia (40 mL/L de cultura). A mistura foi homogeneizada por 10 passagens no homogeneizador manual e então centrifugada a 15000 rpm (Sorval GS34) por 60 min a 4 °C e o sobrenadante foi reservado para cromatografia em CM-celulose ou CM-Sepharose (abaixo). Nos casos onde as proteínas mutantes da TnI encontravam-se na fração solúvel, o sobrenadante foi fracionado, após precipitação com sulfato de amônio.

Precipitação com sulfato de amônio. Uma solução 100% saturada (0°C) de sulfato de amônio foi adicionada ao sobrenadante até a concentração final de 40% de saturação (0 °C). A mistura foi centrifugada por 30 min a 15000 x g a 5-10 °C. A solução 100% saturada de sulfato de amônio foi adicionada ao sobrenadante até a concentração final de 60% e centrifugada (nas condições acima). No caso da TnI₁₂₀₋₁₈₂, o precipitado foi ressuspendido no tampão de coluna (pH 5,0) sem uréia (20 mL/L de cultura) e dialisado contra o mesmo tampão a 4 °C. Durante a diálise, forma-se um precipitado branco que contém a TnI mutante.

Este precipitado foi coletado por centrifugação (60 min, 25000 x g, 4 °C), ressuspendido em tampão de coluna (pH 5,0; 40 mL/L de cultura) e homogeneizado utilizando-se 10-200 passagens no homogenizador manual. A mistura foi então centrifugada (60 min, 25000 x g, 4 °C) e o sobrenadante foi reservado para cromatografia em CM-celulose. No caso da Δ I-TnI, o mesmo protocolo foi utilizado, mas os tampões empregados foram 50 mM TrisHCl (pH 7,0), 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol, +/- 8 M uréia.

Cromatografia em CM-Sepharose. Usamos colunas de 80 a 100 mL de Fast-flow CM-Sepharose (Pharmacia) na temperatura ambiente com um fluxo de 200 mL/h. Todos os tampões usados para cromatografia foram feitos com água Milli-Q (Millipore) e filtrados (membrana de Millipore tipo GSWP 04700). A absorbância do eluente foi continuamente monitorada a 280 nm (A_{280}). Para TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆, TnI₁₀₃₋₁₈₂, e TnI₁₂₀₋₁₈₂ usamos colunas equilibradas com 50 mM acetato de sódio (pH 5,0), 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol. Para Δ I-TnI usamos colunas equilibradas com 50 mM TrisHCl (pH 7,0), 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol. Após aplicação da amostra, as proteínas contaminantes que não se ligaram na coluna foram eluídas com os tampões acima, até que a A_{280} voltasse ao zero (~200 mL). As proteínas que se ligaram na coluna foram eluídas com gradientes de NaCl (500 mL total) no mesmo tampão (vide abaixo). A TnI₁₋₉₈ foi eluída com um gradiente de 0 a 100 mM NaCl. A TnI₁₋₁₁₆ foi lavada com 50 mM NaCl e eluída com um gradiente de 50 a 300 mM NaCl. A TnI₁₀₃₋₁₈₂ foi lavada com 100 mM NaCl e eluída com um gradiente de 100 a 450 mM NaCl (também pode-se utilizar um gradiente de 100 a 350 mM NaCl). A TnI₁₂₀₋₁₈₂ foi lavada com 50 mM NaCl e eluída com 85 mM NaCl (também pode ser eluída pela lavagem extensiva com 50 mM NaCl). A Δ I-TnI foi eluída com um gradiente de 0 a 140 mM NaCl. Analisaram-se as proteínas de cada fração por eletroforese de SDS-PAGE (15%). As frações das proteínas purificadas foram dialisadas contra 10 mM imidazolHCl (pH 7,0), 0,5-1 M KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoetanol e mantidas a -70°C. Em alguns casos, as proteínas foram dialisadas extensivamente contra 50 mM ácido fórmico, 10 mM 2-mercaptoetanol e liofilizadas. Estas proteínas liofilizadas foram ressuspendidas no tampão acima contendo 8 M uréia e dialisadas contra tampão sem uréia.

Produção de TnI₁₀₃₋₁₈₂ e TnI₁₋₁₁₆ marcadas com ¹⁵N. A TnI₁₀₃₋₁₈₂ e a TnI₁₋₁₁₆, expressas em meio mínimo (M9; Sambrook et al., 1989) contendo ¹⁵N-cloreto de amônio, foram purificadas como descrito acima com a única diferença de que a TnI₁₋₁₁₆ eluída na coluna CM-Sepharose foi reaplicada e eluída novamente com o mesmo gradiente. Estas proteínas foram dialisadas contra ácido fórmico (descrito acima), liofilizadas, e mandadas para o laboratório do Dr. Brian Sykes (University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá) para estudos de espectroscopia de n.m.r..

Sequenciamento das extremidades N-terminais das proteínas mutantes

A degradação de Edman automatizada foi realizada pelo uso de um sequenciador da Applied Biosystems (Model 473). Para remover os sais, as amostras contendo aproximadamente 1 a 5 nmol de proteína foram dialisadas contra 1,4 mM 2-mercaptoetanol a 4°C, liofilizadas e ressuspensas em 1% de ácido trifluoroacético ou precipitadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA; Bollag e Edelstein, 1991) seguido pela ressuspensão das amostras com 1% TFA. Aproximadamente 0,5-1 nmol foi aplicado no sequenciador.

Análise dos complexos binários TnI-TnC nos géis de poliacrilamida-uréia e poliacrilamida-glicerol

Estes protocolos são descritos em detalhe em Farah et al. (1994).

Reconstituição dos complexos terciários TnI-TnC-TnT

Este protocolo é descrito em detalhe em Farah et al. (1994).

Medidas da atividade Mg^{2+} ATPásica de actomiosina

Estes protocolos são descritos em Farah et al. (1994). A actina, a miosina, a α -tropomiosina e as troponinas recombinantes foram dissolvidas nos tampões mencionados nos protocolos de purificação acima. Todas as reações foram feitas em tubos de vidro, que foram lavados com 6 M HCl, e em seguida enxaguados dez vezes com água destilada e duas vezes com água Milli-Q.

Inibição da atividade ATPásica pela TnI e os complexos TnI-TnC. Os experimentos de inibição pela TnI foram feitos por Catarina Miyamoto e por mim (Fig 2 em Farah et al. (1994)) e os experimentos de inibição pela TnI-TnC foram feitos por Catarina Miyamoto (Fig 3 em Farah et al. (1994)). Tanto a wt-TnI como os mutantes de TnI foram dissolvidas em 10 mM imidazol-HCl (pH 7,0), 2 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0,5-1,0 M KCl. A wt-TnC foi dissolvida em 25 mM Tris (pH 8,0), 2 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-mercaptoetanol. As proteínas foram adicionadas na seguinte ordem (em gelo):

- 1) actina a 4 μM ,
- 2) α -tropomiosina a 1,16 μM ,
- 3) wt-TnI ou TnI mutante (concentração indicada),
- 4) wt-TnC (concentração indicada),
- 5) tampão de TnI até a concentração final de 60 mM KCl,
- 6) $CaCl_2$ a 0,1 mM (quando indicado; Fig 3 de Farah et al. (1994)),
- 7) 20 μl de 200 mM de imidazol (pH 7,0), 65 mM NaCl, 35 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 0,1% NaN_3 , 1 mM DTT,
- 8) miosina a 0,2 μM ,
- 9) água para 180 μl volume total.

Para diminuir erros de pipetagem, muitas vezes a actina e a α -tropomiosina foram misturadas juntas nas proporções certas e alíquotas desta mistura foram adicionadas aos tubos. Os tubos foram transferidos para um banho-maria a 25°C e incubados por 10 min. Então a cada 30 segundos, 20 μl de 20 mM NaATP (pH 7,0) foram adicionados a um tubo e cada tubo foi incubado a 25°C por exatamente 25 min. O fosfato inorgânico liberado em cada tubo foi

determinado pela reação com molibdato de amônio, medida a um comprimento de onda A_{355} , de acordo com o protocolo do Hernonen e Lahli (1981). O tempo de reação (25 min) e a concentração de actina ($4 \mu\text{M}$) foram selecionados depois dos experimentos onde variavam estes parâmetros para selecionar i) a concentração da actina que resulta na ativação máxima da Mg^{2+} -ATPase da miosina e ii) o tempo máximo onde a velocidade da Mg^{2+} -ATPase é constante (J.A Ferro, R.B. Quaggio, e C. S. Farah; resultados não publicados). Estes parâmetros são sensíveis às concentrações de miosina e ATP e à força iônica da solução. Alta força iônica inibe a reação (Margossian & Lowey, 1982). Sobre estas condições (60 mM KCl), a atividade ATPásica da actomiosina-tropomiosina é 2.2 s^{-1} (Farah et al., 1994)

Regulação pelo complexos terciários TnI-TnC-TnT. Os complexos terciários de troponina e binários de wt-TnI-TnC, TnI₁₀₃₋₁₈₂-TnC, e TnC-TnT foram reconstituídos como descrito em Farah et al. (1994). As proteínas foram adicionadas na seguinte ordem (em gelo):

- 1) actina a $4 \mu\text{M}$,
- 2) α -tropomiosina a $1,16 \mu\text{M}$,
- 3) complexo troponina reconstituída a $1,16 \mu\text{M}$,
- 4) CaCl_2 (concentração indicada em Fig. 4 de Farah et al. (1994)),
- 5) $20 \mu\text{l}$ de 200 mM de imidazolHCl (pH 7,0), 65 mM NaCl, 35 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 0,1% NaN_3 , 1 mM DTT,
- 6) miosina a $0,2 \mu\text{M}$,
- 7) água para $90 \mu\text{l}$ volume total.

Para diminuir erros de pipetagem, a actina, α -tropomiosina, o complexo de troponina e DTT foram misturados juntas nas proporções certas e alíquotas desta mistura foram adicionadas aos tubos. Os tubos foram transferidos num banho de água a 25°C e incubadas por 10 min. Então, a cada 30 segundos, $10 \mu\text{l}$ de 20 mM NaATP (pH 7.0) foram adicionados a um tubo e cada tubo foi incubado a 25°C por 10-15 min. O fosfato inorgânico liberado em cada tubo foi determinado (Hernonen e Lahli, 1981). O tempo de reação (15 min) é menor neste caso porque a força iônica é menor (20.4 mM KCl), o que resulta numa atividade ATPásica da acto-miosina-tropomiosina mais alta, igual a 3.3 s^{-1} (Farah et al., 1994).

Estudos dos complexos TnI-TnC por espectroscopia de fluorescência

Estes estudos foram feitos nos laboratórios do Dr. L.B. Smillie, Dept. of Biochemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá.. Os estudos com F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, e F154W-Cdom foram feitos pela Dra. Joyce Pearlstone e por mim entre 13 de Julho e 11 de Agosto de 1993. Para complementar estes resultados, os estudos com F154W-TnC e F154W-Cdom, feitos pela Dra. Joyce Pearlstone, estão incluídos.

Preparação das proteínas. As TnCs fluorescentes (F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, F105W-Cdom, F154W-TnC e F154W-Cdom) foram dialisadas contra o "tampão Apo": 50 mM MOPS (pH 7,1), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT. TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆, TnI₁₋₁₅₆, e TnI₁₀₃₋₁₈₂ foram dialisadas contra o tampão Apo com 1 M KCl. Para as titulações, as TnCs foram diluídas até as concentrações iniciais em tampão Apo (+/- 2 mM CaCl₂) ou em 50 mM MOPS (pH 7,1), 33 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1mM EGTA. Nos estudos de espectro de emissão, as TnCs foram diluídas até as concentrações iniciais com tampão Apo e CaCl₂ (2 mM final) ou MgCl₂ (44 mM final) foram adicionados. As concentrações das proteínas foram determinadas por análise de aminoácidos.

Espectros de emissão de fluorescência. Os espectros foram determinados a 20°C usando-se um "Perkin Elmer MPF-44B Fluorescence Spectrophotometer". A excitação foi feita a 295 nm e a emissão foi monitorada entre 300 e 450 nm. Às soluções de TnCs recombinantes fluorescentes (F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, F105W-Cdom; 1,5 ou 3 μ M) contendo Ca²⁺, Mg²⁺/EGTA ou EDTA (Apo) foram adicionadas 2 a 3 equivalentes molares de TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆ e TnI₁₋₁₅₆ que não têm fluorescências significativas e TnI₁₀₃₋₁₈₂ que fluoresce (por causa do Trp¹⁵⁸). O tempo entre a adição de cada componente e o começo de leitura do espectro era menos de um minuto (assumimos equilíbrio). Os espectros de fluorescência de TnC foram corrigidos para a diluição e para a fluorescência basal de TnI₁₋₁₅₆, TnI₁₋₁₁₆ e TnI₁₋₉₈ (devido às duas tirosinas nas posições 43 e 78) e para fluorescência de TnI₁₀₃₋₁₈₂ (devido ao triptofano na posição 158). Assumimos que as intensidades de fluorescência são proporcionais aos concentrações de TnC, TnI e/ou os complexos.

Titulações de fluorescência das TnC com as TnIs. As ligações entre os fragmentos de TnI e TnC foram investigadas pelas titulações da fluorescência em um comprimento de onda único entre 320 e 360 nm (escolhidos usando-se os espectros de emissão da fluorescência). Nos assumimos que a fração da TnC em complexo com a TnI é igual a $\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$. Soluções de troponina C recombinante fluorescente (F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, F105W-Cdom; 0.5 - 3 μM , 1 mL), contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} /EGTA ou EDTA (Apo), foram titulados com TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆ e TnI₁₋₁₅₆ que não tem fluorescência significantes e TnI₁₀₃₋₁₈₂ que fluoresce (por causa de Trp¹⁵⁸). O tempo entre cada adição da TnI era $\sim 0.5 - 1$ minuto (assumimos equilíbrio). O espectro da fluorescência da TnI₁₀₃₋₁₈₂ não é afetado pela ligação da wt-TnC na presença do Ca^{2+} (dado não mostrado). Depois da correção para a diluição (maximo 6.2%) e a fluorescência de TnI (assumimos que é proporcional a $[\text{TnI}]_{\text{tot}}$), a mudança na fluorescência da TnC (ΔF) em cada concentração de $[\text{TnI}]_{\text{tot}}$ e $[\text{TnC}]_{\text{tot}}$ foi calculada. Estes dados foram usados para calcular constantes de associação (vide abaixo).

Derivação da equação para "curve-fitting".

Assumindo que os fragmentos de TnI e TnC se-ligam para formar um complexo binário (1 TnC + 1 TnI):

$$K_a = [\text{TnI-TnC}]/[\text{TnI}][\text{TnC}]$$

$$\Rightarrow K_a[\text{TnI}][\text{TnC}] = [\text{TnI-TnC}]$$

Assumindo que $[\text{TnI-TnC}]$ é proporcional a $\Delta F/\Delta F_{\text{max}}$

$$K_a[\text{TnI}][\text{TnC}] = [\text{TnC}]_{\text{tot}}(\Delta F/\Delta F_{\text{max}}) \text{ ----- (1)}$$

$$[TnI] = [TnI]_{tot} - [TnI - TnC] \text{ e } [TnC] = [TnC]_{tot} - [TnI - TnC] \text{ ----- (2)}$$

(1) em (2) dá a próxima expressão:

$$[TnC]_{tot}(\Delta F/\Delta F_{max}) =$$

$$K_a([TnI]_{tot} - [TnC]_{tot}(\Delta F/\Delta F_{max}))([TnC]_{tot} - [TnC]_{tot}(\Delta F/\Delta F_{max}))$$

que implica:

$$[TnC]_{tot}(\Delta F/\Delta F_{max})^2 - ([TnI]_{tot} + [TnC]_{tot} + 1/K_a)(\Delta F/\Delta F_{max}) + [TnI]_{tot} = 0 \text{ ----- (3)}$$

(3) é uma equação quadrática de ΔF da forma $a\Delta F^2 + b\Delta F + c = 0$

que tem soluções:

$$\Delta F = (-b + (b^2 - 4ac)^{1/2})/2a \quad \text{ou} \quad \Delta F = (-b - (b^2 - 4ac)^{1/2})/2a$$

$$\text{onde: } a = [TnC]_{tot}/\Delta F_{max}^2$$

$$b = -([TnI]_{tot} + [TnC]_{tot} + 1/K_a)/\Delta F_{max}$$

$$c = [TnI]_{tot}$$

$$\text{desde } \Delta F < \Delta F_{max} \quad \text{então } \Delta F = (-b - (b^2 - 4ac)^{1/2})/2a \text{ ----- (4)}$$

Para estimar K_a e ΔF_{max} , o programa MINSQ foi usado para fazer um "curve-fit" (minimização dos quadrados) da equação (4) dos valores de ΔF contra $[TnI]_{tot}$ e $[TnC]_{tot}$.

RESULTADOS

Sub-clonagem do cDNA da TnI em M13mp18

O fago M13mpR18 (Fig. 8A; Quaggio et al., 1993) que contém o cDNA da TnI é derivado do fago M13mp11 (Waye et al., 1985). Este fago contém dois codons "amber" (Carter, 1987) que impedem o seu crescimento na cepa CJ236 (*supE*) de *E. coli* que é utilizada para produzir fita simples (ssDNA) rica em uracila. Portanto, para preparar ssDNA rico em uracila, o cDNA da TnI foi sub-clonado em M13mp18 (Fig 8B) que não contém os codons "amber" (Carter, 1987). O fragmento EcoRI/BamHI do M13mpR18 foi ligado no M13mp18 cortado com as mesmas enzimas na região "polylinker" (Fig. 8). Esta mistura de DNA foi usada para transformar células competentes do *E. coli* JM101, que cresceram em placas de agar na presença de X-gal e IPTG. As placas claras foram usadas para inocular culturas de *E. coli* JM101 e o ssDNA foi purificado para sequenciamento. O sequenciamento da região próxima ao sítio de ligação BamHI levou ao isolamento do clone desejado, M13mp18TnI, que possui o cDNA da TnI (Fig. 8C). O resultado foi confirmado por digestão com enzimas de restrição.

Introdução de codons de terminação e de sítios de restrição no cDNA da TnI por mutação sítio-dirigida mediada por oligonucleotídeos

O fago M13mp18TnI foi usado para infectar uma cultura de *E. coli* CJ236 (*dut⁻ ung⁻*) e o ssDNA foi purificado. Este DNA, contendo uracila, foi usado como "template" para mutações sítio-dirigidas mediadas por oligonucleotídeos. Os oligonucleotídeos fosforilados foram hibridizados com a ssDNA de M13mp18TnI (Fig. 9) e a segunda fita foi sintetizada com as enzimas Klenow e T4 DNA ligase. A mistura de ligação foi utilizada para infectar células competentes de *E. coli* JM101. As placas resultantes foram utilizadas para preparar DNA de fita única para sequenciamento. Aproximadamente 50% dos clones sequenciados continham as mutações desejadas. Um exemplo de uma autoradiograma de um gel de sequenciamento de um mutante (M13mp18TnIB*A) está mostrado na Figura 10. Os mapas de restrição destes clones são mostrados na Figura 11. A mutação com oligo*S produziu o

M13mp18TnI*S (Fig. 11D) que tem um codon de terminação na posição 117 e um sítio de SpeI nos codons 118 e 119. A mutação com o oligoB*A produziu o M13mp18TnIB*A (Fig. 11A) que tem um codon de terminação na posição 100, um sítio de BstEII nos codons 99, 100 e 101 e um sítio de AvrII nos codons 102 e 103. Em seguida, o M13mp18TnIB*A foi mutado com o oligo*S para produzir o mutante duplo M13mp18TnIB*A*S (Fig. 11B). O mp18TnIB*A*S foi digerido com BstEII e SpeI e tratado com a S1 nuclease para criar "blunt ends" e finalmente ligado. A Figura 11D mostra o gel de sequenciamento de um clone, M13mp18ΔI99/119TnI, que apresenta a deleção correta dos codons 99-119 do domínio inibitório e a sequência codificando a região C-terminal em fase com a sequência codificando a região N-terminal. O mapa de restrição do M13mp18ΔI99/119TnI é mostrado na Figura 11C.

A sequência codificadora da região inibitória da TnI (Fig. 9) possui dois codons de arginina AGG nas posições 103 e 108. O codon AGG é raro em *E. coli* e está associado com baixos níveis de expressão quando está presente nos 25 primeiros aminoácidos (Chen e Inouye, 1990; Quaggio et al., 1993). Assim, utilizamos o oligo Nhe (Fig. 9A) para mudar estes dois codons de AGG para CGT (codon mais abundante para arginina em *E. coli*) evitando problemas futuros na expressão da TnI₁₀₃₋₁₈₂. Este oligonucleotídeo também introduziu um sítio para NheI no começo da região codificadora da região inibitória da TnI (codons 101 e 102), facilitando a clonagem no vetor pET-3a. A Figura 9C mostra como esta mutação foi feita em mp18TnI.

Subclonagem dos cDNAs mutados de TnI no vetor de expressão pET-3a

O mapa de restrição do vetor pET-3a é mostrado na Figura 12A. pET-3a foi usado para construir os vetores de expressão dos vários fragmentos de TnI. Este plasmídeo contém o gene de β-lactamase (bla) que confere resistência à ampicilina.

A Figura 12 mostra a criação do mutante de TnI onde o domínio N-terminal foi deletado. O fragmento NheI/EcoRI do M13mp18TnINhe foi subclonado no vetor pET-3a digerido previamente com as mesmas enzimas, produzindo o plasmídeo pΔN102TnI (Fig

12E). A sequência de aminoácidos da proteína codificada por este plasmídeo - TnI₁₀₃₋₁₈₂ - é mostrada na Figura 13.

Os fragmentos EcoRI/BamHI dos mutantes de TnI M13mp18TnI*S, M13mp18TnIB*A e M13mp18Δ199/119TnI (Fig. 11A,B,C) foram ligados ao pET-3a previamente clivado com BamHI e EcoRI, produzindo os clones pETs10FXTnI*S, pETs10FXTnIB*A e pETs10FXΔI99/119TnI. Os mapas de restrição dos plasmídeos resultantes são mostrados na Figuras 12B, 12C e 12D. Estas construções codificam fusões de TnI com as sequências codificadoras para os primeiros 11 aminoácidos da proteína s10 do fago T7 (s10) e para o Fator Xa (FX).

As regiões s10 e FX do pETs10FXTnIB*A, pETs10FXTnI*S e pETs10FXΔI99/119TnI foram deletadas pela clivagem destes plasmídeos com NdeI e posterior ligação. Estes plasmídeos resultantes - pΔIC99TnI, pΔC117TnI e pΔI99/119TnI (Figs. 12 F,G,H) - codificam os fragmentos de TnI - TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆, ΔI-TnI respectivamente - que não apresentam os domínios inibitórios e/ou C-terminal. As sequências de aminoácidos destas proteínas são mostrados na Figura 13.

Para criar o mutante sem as regiões N-terminal e inibitória, o pETs10FXTnI*S foi digerido com NheI e SpeI e religado para produzir pΔN119ITnI (Fig 12I). A sequência de aminoácidos da proteína TnI₁₂₀₋₁₈₂ codificada pelo este plasmídeo é mostrado na Figura 13.

Os vetores baseados no pET-3a para expressão da wt-TnI e TnI₁₋₁₅₆ (pET-R18 e pET-R131) foram construídos por Ronaldo B. Quaggio em nosso laboratório e estão descritos em Quaggio et al. (1993) e Farah et al. (1994) respectivamente. As sequências destas proteínas são mostrados na Figura 13.

Expressão e purificação dos fragmentos recombinantes de TnI.

Os protocolos de purificação das TnIs mutantes foram baseados no protocolo de purificação da TnI recombinante (Quaggio, 1993). Contudo, precisamos introduzir modificações consideráveis nestes protocolos, em consequência das diferentes propriedades físico-químicas dos mutantes obtidos (vide *Materias e Métodos*). As detalhes das purificações estão descritos em Farah et al. (1994).

TnI₁₋₁₁₆. O melhor nível de expressão desta proteína foi obtido com a cepa BL23(DE3)pLysE de *E. coli*. A Figura 14 mostra o perfil de eluição da TnI₁₋₁₁₆ em coluna de CM-sepharose. A proteína eluiu quase pura entre 100 e 200 mM de NaCl. O sequenciamento dos dez primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal confirmou a sequência S-D-E-E-K-K-R-R-A-A, demonstrando que a metionina inicial foi removida.

TnI₁₋₉₈. A TnI₁₋₉₈ foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysE. A Figura 16 mostra o perfil de eluição da TnI₁₋₉₈ em coluna de CM-sepharose. A proteína eluiu quase pura entre 20 e 50 mM de NaCl (Fig. 15). O sequenciamento dos nove primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal confirmou a sequência S-D-E-E-K-K-R-R-A, demonstrando que a metionina inicial foi removida.

TnI₁₀₃₋₁₈₂. O melhor nível de expressão da TnI₁₀₃₋₁₈₂ foi obtido com a cepa BL23(DE3)pLysS de *E. coli*. A Figura 16 mostra a cromatografia da TnI₁₀₃₋₁₈₂ em coluna de CM-sepharose usando um gradiente entre 100-450 mM de NaCl. Um gradiente de 100-350 mM NaCl também elui a proteína. O sequenciamento dos vinte e um primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal da TnI₁₀₃₋₁₈₂ confirmou a sequência A-S-R-G-K-F-K-R-P-P-L-R-R-V-R-M-S-A-D-A-M, demonstrando que a metionina inicial foi removida.

TnI₁₂₀₋₁₈₂. A TnI₁₂₀₋₁₈₂ foi expressa na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. A Figura 17 mostra o perfil de eluição da proteína durante a cromatografia em coluna de CM-sepharose. Depois de lavagem com 50 mM NaCl, a proteína foi eluída com um gradiente isocrático de 85 mM de NaCl. Lavagem extensiva com 50 mM NaCl também elui a proteína. O sequenciamento dos dezenove primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal da TnI₁₂₀₋₁₈₂

confirmou a sequência A-S-A-M-L-R-A-L-L-G-S-K-H-K-V-N-M-D-L, o que demonstra que a metionina inicial foi removida.

ΔI-TnI. A *ΔI-TnI* foi expressa na cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. O nível de expressão deste proteína é menor do que o apresentado pelos demais fragmentos recombinantes de TnI. A Figura 18 mostra o perfil de eluição da *ΔI-TnI* usando um gradiente de 0-140 mM NaCl à pH 7,0 em coluna de CM-sepharose. A proteína eluiu no meio do gradiente. Por causa do baixo nível de expressão, esta proteína apresenta um grau de pureza menor do que o apresentado pelo demais fragmentos purificados. Mas foi possível realizar o sequenciamento dos dezoito primeiros aminoácidos na extremidade N-terminal, que resultou a sequência: S-D-E-E-K-K-R-R-A-A-T-A-R-R-Q-H-L-K; confirmando a identidade de proteína e demonstrando que a metionina inicial foi removada.

Determinação das condições de ensaio de Mg^{2+} ATPase de acto-miosina

Antes de iniciar os estudos de inibição da atividade ATPásica pelo os fragmentos recombinantes da TnI, determinamos as condições de tempo e a concentração das proteínas à serem utilizadas nos ensaios. A Figura 19A apresenta o acúmulo de fosfato inorgânico em função do tempo usando 0.2 μ M de miosina, 2 μ M de actina e 60 mM KCl (sem tropomiosina), à 25 °C (J.A. Ferro, R.B. Quaggio e C.S. Farah). A atividade Mg^{2+} -ATPásica foi constante por 30 min e a partir deste período apresentou um declínio. Decidimos utilizar 25 minutos como tempo de incubação para os ensaios que se seguiram. A Figura 19B apresenta a dependência da atividade Mg^{2+} -ATPásica em função da concentração de actina, usando 0.2 μ M de miosina, 60 mM KCl, à 25 °C com o tempo de incubação de 25 min. A atividade é máxima (aprox 2.2 s^{-1}) na concentração de actina de 2.5-3 μ M. Decidimos utilizar 4 μ M actina e um tempo maximo de incubação de 25 minutos nos ensaios com 60 mM KCl (Figs. 2 e 3 de Farah et al., 1994). Estes parâmetros de tempo e concentração de actina foram confirmados por R. B. Quaggio, K. Miyamoto e J.A. Ferro na presença de 1.16 μ M α -tropomiosina.

A força iônica deve ser mantida constante durante estes ensaios de ATPase, um vez que a interação entre actina e miosina é sensível a alteração de força iônica (Margossian e

Lowey, 1982; Adelstein & Eisenberg, 1980). Figura 19C mostra o acúmulo de fosfato inorgânico em função do tempo na presença de 20.4 mM KCl e nas seguintes concentrações de actina, miosina e tropomiosina: 4, 0.2 e 1.16 μ M. Neste caso, a velocidade de reação permaneceu constante (aprox. 3.3 s⁻¹) somente até 15 minutos. Logo, utilizamos 10 minutos como tempo máximo de reação nestas condições (Fig. 4 de Farah et al., 1994).

Regulação da atividade Mg²⁺-ATPásica da acto-miosina pelos mutantes de TnI

A capacidade dos fragmentos recombinantes da TnI em regular a atividade Mg²⁺-ATPásica da acto-miosina foi analisada usando três critérios: a) a habilidade em inibir a atividade ATPásica, b) o efeito da TnC na inibição, na presença e ausência de Ca²⁺ e c) a habilidade dos complexos reconstituídos com TnC e TnT em regular a atividade ATPásica de uma maneira dependente de Ca²⁺. Estes resultados foram apresentados nas Figuras 2, 3 e 4 respectivamente de Farah et al. (1994). Em resumo, estes resultados demonstram que:

i) A região inibitória, entre os aminoácidos 99 e 119, é absolutamente necessária para a inibição da atividade Mg²⁺-ATPásica pela TnI ou pelo o complexo terciário de troponina, na ausência de Ca²⁺;

ii) A sequência do lado C-terminal da região inibitória (aminoácidos 117-182) é necessária para obter a inibição máxima, para a manutenção da inibição na presença de TnC (-Ca²⁺) e para a regulação dependente de Ca²⁺ pelo complexo troponina completo;

iii) A sequência no lado N-terminal da região inibitória (aminoácidos 1-98) não é necessária para a inibição nem para a regulação. Esta sequência é responsável pela pequena diminuição da atividade inibitória da wt-TnI causada por TnC na ausência de Ca²⁺ (Fig 3 de Farah et al., 1994) e pode estar envolvida na ativação da atividade ATPásica pelo complexo terciário de troponina (Figura 4 de Farah et al., 1994 e vide discussão abaixo).

Reconstituição e análise dos complexos terciários de troponina (TnI-TnC-TnT)

Para determinarmos quais fragmentos de TnI podem ser reconstituídos em complexos terciários com TnC e TnT na ausência de acto-miosina-tropomiosina, analisamos o perfil de eluição das misturas reconstituídas ($\sim 10 \mu\text{M}$ de cada componente) em coluna de gel filtração (Fig 20). As condições de cromatografia foram semelhantes às utilizadas nos ensaios de ATPase ($+\text{Ca}^{2+}$), mas a força iônica foi aumentada (de 20.4 mM para 100 mM KCl) para reduzir interações não específicas com a coluna. Estes resultados foram apresentados na Figura 5 de Farah et al. (1994). Em resumo, estes resultados demonstram que:

- i) Os fragmentos de TnI que possuem a região N-terminal (aminoácidos 1-98) podem ser incorporados no complexo terciário com TnC e TnT;
- ii) A TnI₁₀₃₋₁₈₂ não formou um complexo terciário nestas condições mas formou um complexo binário com TnC.

Estes resultados sugerem que a região N-terminal da TnI forma parte da superfície de interação com a TnT no complexo troponina. Estes resultados concordam com os estudos de proteção química e "cross-linking" de Hitchcock-DeGregori (1982) e Chong e Hodges (1982) que mapearam o sítio da ligação de TnT próximo aos aminoácidos 40-98 de TnI.

Análise dos complexos entre fragmentos de TnI e mutantes de TnC usando géis de poliacrilamida-uréia e poliacrilamida-glicerol

A interação entre TnI e TnC é muito forte, especialmente na presença de Ca^{2+} (Head & Perry, 1974). Os complexos entre TnI e TnC podem ser visualizados em géis de poliacrilamida contendo 6M uréia na presença de Ca^{2+} e em géis sem uréia na presença de Mg^{2+} (Head & Perry, 1974; Katayama & Nozaki, 1980). Estes complexos possuem mobilidades intermediárias entre a TnC, que migra rapidamente, e a TnI, que fica na origem. Para mapear as interações entre as regiões da TnI e os domínios da TnC, utilizamos este sistema de géis para visualizar a formação dos complexos entre os fragmentos da TnI e mutantes de TnC onde um dos quatro sítios de ligação de metal foi destruído (D30A-TnC,

D66A-TnC, D106A-TnC e D142A-TnC). Também estudamos a formação de complexos entre os fragmentos da TnI e os dois domínios recombinantes da TnC (N-TnC e C-TnC). Um enfraquecimento na estabilidade de um complexo entre um fragmento da TnI e um mutante de TnC em relação ao wt-TnC revela uma interação entre este fragmento de TnI e o domínio de TnC com a mutação. Estes resultados foram apresentados em Farah et al. (1994; Figs. 6 e 7 e Tabelas I e II). Os géis que contribuem para a Tabela II de Farah et al. (1994) são apresentadas na Figura 21. Brevemente, os resultados sugeram que:

- i) A região N-terminal da TnI liga-se ao domínio C-terminal da TnC na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} ;
- ii) A região N-terminal da TnI não se liga ao domínio N-terminal da TnC na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} ;
- iii) A região inibitória/C-terminal da TnI liga-se aos domínios N-terminal e C-terminal da TnC somente na presença de Ca^{2+} .

Os estudos de formação de complexos entre mutantes de TnI e TnC através de géis de poliacrilamida/uréia ou poliacrilamida/glicerol revelaram interações relativamente fortes que persistem (às vezes em uréia) por duas horas (o tempo de corrida do gel) em um campo elétrico que possui a tendência de separar a TnI (carga positivo) da TnC (carga negativa). As interações assim reveladas são provavelmente biologicamente relevantes. Para confirmar as conclusões destes estudos usando um método independente e para estimar as constantes de ligação entre os vários domínios de TnI e TnC, iniciamos estudos de formação de complexos monitorados por mudanças de fluorescência.

FIGURAS 8-21

Figura 8: Clonagem do cDNA da TnI no M13mp18. **A)** M13pR18, um clone baseado no M13mp11 contendo o cDNA da TnI (Quaggio et al., 1993). M13mp11 tem dois codons "amber" nos genes virais e somente pode ser crescido em bactéria tipo *supE*. **B)** M13mp18, um fago de M13 sem codons "amber" que pode ser crescido em bactéria tipo *supE*⁻. **C)** M13mp18TnI. FX = codons da sequência do sítio de clivagem do fator 10.

Figura 8 - Clonagem do cDNA da TnI no vetor M13mp18

Figura 9: Introdução dos codons de terminação e sítios de restrição no cDNA da TnI por mutação sítio-dirigida. **A)** Os oligonucleotídeos usados. **B)** Hibridização dos oligonucleotídeos oligoB*A e oligo*S na forma simples fita do M13mp18TnI. **C)** Hibridização do oligonucleotídeo oligoNhe na forma simples fita do M13mp18TnI. **D)** Os clones resultantes da mutagenesis.

Figura 9: Introdução dos codons de terminação e sítios de restrição no cDNA da Tnl por mutação sítio-dirigida.

Figura 10: Autoradiograma de gel de sequenciamento de M13mp18TnIB*A. A sequência de DNA, aminoácidos codificados e os números dos codons são apresentados no lado esquerdo do autoradiograma.

Figura 10: Autorradiograma do gel de sequenciamento do M13mp18TnIB*A

Figura 11: Mapas de restrição dos mutantes de TnI em M13mp18. **A)** M13mp18TnIB*A. **B)** M13mp18TnIB*A*S. **C)** M13mp18 Δ I99/119TnI. **D)** M13mp18TnI*S. **E)** M13mp18TnINhe.

Figura 11 - Mapas de restrição dos mutantes de Tnl em M13mp18

Figura 12: Subclonagem do cDNA da TnI no vetor de expressão pET-3a. Mapas de restrição de **A)** pET-3a (Studier et al., 1990), **B)** pETs10FXTnIB*A, **C)** pETs10FXTnI*S, **D)** pETs10FX Δ I99/119TnI, **E)** p Δ N102TnI, **F)** p Δ IC99TnI, **G)** p Δ C117TnI, **H)** p Δ I99/119TnI, **I)** p Δ NI119TnI. s10 = sinais de iniciação de tradução e os 11 primeiros codons da proteína 10 do fago T7. O codon de iniciação consiste nas últimas três bases do sítio de NdeI. FX = codons da sequência do sítio de clivagem do fator 10. ori = origem de replicação. ϕ 10 = promotor da transcrição para RNA polimerase do fago T7. ϕ 10 = terminador da transcrição. bla = gene de β -lactamase.

Figura 12 - Subclonagem do cDNA da TnI no vetor de expressão pET-3a

Figura 12 (cont.)

Figura 13: Alinhamento das sequências das TnIs recombinantes. Letras maiúsculas representam aminoácidos presentes na proteína selvagem. Letras minúsculas representam aminoácidos não presentes na proteína selvagem. Ac = grupo N-acetil. As mesmas sequências estão representadas de forma esquemática na parte inferior da Figura.

FIGURA 13: ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DAS TNIS RECOMBINANTES

Figura 14: Purificação da TnI₁₋₁₁₆. Após a lise, a fração insolúvel foi ressuspendida, aplicada numa coluna de CM-sepharose e eluída com um gradiente de NaCl (vide *Material e Métodos*). TnI₁₋₁₁₆ eluiu nas frações indicadas pela barra preta. Abaixo do perfil de eluição um gel de SDS-poliacrilamida das frações contendo TnI₁₋₁₁₆.

Figura 14: Purificação da TnI₁₋₁₁₆

Figura 15: Purificação da TnI₁₋₉₈. Após a lise, a fração insolúvel foi ressuspendida, aplicada numa coluna de CM-sepharose e eluída com um gradiente de NaCl (vide *Material e Métodos*). TnI₁₋₉₈ eluiu nas frações indicadas pela barra preta. Abaixo do perfil de eluição um gel de SDS-poliacrilamida das frações contendo TnI₁₋₉₈. Note que TnI₁₋₉₈ não tem um triptofano, daí sua baixa absorção a 280 nm.

Figura 15: Purificação da TnI₁₋₉₈

Figura 16: Purificação da TnI₁₀₃₋₁₈₂. Após a lise, a fração insolúvel foi ressuspendida, aplicada numa coluna de CM-sepharose e eluída com ua gradiente de NaCl (vide *Material e Métodos*). TnI₁₀₃₋₁₈₂ eluiu nas frações indicadas pela barra preta. Abaixo do perfil de eluição um gel de SDS-poliacrilamida das frações contendo TnI₁₀₃₋₁₈₂.

Figura 16: Purificação da TnI₁₀₃₋₁₈₂

Figura 17: Purificação da TnI₁₂₀₋₁₈₂. Após a lise, a fração solúvel foi fracionada pelas precipitações de sulfato de amônia, aplicada numa coluna de CM-sepharose e eluída com um gradiente de NaCl (vide *Material e Métodos*). TnI₁₂₀₋₁₈₂ eluiu nas frações indicadas pela barra preta. Abaixo do perfil de eluição um gel de SDS-poliacrilamida das frações contendo TnI₁₂₀₋₁₈₂.

Figura 17: Purificação da TnI₁₂₀₋₁₈₂

Figura 18: Purificação da ΔI -TnI. Após a lise, a fração solúvel foi fracionada pelas precipitações de sulfato de amônia, aplicada numa coluna de CM-sepharose e eluída com um gradiente de NaCl (vide *Material e Métodos*). ΔI -TnI eluiu nas frações indicadas pela barra preta. Abaixo do perfil de eluição um gel de SDS-poliacrilamida das frações contendo ΔI -TnI.

Figura 18: Purificação da Δ I-TnI

Figura 19: Determinação dos parâmetros dos ensaios de atividade ATPásica. **A)** Acúmulo de fosfato inorgânico em função do tempo, usando 0,2 μM miosina, 2 μM actina em 20 mM imidazol (pH 7.0), 60 mM KCl, 3,5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5 EGTA, 2 mM NaATP à 25°C. **B)** A dependência da atividade Mg^{2+} -ATPásica em função da concentração de actina, usando 0,2 μM miosina, em 20 mM imidazol (pH 7.0), 60 mM KCl, 3,5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0.5 EGTA, 2 mM NaATP à 25°C com o tempo de incubação de 25 min. A atividade é máxima (aprox. 2.2 s^{-1}) na concentração de actina de 2.5-3 μM . Baseados nestes dados, decidimos utilizar 4 μM actina e um tempo máximo de incubação de 25 minutos nos ensaios com 60 mM KCl (Figs. 2 e 3 de Farah et al., 1994). Os parâmetros de tempo e concentração de actina em **A** e **B** foram confirmados por R. B. Quaggio, C. Miyamoto e J.A. Ferro na presença de 1.16 μM α -tropomiosina. **C)** O acúmulo de fosfato inorgânico em função do tempo usando 4 μM actina, 0,2 μM miosina e 1.16 μM tropomiosina no mesmo tampão de **A** mas contendo 20.4 mM KCl. Neste caso, a velocidade de reação permaneceu constante (aprox. 3.3 s^{-1}) somente até 15-20 minutos. Portanto, utilizamos 10-15 minutos como tempo máximo de reação nestas condições (Fig. 4 de Farah et al., 1994).

Figura 19: Determinação dos parâmetros dos ensaios de atividade ATPásica

Figura 20: Cromatografia dos complexos de troponina reconstituídos. Misturas de reconstituição (200 μ L) contendo fragmentos da TnI recombinantes, TnC e TnT (10 μ M de cada) foram analisadas em uma coluna de gel filtração equilibrada com 20 mM Imidazol-HCl (pH 7,0), 100 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 50 μ M CaCl₂, 0.01% NaN₃, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM DTT. Misturas de reconstituição dos complexos terciários são abreviados por "Tn" seguida pela abreviação, em parênteses, do fragmento correspondente de TnI. Nestas condições, complexos terciários (pico **a**, volume de eluição ~ 8.5 mL) somente foram formadas com fragmentos de TnI contendo a região N-terminal. Uma mistura de TnI₁₀₃₋₁₈₂, TnC e TnT deu um pico (**e**) que elui depois do complexo wt-TnI+TnC (pico **b**, volume de eluição = 9.6 mL, massa molecular = 39.4 kDa), antes da TnC pura (pico **c**, volume de eluição = 10.9 mL, massa molecular = 18.3 kDa), e com a mesma mobilidade do complexo TnI₁₀₃₋₁₈₂+TnC (pico **d**, volume de eluição = 10.5 mL, massa molecular = 27.8 kDa).

Figura 20: Cromatografia dos complexos de troponina reconstituídos

Figura 21: Complexos entre os fragmentos da TnI e os domínios N- e C-terminais da TnC. TnIs e TnCs foram combinados como descrito em "Materias e Métodos" e Farah et al. (1994). Concentrações finais da wt-TnI, TnI₁₋₁₅₆ (V157*TnI) e Δ I-TnI foram 18.4 μ M. Concentrações finais de TnI₁₋₁₁₆ (NI-TnI), TnI₁₋₉₈ (N-TnI) e TnI₁₀₃₋₁₈₂ (IC-TnI) foram 36.8 μ M e a concentração final de TnI₁₂₀₋₁₈₂ (C-TnI) foi 72.4 μ M. Em **A**, C⁺ indica uma concentração de 73.6 μ M por TnI₁₀₃₋₁₈₂ (IC-TnI). Aliquotas de 20 μ L foram separadas pelos géis de Tris-glicina poliacrilamida contendo 6 M uréia (**A**) ou 10% glycerol (**B** e **C**) e CaCl₂ (0.5 mM) (**A** e **B**) ou MgCl₂ (10 mM)/EGTA (1 mM) (**C**).

Figura 21: Complexos entre os fragmentos da TnI e os domínios N- e C-terminal da TnC

Espectros de fluorescência dos complexos entre fragmentos de TnI e mutantes de TnC

Determinamos os espectros de emissão de fluorescência dos complexos formados pelos fragmentos de TnI (TnI₁₋₉₈, TnI₁₋₁₁₆, TnI₁₋₁₅₆) e TnCs fluorescentes (F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, F105W-Cdom, F154W-TnC, F154W-Cdom, F154W-TnC e F154W-Cdom) em três condições diferentes: 1) ausência de metais (estado Apo), 2) presença de Mg²⁺, e 3) presença de Ca²⁺. Em alguns casos, também determinamos os espectros na presença de Ca²⁺ e Mg²⁺. As Figuras 22, 23 e 24 mostram os espectros de emissão dos complexos envolvendo F29W-TnC, F105W-TnC, F29W-Ndom e F105W-Cdom. As Tabelas 1 a 3 apresentam um resumo dos dados obtidos com complexos formados entre cada TnC e a TnI₁₋₉₈, a TnI₁₋₁₁₆, e a TnI₁₋₁₅₆ respectivamente. Nas Tabelas 1 a 3, Fmax representa a fluorescência máxima relativa e λmax representa o comprimento de onda de emissão que resulta na fluorescência máxima. A Tabela 4 lista as mudanças relativas na fluorescência máxima (Fmax_{TnI-TnC}/Fmax_{TnC}) induzidas pela adição de cada fragmento da TnI na presença de Ca²⁺, Mg²⁺ ou na ausência de metais divalentes. Parâmetros mais rigorosos seriam a razão das áreas integradas em baixo de cada curva ou a razão das energias médias dos espectros. Estas análises seriam feitas no futuro. Deve ser notado que estes espectros de emissão foram feitos antes de determinarmos as constantes de ligação. Portanto, dependendo das condições nestes experimentos, todas as moléculas de TnC não foram necessariamente ligadas a um fragmento de TnI e as mudanças em Fmax e λmax causadas por estas ligações não representam necessariamente as mudanças máximas. Também deve ser notado que a adição de MgCl₂ e a solução da TnI (contendo 1 M KCl) aumentam a força iônica da solução e podem afetar as características espectroscópicas das TnCs fluorescentes e/ou inibir a formação dos complexos. Estes fatores foram diminuídos nas titulações (vide abaixo) onde utilizamos soluções contendo CaCl₂ ou MgCl₂ com forças iônicas constantes.

TnI₁₋₉₈: Este fragmento, que contém a região N-terminal da TnI, perturbou as fluorescências (Fmax e/ou λmax) da F105W-TnC e F154W-TnC na presença de Ca²⁺, Mg²⁺ ou na ausência de metais (Fig 22 B e Tabela 1), indicando formação de complexos que mudam a estrutura de domínio C-terminal da TnC nestas condições. A TnI₁₋₉₈ também

perturbou a fluorescência do F105-Cdom e do F154W-Cdom nestas condições (Fig. 22D e Tabela 1). Estes resultados eram esperados já que observamos complexos entre a TnI₁₋₉₈ com a wt-TnC ou a C-TnC na presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺ (Farah et al., 1994). Em geral, na presença de Ca²⁺, foram observadas mudanças maiores de fluorescência induzidas pela TnI₁₋₉₈ nas TnCs com triptofano na posição 154 do que na posição 105 (Tabelas 1 e 4).

Quando a TnI₁₋₉₈ foi adicionada ao F29W-Ndom, nenhuma mudança de fluorescência foi detectada na presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺ (Fig. 22 C e Tabela 1). Este resultado era esperado porque não detectamos a formação de complexo entre a TnI₁₋₉₈ e a N-TnC nos géis de uréia nem de glicerol (Fig. 21 e Farah et al., 1994). O resultado usando a F29W-TnC (TnC completa que contém um triptofano no domínio N-terminal, Fig. 22 A) foi diferente. Neste caso, a adição de TnI₁₋₉₈ perturbou significativamente a fluorescência na presença de Ca²⁺ (Fig. 22 A, Tabelas 1 e 4). Na presença de Mg²⁺ ou na ausência de metais, o efeito de TnI₁₋₉₈ na fluorescência da F29W-TnC é quase imperceptível (Fig. 22 A, Tabelas 1 e 4), apesar de sabermos que ela está ligada nestas condições (vide mudanças na F105W-TnC e F154W-TnC, Tabela 1; Farah et al. (1994)).

TnI₁₋₁₁₆: A adição de TnI₁₋₁₁₆ às TnCs recombinantes com triptofanos no domínio C-terminal (F105W-TnC, F105W-Cdom, F154W-TnC e F154W-Cdom) resultou em mudanças de fluorescência na presença de Ca²⁺, Mg²⁺ ou na ausência de metais (Figura 23B, D e Tabela 2). De novo, na presença de Ca²⁺, as mudanças em Fmax foram geralmente maiores com as TnCs com triptofanos na posição 154.

Quando a TnI₁₋₁₁₆ foi adicionada ao F29W-Ndom uma pequena mudança em λ_{max} (desvio para azul) e uma pequena mudança na Fmax foram detectados na presença de Ca²⁺ mas não na presença de Mg²⁺ (Fig. 23 C e Tabela 2). Estas mudanças foram observadas com concentrações de proteína relativamente baixas com respeito aos experimentos com TnI₁₋₉₈ (1.5 μ M TnC, 2.8 μ M TnI₁₋₁₁₆) e foram confirmadas nos experimentos de titulação (vide em baixo). Este resultado confirma o obtido em Farah et al. (1994) que detectou uma interação entre TnI₁₋₁₁₆ e a N-TnC na presença de Ca²⁺, mas não na presença de Mg²⁺, em géis de poliacrilamida-glicerol (Figura 21). A TnI₁₋₁₁₆ também mudou o espectro de F29W-TnC na presença de Ca²⁺, mas na presença de Mg²⁺ ou na ausência de metais, o efeito foi

relativamente pequeno, (Fig. 23 A e Tabela 2) como foi observada com TnI₁₋₉₈ .

TnI₁₋₁₅₆: Nos experimentos dos géis de poliacrilamida/uréia não detectamos diferenças de afinidade entre a wt-TnI e TnI₁₋₁₅₆ por qualquer mutante ou fragmento de TnC. Logo, nos experimentos de fluorescência, a TnI₁₋₁₅₆ pode ser usada como um modelo de wt-TnI não fluorescente, devido à ausência de triptofano na posição 158. Como foi observado com os fragmentos menores do N-terminal da TnI (acima), a adição da TnI₁₋₁₅₆ às soluções contendo F105W-TnC ou F154W-TnC na presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺ ou na ausência de metais (apo) resultaram em mudanças nos espectros de fluorescência (Fig. 24 C e Tabela 3). De novo, a fluorescência do Trp154 foi geralmente mais sensível à ligação da TnI do que o Trp105 na presença de Ca²⁺. A adição de TnI₁₋₁₅₆ também resultou em mudanças nos espectros de fluorescência da F29W-TnC na presença do Ca²⁺ ou Mg²⁺ e na ausência de metais (Fig. 24 A e Tabela 3); ao contrário dos casos da TnI₁₋₉₈ e TnI₁₋₁₁₆, nos quais as mudanças significantes nos espectros da F29W-TnC somente foram observadas na presença de Ca²⁺. A TnI₁₋₁₅₆ também mudou o espectro do F29W-Ndom na presença de Ca²⁺. O desvio para o azul neste caso foi muito maior do que o observado com a TnI₁₋₁₁₆ ou TnI₁₋₉₈. Esta diferença pode ser devida ao fato de que a presença dos resíduos 117 a 156 em TnI₁₋₁₅₆ aumenta a afinidade para o domínio N-terminal da TnC (Fig. 21; Farah et al., 1994).

TnI₁₀₃₋₁₈₂: Por causa da presença do triptofano 158, o fragmento TnI₁₀₃₋₁₈₂ tem uma fluorescência significativa. Nós determinamos que a fluorescência deste fragmento é insensível à adição de wt-TnC (não fluorescente) na presença de Ca²⁺ (dados não apresentados), condições onde observamos ligação (Farah et al., 1994). Em princípio, podemos subtrair a contribuição da fluorescência deste fragmento durante uma titulação de uma TnC fluorescente (vide abaixo). Este tipo de experimento é limitado pelo fato da razão de $\Delta F_{TnC} : F_{TnI103-182}$ ser relativamente pequena nas concentrações altas de TnI₁₀₃₋₁₈₂. Portanto, não investigamos detalhadamente a interação entre TnI₁₀₃₋₁₈₂ e as TnCs. Em colaboração com o laboratório de Dr. L.B. Smillie, estamos construindo wt-TnI, TnI₁₀₃₋₁₈₂ e TnI₁₂₀₋₁₈₂ não-fluorescentes onde Trp¹⁵⁸ será trocada por uma fenilalanina.

Determinação das constantes de ligação entre os fragmentos de TnI e a TnC através de titulações de fluorescência.

Nos casos onde a adição de TnI resultou numa mudança espectral da TnC relativamente grande, tentamos determinar a constante de associação (K_a) do complexo pela titulação da fluorescência da TnC com o fragmento de TnI. As Figuras 25 a 29 mostram exemplos destas titulações e os "curve-fits" usados para calcular K_a . O modelo de "curve-fit" descrito pela equação (4) em *Materias e Métodos* assume que um mol de TnC liga um mol de TnI. Este modelo só pode ser utilizado para analisar titulações onde não obtemos ΔF_{max} antes da adição de um mol ou mais de TnI. De acordo com o modelo, estas curvas devem apresentar uma forma hiperbólica. A maioria das titulações possuem estas características (por exemplo Figuras 25-27, Tabela 5). Entretanto, em alguns casos, a saturação ocorreu quando a proporção de TnI:TnC era 1:1 mas as curvas foram consistentemente sigmoidais. Estes casos são apresentadas na Figura 28. Em outros casos, as titulações deram curvas hiperbólicas mas a ΔF_{max} foi obtida antes de adicionar um mol de TnI, implicando a formação de um complexo com estequiometria > 1 do TnC:TnI (Figura 29). Primeiro, discutimos os constantes de associação obtidas das titulações bem modeladas pela equação (4). Os casos onde a sigmoidicidade e a estequiometria são anormais são discutidos abaixo.

A Tabela 5 apresenta as K_a s obtidas nas titulações modeladas pela equação (4) em *Materias e Métodos*.

TnI₁₋₉₈: A TnI₁₋₉₈ ligou-se às TnCs inteiras (F154W-TnC ou F29W-TnC) na presença de Ca^{2+} com uma constante de ligação $> 10^8 M^{-1}$. Estas titulações foram limitadas pela concentração mínima de TnC ($\sim 1 \mu M$) necessária para dar um sinal de fluorescência detectável. A K_a entre TnI₁₋₉₈ e o domínio C-terminal da TnC (F154W-Cdom) também é $> 10^8$ na presença de Ca^{2+} . Estas altas afinidades na presença de Ca^{2+} são compatíveis com a detecção destes complexos em géis contendo 6 M uréia e Ca^{2+} (Fig. 21 e Farah et al., 1994). Na presença de Mg^{2+} , as K_a s de ligação entre a TnI₁₋₉₈ e a TnC inteira (F105W-TnC; Fig 25) e o domínio C-terminal de TnC (F105W-Cdom ou F154W-Cdom) diminuíram para menos de $10^7 M^{-1}$. Na ausência de metais, as afinidades caíram ainda mais, abaixo de $10^6 M^{-1}$ (Tabela 5). A TnI₁₋₉₈ não afetou a fluorescência de F29W-Ndom nestas condições (Tabela 1).

TnI₁₋₁₁₆: As constantes de associação envolvendo TnI₁₋₁₁₆ foram semelhantes as obtidas para a TnI₁₋₉₈. A TnI₁₋₁₁₆ se liga às TnCs inteiras (F154W-TnC ou F29W-TnC) na presença de Ca²⁺ com uma constante de ligação de 0,6-1,6 X 10⁸ M⁻¹ (Tabela 5). A Ka de ligação entre a TnI₁₋₁₁₆ e o domínio C-terminal da TnC (F154W-Cdom) também é da ordem de 10⁸ M⁻¹ na presença de Ca²⁺. As Ka de ligação entre a TnI₁₋₁₁₆ e a TnC inteira ou o domínio C-terminal da TnC diminuiu para ~ 10⁶ M⁻¹ na ausência de metais (Tabela 5). A Ka de ligação entre a TnI₁₋₁₁₆ e o F29W-Ndom na presença de Ca²⁺ é 0,8 X 10⁶ M⁻¹. A TnI₁₋₁₁₆ não afetou a fluorescência de F29W-Ndom na ausência de Ca²⁺ (Fig. 23, Tabela 2).

TnI₁₋₁₅₆: Na presença de Ca²⁺, a TnI₁₋₁₅₆ ligou-se às TnCs inteiras com um constante de ligação de 0,8 - 3,8 X 10⁷ M⁻¹, aproximadamente um ordem de magnitude menor do que a observada com a TnI₁₋₉₈ e a TnI₁₋₁₁₆ (Tabela 5). A Ka de ligação entre TnI₁₋₁₅₆ e o domínio C-terminal da TnC (F154W-Cdom) foi da 3,4 X 10⁶ na presença de Ca²⁺, sendo duas ordens de magnitude menor do que a observada com a TnI₁₋₉₈ e a TnI₁₋₁₁₆. A Ka de ligação entre a TnI₁₋₁₅₆ e a TnC inteira (F154W-TnC) na presença de Mg²⁺ foi ~ 6 x 10⁶ M⁻¹ (Tabela 5). Na ausência de metais divalentes, as constantes de associação entre a TnI₁₋₁₅₆ e a TnC inteira ou o domínio C-terminal de TnC são da ordem da 0,4-1,5 X 10⁶ M⁻¹ (Tabela 5; Fig. 27). Estas Kas de ligação na presença de Mg²⁺ ou na ausência de metais divalentes são semelhantes às obtidas com a TnI₁₋₉₈ e a TnI₁₋₁₁₆. Logo, aparentemente, a TnI₁₋₁₅₆ liga-se à TnC inteira ou ao domínio C-terminal da TnC com uma menor afinidade do que os fragmentos menores do N-terminal da TnI na presença de Ca²⁺ e esta diferença desaparece na ausência de Ca²⁺. A Ka de ligação entre TnI₁₋₁₅₆ e o F29W-Ndom na presença de Ca²⁺ é de 2.3 X 10⁶ M⁻¹, três vezes maior do que foi observado com TnI₁₋₁₁₆. A TnI₁₋₁₅₆ não afetou a fluorescência do F29W-Ndom na ausência de Ca²⁺ (Tabela 3).

TnI₁₀₃₋₁₈₂: A adição de TnI103-182 resultou em desvios para o azul nos espectros de F29W-TnC ou F29W-Ndom. As titulações de fluorescência da TnC inteira (F29W-TnC; Fig. 26) ou o domínio N-terminal da TnC (F29W-Ndom) pela TnI₁₀₃₋₁₈₂ na presença de Ca²⁺, resultaram em constantes de associação de 3,3 X 10⁶ M⁻¹ e 3,5 X 10⁶ M⁻¹ respectivamente (Tabela 5). Estas titulações foram limitadas pelo fato da TnI₁₀₃₋₁₈₂ ter fluorescência significativa (devido ao triptofano na posição 158), o que limita a quantidade de TnI₁₀₃₋₁₈₂ que pode ser adicionada. Por esta razão, tentamos sem sucesso determinar o Ka do complexo

mais fraco (Farah et al., 1994) entre TnI₁₀₃₋₁₈₂ e o domínio C-terminal de TnC.

Titulações de forma sigmoidal

Na presença de Ca^{2+} , todas as curvas de titulação das TnCs com o triptofano na posição 105 (F105W-TnC, F105W-Cdom) renderam curvas sigmoidais. Estes casos são marcados como um "S" na Tabela 5 e exemplos são apresentadas em Figura 28. É interessante notar que as curvas de titulação com F154W-TnC e F154W-Cdom são hiperbólicas. Usamos estas curvas para calcular os Kas mostrados na Tabela 5. Este fenômeno não é necessariamente dependente da posição de triptofano, nem da presença de Ca^{2+} , porque também foram observadas curvas sigmoidais nas titulações, na presença de Mg^{2+} , do F154W-Cdom com TnI₁₋₁₅₆ e TnI₁₋₁₁₆ e do F154W-TnC com TnI₁₋₁₁₆ (Tabela 5). Não temos uma boa explicação para este fenômeno, mas podemos observar que as mudanças na fluorescência (ΔF_{max}) durante as titulações sigmoidais são geralmente pequenas (menos de 15% de maior deslocamento do espectrofotometro, Fig. 28) e portanto mais suscetíveis a erros sistemáticos. Uma outra possibilidade é que a sigmoidicidade reflita a formação de complexos com estequiometria diferente de TnC:TnI = 1:1. Esta possibilidade é discutida com mais detalhes a seguir. Kas obtidos pela modelagem com a equação 4 das titulações sigmoidais da F105W-Cdom na presença de Ca^{2+} estão incluídas na Tabela 5 para comparação.

Estequiometria dos complexos

No maioria dos casos, as premissas do modelo descrita pela equação (4) (formação uma complexo binário entre um fragmento da TnI e um molécula de TnC fluorescente) são confirmadas. Obtivemos curvas hiperbólicas que saturam quando um equivalente ou mais de TnI foi adicionada à solução da TnC. Entretanto, em alguns casos (marcados com "E" na Tabela 5), os "curve-fittings" i) produziram curvas que chegaram na ΔF_{max} depois de adicionar um equivalente da TnI mas a ΔF no início da titulação foi excessivo em relação da quantidade de TnI adicionada, ou ii) produziram curvas que chegaram na ΔF_{max} antes de se adicionar um equivalente de TnI. Estas observações sugerem a formação de complexos de ordens superiores, contendo duas moléculas de TnC ou TnI. As inclinações das curvas no

começo das titulações são maiores do que $\Delta F_{\text{max}}/[\text{TnC}]$. Logo, a hipótese mais simples é que, no começo destas titulações, quando $[\text{TnC}] \gg [\text{TnI}]$, complexos terciários $\text{TnC}_2\text{-TnI}$ podem se-formar. Ainda não sabemos se, no final das titulações, quando $[\text{TnC}] \ll [\text{TnI}]$, o complexo terciário permanece ou disproportiona à um complexo binário. Isto por que não sabemos se a mudança espectroscópica no final da titulação corresponde a um complexo terciário ou binário. A segunda hipótese, onde o complexo terciário se forma mas é menos estável quando comparado ao complexo binário, é mais provável.

Apresentamos vários estudos onde caracterizamos as propriedades de vários fragmentos da TnI. Os estudos de regulação demonstraram que as regiões inibitórias e C-terminais da TnI são necessárias para inibir a interação entre actina e miosina e para manter esta inibição na presença da TnC na ausência de Ca^{2+} ou no contexto do complexo terciário da troponina. Os estudos estruturais demonstraram que a metade N-terminal da TnI está envolvida em interações com a TnC independente da presença de Ca^{2+} e com a TnT. Também mapeamos a interação desta região da TnI com o domínio C-terminal da TnC. As regiões inibitórias e C-terminais da TnI ligam TnC de uma maneira dependente de Ca^{2+} . Estas regiões da TnI fazem contatos com os dois domínios da TnC, mas a interação com o domínio N-terminal é mais forte. Estas observações nos leva a concluir que o complexo TnI-TnC é organizado de uma maneira antiparalela onde os domínios estruturais das duas proteínas se interagem de uma maneira independente de Ca^{2+} enquanto os domínios regulatórios interagem de uma maneira dependente de Ca^{2+} (Figura 8 de Farah et al., 1994; Figura 30).

FIGURAS 22-29
TABELAS 1-5

Figura 22: Espectros de emissão de fluorescência dos complexos de TnC fluorescentes com TnI₁₋₉₈. TnCs foram diluídas em 1 mL de tampão Apo: 50 mM MOPS (pH 7,1), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT. As concentrações das TnCs foram de 3 μ M. Na ordem indicada na figura, 10 μ L de 4.4 M MgCl₂ (44 mM final), 2 μ L de 1 M CaCl₂ (2 mM final) e 50 μ L da 244 μ M TnI₁₋₉₈ (11.6 μ M final) foram adicionadas. λ_{ex} = 295 nm. Valores de fluorescência relativo (F) foram corrigidas para a diluição e para a fluorescência da TnI₁₋₉₈ (devida às tirosinas nas posições 43 e 79). **A)** Complexos com F29W-TnC. **B)** Complexos com F105W-TnC. **C)** Complexos com F29W-Ndom. **D)** Complexos com F105W-Cdom. Note que a adição da MgCl₂ e da TnI (dissolvida em tampão acima com 1 M KCl) aumenta a força iônica e pode mudar as propriedades espectroscópicas da TnC e/ou diminuir a afinidade entre TnC e TnI. Estes experimentos foram feitos antes das titulações e os espectros não necessariamente revelam as mudanças máximas na fluorescência obtidas no final de uma titulação.

Figura 22 A: Espectros de emissão do complexo entre F29W-TnC e Tnl1-98

Figura 22 B: Espectros de emissão do complexo entre F105W-TnC e Tnl1-98

Figura 22 C: Espectros de emissão do complexo entre F29W-Ndom e Tnl1-98

Figura 22 D: Espectros de emissão do complexo entre F105W-Cdom e Tnl1-98

Figura 23: Espectros de emissão de fluorescência dos complexos de TnC fluorescentes com TnI₁₋₁₁₆. TnC foram diluídas em 1 mL de tampão Apo: 50 mM MOPS (pH 7,1), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT. As concentrações das TnC foram de 3 μ M. Na ordem indicada na figura, 10 μ L de 4.4 M MgCl₂ (44 mM final), 2 μ L de 1 M CaCl₂ (2 mM final) e 50 μ L da 59.2 μ M TnI₁₋₁₁₆ (2.8 μ M final) foram adicionadas. Em parte **B-ii**, 20 μ L de 300 μ M TnI₁₋₁₁₆ (5.9 μ M final) foram adicionadas. λ_{ex} = 295 nm. Valores de fluorescência relativa foram corrigidas para a diluição e para a fluorescência da TnI₁₋₁₁₆ (devida às tirosinas nas posições 43 e 79). **A)** Complexos com F29W-TnC. **B)** Complexos com F105W-TnC. **C)** Complexos com F29W-Ndom. **D)** Complexos com F105W-Cdom. Note que a adição da MgCl₂ e da TnI (dissolvida em tampão acima com 1 M KCl) aumenta a força iônica e pode mudar as propriedades espectroscópicas da TnC e/ou diminuir a afinidade entre TnC e TnI. Estes experimentos foram feitos antes das titulações e os espectros não necessariamente revelam as mudanças máximas na fluorescência obtidas no final de uma titulação.

Figura 23 A: Espectros de emissão do complexo entre F29W-TnC e Tnl1-116

Figura 23 B: Espectros de emissão do complexo entre F105W-TnC e Tnl1-116

Figura 23 C: Espectros de emissão do complexo entre F29W-Ndom e Tnl1-116

Figura 23 D: Espectros de emissão do complexo entre F105W-Cdom e Tnl1-116

Figura 24: Espectros de emissão de fluorescência dos complexos de TnCs fluorescentes com TnI₁₋₁₅₆. TnCs foram diluídas em 1 mL de tampão Apo: 50 mM MOPS (pH 7,1), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT. As concentrações das TnCs foram de 3 μ M. Na ordem indicada na figura, 10 μ L de 4.4 M MgCl₂ (44 mM final), 2 μ L de 1 M CaCl₂ (2 mM final) e 50 μ L da 216 μ M TnI₁₋₁₅₆ (10.3 μ M final) foram adicionadas. λ_{ex} = 295 nm. Valores de fluorescência relativa foram corrigidas para a diluição e para a fluorescência da TnI₁₋₁₅₆ (devida às tirosinas nas posições 43 e 79). **A)** Complexos com F29W-TnC. **B)** Complexos com F105W-TnC. **C)** Complexos com F29W-Ndom. **D)** Complexos com F105W-Cdom. Note que a adição da MgCl₂ e da TnI (dissolvida em tampão acima com 1 M KCl) aumenta a força iônica e pode mudar as propriedades espectroscópicas da TnC e/ou diminuir a afinidade entre TnC e TnI. Estes experimentos foram feitos antes das titulações e os espectros não necessariamente revelam as mudanças máximas na fluorescência obtidas no final de uma titulação.

Figura 24 A: Espectros de emissão do complexo entre F29W-TnC e Tnl1-156

Figura 24 B: Espectros de emissão do complexo entre F105W-TnC e Tnl1-156

Figura 24 C: Espectros de emissão do complexo entre F29W-Ndom e Tnl1-156

Figura 24 D: Espectros de emissão do complexo entre F105W-Cdom e Tnl1-156

Figura 25: Titulação de Mg^{2+} -F105W-TnC com $\text{TnI}_{1.98}$ a 350 nm. A fluorescência de F105W-TnC ($2.59 \mu\text{M}$, 1.0 mL) em 50 mM MOPS (pH 7,1), 33 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA foi titulada com $\text{TnI}_{1.98}$. A linha representa o melhor "fit" dos dados experimentais (pontos) de uma titulação.

Figura 25: Titulação de Mg^{2+} -F105W-TnC com $\text{TnI}_{1.98}$ a 350 nm

$[\text{F105W-TnC}] = 2.59 \mu\text{M}$

Figura 26: Titulação de Ca^{2+} -F29W-TnC com $\text{TnI}_{103-182}$ a 340 nm. A fluorescência de F29W-TnC ($0.75 \mu\text{M}$, 1.0 mL) em 50 mM MOPS ($\text{pH } 7.1$), 100 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM DTT foi titulada com $\text{TnI}_{103-182}$. Observamos que a adição da $\text{TnI}_{103-182}$ causa um desvio para o azul nos espectros de fluorescência de F29W-TnC e F29W-Ndom (dados não apresentados). A linha representa o melhor "fit" dos dados experimentais (pontos) de uma titulação.

Figura 26: Titulação de Ca^{2+} -F29W-TnC com $\text{TnI}_{103-182}$ a 340 nm

$[\text{F29W-TnC}] = 0.75 \mu\text{M}$

Figura 27: Titulação de Apo-F105W-Cdom com TnI₁₋₁₅₆ a 330 nm. A fluorescência de F105W-Cdom (1.50 μ M, 1.0 mL) em 50 mM MOPS (pH 7,1), 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT foi titulada com TnI₁₋₁₅₆. A linha representa o melhor "fit" dos dados experimentais (pontos) de uma titulação.

Figura 27: Titulação de Apo-F105W-Cdom com TnI_{1-156} a 330 nm

$[\text{F105W-Cdom}] = 1.50 \mu\text{M}$

Figura 28: Titulações de forma sigmoideal. Exemplos das titulações das F105W-TnC (**A** e **B**) e F105W-Cdom (**C**, **D**, **E**) na presença de Ca^{2+} . A TnI utilizada é indicada em cada gráfico. Todas produziram curvas sigmoideais. A linha representa o melhor "fit" dos dados experimentais (pontos) de uma titulação. As ΔF_{max} observadas nestes titulações foram muito baixas.

Figura 28: Títulações de forma sigmoidal

Figura 29: Titulações com razões TnC:TnI maiores que 1. Exemplos dos titulações de F105W-TnC (**A** e **B**) e F105W-Cdom (**C** e **D**) na presença de Mg^{2+} . A TnI utilizada é indicada em cada gráfico. A linha representa o melhor "fit" dos dados experimentais (pontos) de uma titulação, assumindo a formação de um complexo binário entre a TnI e TnC. Note que, no começo de cada titulação, a inclinação dos pontos experimentais é maior do que $\Delta F/[TnC]$. Isto sugere que, quando $[TnC] \gg [TnI]$, pode ser formado um complexo com mais de uma TnC por TnI.

Figura 29: Titulações com razões TnC:TnI maiores que 1

Tabela 1: Sumário dos dados obtidos a partir dos espectros de emissão dos complexos entre a TnI₁₋₉₈ e as TnCs fluorescentes.

	F29W -TnC	F105W -TnC	F154W -TnC	F29W- Ndom	F105W -Cdom	F154W -Cdom	
cond:	$\lambda_{\max}$	Fmax	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$	Fmax
i /							
apo	337	27.3	343	338	344	343	20.8
+Mg ²⁺	337	27.2	320	338	339	320	48.7
+TnI ₁₋₉₈	336	25.9	318	336	336	318	48.9
+Ca ²⁺	324	79.7	316	336	336	314	57.7
ii /							
apo	337	27.3	343	338	344	343	20.8
+Ca ²⁺	336	108	322	336	335	322	37.3
+TnI ₁₋₉₈	332	92.2	316	336	333	314	57.7
+Mg ²⁺			316	336		314	66.1
iii /							
apo	337	27.3	343		344	343	20.8
+TnI ₁₋₉₈	335	27.9	328		343	332	23.8
+Mg ²⁺	336	28.8	320		336	318	48.3
+Ca ²⁺	?	87.3	315		335	316	56.7

* Condições i, ii, e iii definidas na Figura 22. $\lambda_{\max}$: comprimento de onda (nm) com a maior intensidade da fluorescência. Fmax : intensidade relativa da fluorescência no $\lambda_{\max}$.

Tabela 2: Sumário dos dados obtidos a partir dos espectros de emissão dos complexos entre a TnI_{1-116} e as TnCs fluorescentes.

	F29W -TnC	F105W -TnC	F154W -TnC	F29W- Ndom	F105W -Cdom	F154W -Cdom	
cond:	λ_{max}	Fmax	λ_{max}	λ_{max}	λ_{max}	λ_{max}	Fmax
i /							
apo	337	19.0	344	338	344	343	42.3
+Mg ²⁺	337	20.0	339	338	339	320	66.9
+TnI ₁₋₁₁₆	336	21.6	335	339	336	315	64.5
+Ca ²⁺	328	68.3	332	336	334	312	65.1
ii /							
apo	337	19.0	344	338	344	343	42.3
+Ca ²⁺	336	76.4	336	336	335	322	41.6
+TnI ₁₋₁₁₆	329	75.2	335	335	333	312	66.1
+Mg ²⁺	328	67.7	333	336	336	312	42.8
iii /							
apo	337	19	344	338	344	343	42.3
+TnI ₁₋₁₁₆	336	20.3	339	336	343	335	39.2
+Mg ²⁺	336	20.8	335	334	337	315	69.8
+Ca ²⁺	328	66.9	334	336	334	313	68.9

* Condições i, ii, e iii definidas na Figura 23. λ_{max} : comprimento de onda (nm) com a maior intensidade da fluorescência. Fmax : intensidade relativa da fluorescência no λ_{max} .

Tabela 3: Sumário dos dados obtidos a partir dos espectros de emissão dos complexos entre a TnI_{1-156} e as TnCs fluorescentes.

	F29W -TnC	F105W -TnC	F154W -TnC	F29W- Ndom	F105W -Cdom	F154W -Cdom	
cond*:	λ_{max}	Fmax	λ_{max}	λ_{max}	λ_{max}	λ_{max}	Fmax
i/							
apo	337	27.4	344	338	344	343	33.9
+Mg ²⁺	337	27.6	339	338	339	320	76.3
+TnI ₁₋₁₅₆	335	29.6	334	338	335	314	73.7
+Ca ²⁺	324	93.9		333	334	312	91.1
ii/							
apo	337	27.4	344	338	344	343	33.9
+Ca ²⁺	336	113	336	336	335	322	61.0
+TnI ₁₋₁₅₆	324	93.1	332	323	333	312	90.7
+Mg ²⁺						312	73.2
iii/							
apo	337	27.4	344	338	344	343	33.9
+TnI ₁₋₁₅₆	333	33.6	336	335	338	322	42.7
+Mg ²⁺	338	29.4	334	335	336	315	75.3
+Ca ²⁺	324	94.8	332	332	334	313	91.3

* Condições i, ii, e iii definidas na Figura 24. λ_{max} : comprimento de onda (nm) com a maior intensidade da fluorescência. Fmax : intensidade relativa da fluorescência no λ_{max} .

Tabela 4: Mudanças relativas* na Fmax das TnCs fluorescentes induzidas pela ligação dos fragmentos de TnI.

		TnI ₁₋₉₈	TnI ₁₋₁₁₆	TnI ₁₋₁₅₆
F29W-TnC	Ca ²⁺	0.85	0.98	0.82
	Mg ²⁺	0.95	1.08	1.07
	Apo	1.02	1.06	1.22
F29W-Ndom	Ca ²⁺	1.02	1.04	0.92
	Mg ²⁺	0.98	1.06	0.98
	Apo		1.05	1.05
F105W-TnC	Ca ²⁺	1.15	1.26	1.13
	Mg ²⁺	0.74	0.79	0.70
	Apo	1.12	1.11	1.34
F105W-Cdom	Ca ²⁺	1.54	1.52	1.49
	Mg ²⁺	1.00	1.00	0.97
	Apo	1.14	1.12	1.26
F154W-TnC	Ca ²⁺	1.66	1.51	1.62
	Mg ²⁺	1.01	1.02	1.13
	Apo	0.98	0.90	1.68
F154W-Cdom	Ca ²⁺	1.61	1.58	1.58
	Mg ²⁺	1.04	0.96	1.06
	Apo	1.21	0.93	1.27

* Mudança relativa = $F_{\text{max-TnI-TnC}}/F_{\text{max-TnC}}$ dos dados das Tabelas 1-3.

Tabela 5: Constantes de associação entre fragmentos da TnI e TnC_s fluorescentes

(valores x 10⁶ M⁻¹ (DP*))

		TnI ₁₋₁₅₆	TnI ₁₋₁₁₆	TnI ₁₋₉₈	TnI ₁₀₃₋₁₈₂
F29W-TnC	Ca ²⁺	38.32 (1.98)	63.21 (2.61)	539 (121)	3.46 (1.12)
	Mg ²⁺				
	Apo	0.44 (0.06)			
F105W-TnC	Ca ²⁺	S	S	S	
	Mg ²⁺	E	E	3.76 (1.78)	
	Apo	0.83			
F154W-TnC	Ca ²⁺	8.04 (0.46)	166.4 (1.6)	> 100	
	Mg ²⁺	6.13 (0.53)	S		
	Apo	1.47 (0.05)	0.71 (0.06)	0.54 (0.02)	
F29W-Ndom	Ca ²⁺	2.27 (0.06)	0.81 (0.43)		3.27 (2.24)
	Mg ²⁺				
	Apo				
F105W-Cdom	Ca ²⁺	S 6.8 (4.1)	S > 100	S 30 (28)	
	Mg ²⁺	E	E	1.77 (0.42)	
	Apo	1.46 (0.26)			
F154W-Cdom	Ca ²⁺	3.40 (0.36)	221 (26)	238 (139)	
	Mg ²⁺	S	S	7.72 (0.01)	
	Apo	0.76 (0.05)	1.08 (0.12)	0.17 (0.02)	

* DP, desvio padrão. Todas as titulações foram feitas pelo menos duas vezes.

S: curva sigmoidal (vide Figura 28).

E: forma de curva não compatível com a formação de um complexo binário (vide Figura 29).

DISCUSSÃO

A TnI interage com todos os componentes regulatórios do filamento fino do músculo esquelético: actina, tropomiosina, TnC e TnT. As interações com actina e tropomiosina provavelmente são responsáveis por manter o músculo num estado relaxado em baixos níveis de Ca^{2+} . Na presença de Ca^{2+} , a ligação entre a TnI e a actina-tropomiosina é substituída pelas interações com a TnC dependentes de Ca^{2+} . A função da interação entre a TnI e a TnT não é conhecida (Leavis e Gergely, 1984; Ohsuki et al., 1986; Zot e Potter, 1987, Silva e Reinach, 1991). Os detalhes estruturais destas interações e as mudanças dependentes dos níveis de Ca^{2+} constituem o cerne do mecanismo de regulação da contração muscular.

Devido a problemas na expressão da TnI em bactéria, a investigação das funções das diferentes regiões de TnI ficaram restritas ao uso de fragmentos proteolíticos ou peptídeos sintéticos relativamente pequenos, disponíveis em pequenas quantidades. A expressão da TnI recombinante em bactéria, desenvolvida recentemente em nosso laboratório (Quaggio et al., 1993) e em outros (Sheng et al., 1993; Kuwe et al., 1993), abriu a possibilidade de se desenhar racionalmente e expressar grandes quantidades de vários mutantes de TnI. Neste estudo caracterizamos fragmentos de TnI correspondentes a combinações das regiões N-terminal, inibitória e C-terminal. Utilizamos estes fragmentos recombinantes, em combinação com mutantes da TnC e com TnT, para investigar a estrutura e o mecanismo regulatório do complexo troponina.

Estrutura do complexo TnI-TnC

O complexo TnI-TnC é central no mecanismo que controla a contração do músculo esquelético. A ligação de Ca^{2+} induz mudanças estruturais na TnC que fortalecem a interação TnC-TnI e removem o efeito inibitório da TnI sobre a atividade Mg^{2+} -ATPásica da acto-miosina-tropomiosina. Entretanto, um modelo definitivo da topologia deste complexo ainda não se encontra disponível, uma vez que o complexo não foi cristalizado (Gergely et al., 1992; Sheng et al., 1992). Empregando-se o sistema de eletroforese em géis de poliacrilamida, para se visualizar a formação de complexos entre fragmentos de TnI e

mutantes ou fragmentos de TnC, observamos que todos os fragmentos da TnI contendo a região N-terminal (aminoácidos 1-98) formavam complexos com wt-TnC na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Os fragmentos de TnI que não contêm esta região formaram complexos com wt-TnC somente na presença de Ca^{2+} . Isto indica que a metade N-terminal da TnI (aminoácidos 1-98) contém uma região que é responsável pelas interações com TnC dependentes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ e as regiões inibitórias e C-terminais são responsáveis pelas interações dependentes de Ca^{2+} . Sheng et al. (1992) chegaram à conclusão semelhante a partir dos estudos de uma TnI com os primeiros 57 aminoácidos deletados.

A interação entre a região N-terminal da TnI e wt-TnC é mais estável na presença de Ca^{2+} (complexos observados na presença de 6M uréia) do que com Mg^{2+} (complexos observados somente na ausência de uréia). Isto implica que esta interação também tem um componente dependente de Ca^{2+} . Katayama e Nozaki (1982) observaram um resultado semelhante com um oligopeptídeo correspondente aos aminoácidos 10-25 da TnI. Consequentemente, os resultados utilizando wt-TnC não definem inequivocamente quais regiões da TnC estão envolvidas com quais regiões da TnI. Para investigar este assunto, utilizamos mutantes e fragmentos da TnC.

Estudos de eletroforese

Demonstramos que as interações entre a região N-terminal da TnI e TnC são sensíveis à destruição dos sítios III e IV da TnC mas são insensíveis à destruição dos sítios I e II da TnC, implicando uma interação com o domínio C-terminal da TnC. Isto foi confirmado pela observação de que TnI₁₋₉₈ se liga ao domínio C-terminal da TnC (C-TnC), mas não se liga ao domínio N-terminal da TnC (N-TnC).

As interações entre TnC e TnI₁₀₃₋₁₈₂ (contendo as regiões inibitória e C-terminal) são sensíveis às rupturas dos sítios I e II, mas são menos sensíveis às rupturas dos sítios III e IV da TnC, demonstrando uma interação com o domínio N-terminal da TnC. Isto foi confirmado pela observação de que, nas condições onde a TnI₁₀₃₋₁₈₂ se liga à N-TnC fortemente (géis contendo 6 M uréia), o complexo formado com C-TnC foi muito fraco e somente foi bem observado na ausência de uréia (Farah et al., 1994). Em contraste com os fragmentos da TnI

contendo a região N-terminal, todas as interações entre TnI₁₀₃₋₁₈₂ e TnC só foram observadas na presença de Ca²⁺.

Desde que o fragmento TnI₁₀₃₋₁₈₂ liga-se aos dois domínios da TnC, é interessante tentar separar as contribuições das regiões inibitória e C-terminal. As evidências, apresentadas nesta tese, de que a região inibitória da TnI confere interações dependentes de Ca²⁺ com os dois domínios de TnC são:

- i) Todos os fragmentos de TnI contendo esta região ligam-se à N-TnC na presença de Ca²⁺.
- ii) Δ I-TnI, TnI₁₋₉₈ e TnI₁₂₀₋₁₈₂ não se ligam à N-TnC.
- iii) TnI₁₀₃₋₁₈₂ liga-se à C-TnC na presença de Ca²⁺, mas uma interação entre TnI₁₂₀₋₁₈₂ e C-TnC não foi observada.

O mapeamento da interação entre a região C-terminal de TnI e TnC foi dificultada pelo fato da ligação entre TnI₁₂₀₋₁₈₂ e wt-TnC ser muito fraca. Além disso, não conseguimos detectar sensibilidades à destruição dos sítios da região N-terminal ou na região C-terminal da TnC. Tampouco detectamos complexos de TnI₁₂₀₋₁₈₂ com N-TnC ou com C-TnC. Logo, não pudemos mapear diretamente o sítio de ligação deste fragmento da TnI na TnC. Obtivemos várias evidências, entretanto, que sugerem que a região C-terminal da TnC interage com a região N-terminal da TnC:

- i) A TnI₁₋₁₁₆ não se liga à N-TnC na presença de 6M uréia. Entretanto, TnI₁₋₁₅₆, wt-TnI e TnI₁₀₃₋₁₈₂ ligam-se à N-TnC nesta condição.
- ii) A TnI₁₋₉₈ não formou um complexo com D142A-TnC em 6 M uréia. Entretanto, a formação de um complexo fraco foi observada entre Δ I-TnI (aminoácidos 1-98 + 120-182) e D142A-TnC.
- iii) A ligação entre TnI₁₂₀₋₁₈₂ e wt-TnC é dependente de Ca²⁺ e não é observada na presença de Mg²⁺.

Estas observações qualitativas dos complexos nos géis de poliacrilamida levam-nos a concluir que o complexo TnI-TnC é organizado de maneira antiparalela (Fig. 8 de Farah et al., 1994; Fig 30). Neste modelo, a região N-terminal da TnI interage com a região C-terminal da TnC na presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺ e as regiões inibitória e C-terminal da TnI

interagem com o domínio N-terminal da TnC somente na presença de Ca^{2+} . A região inibitória também interage com o domínio C-terminal da TnC na presença de Ca^{2+} .

Este modelo foi testado por meio de estudos de espectroscopia de fluorescência. Nestes experimentos, utilizamos mutantes fluorescentes de TnC onde a Phe29, a Phe105 ou a Phe154 da wt-TnC, N-TnC ou C-TnC foram mutados para Trp29, Trp105 ou Trp154 (Pearlstone et al., 1992; Trigo-Gonzalez et al., 1992; Li et al., 1994; Chandra et al., 1994).

Estudos de fluorescência:

I) *Características gerais dos espectros de emissão das TnCs fluorescentes.* As TnCs fluorescentes F29W-TnC, F29W-Ndom, F105W-TnC, F105W-Cdom, e F154W-TnC já foram caracterizadas utilizando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular na presença de Ca^{2+} , de Mg^{2+} ou ausência de metais por Smillie e colaboradores (Pearlstone et al., 1992; Trigo-Gonzalez et al., 1992; Li et al., 1994; Chandra et al., 1994). As propriedades fluorimétricas foram confirmadas neste trabalho. Os λ_{max} do F29W-TnC e F29W-Ndom no estado Apo e na presença de Ca^{2+} (336 - 338 nm) são menores do que é observado para o triptofano em água (~ 348 nm; Lacowicz, 1983) indicando que o Trp²⁹ não é completamente exposto ao solvente. Na estrutura cristalina da TnC, a Phe²⁹ está localizada antes da primeira posição de coordenação do sítio I (Asp³⁰), estando parcialmente exposta ao solvente e apresentando vários contatos com resíduos vizinhos (Met²⁸, Ile³⁷, Glu⁴¹, Thr⁴⁴, Val⁴⁵, Met⁴⁸; Fig. 4) (Herzberg e James, 1988; Pearlstone et al., 1992). No modelo de Herzberg et al. (1986) da transição induzida pelo Ca^{2+} no domínio N-terminal (vide Figura 4C na *Introdução*), a Phe²⁹ faz contatos com um outro grupo de resíduos (Ala²⁵, Ile³⁷, Val⁴⁵, Phe⁷⁸) apesar de a superfície exposta ao solvente não aumentar muito (Herzberg et al., 1986; Pearlstone et al., 1992). A presença de Ca^{2+} causa um aumento na intensidade de fluorescência (rendimento quântico) de três a quatro vezes, uma mudança não observada na presença de Mg^{2+} (Figuras 22-24; Pearlstone et al., 1992). Uma variedade de fatores podem causar este fenômeno, incluindo diminuição de mobilidade ou internalização do fluoróforo, que pode diminuir a velocidade de processos não-radiativos dependentes de contato com o solvente (Lacowicz, 1983; Szabo, 1989).

O resíduo 105 da TnC está localizado numa posição equivalente ao resíduo 29, agora

no sítio III. Na ausência de metal, as λ_{max} das F105W-TnC e F105W-Cdom (343-346 nm, Tabelas 1-3) são semelhantes ao λ_{max} do triptofano em água, sugerindo que este resíduo é muito exposto ao solvente. Isto é compatível com a idéia que o domínio C-terminal perde muito de sua estrutura secundária quando metais divalentes estão removidos dos sítios III e IV. Em contraste, os elementos estruturais secundários do domínio N-terminal estão presentes tanto no estado Apo quanto no estado com dois Ca^{2+} (Grabarek e Gergely, 1992). Os λ_{max} do F105W-TnC e F105W-Cdom desviam para o azul na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Estes comprimentos de onda (335 - 339 nm, Tabelas 1-3) são semelhantes aos observados com F29W-TnC e F29W-Ndom, indicando um ambiente mais apolar do que no estado Apo. Além do desvio para o azul, a adição de Ca^{2+} causa um pequeno aumento na F_{max} (Tabelas 1-3), muito menor do que o observado com F29W-TnC e F29W-Ndom. Portanto, apesar de ocupar posições simétricas nos sítios I e III e nos domínios N-terminal e C-terminal, os ambientes dos resíduos 29 e 105 da TnC na presença de Ca^{2+} são diferentes. Talvez as várias fenilalaninas presentes no domínio C-terminal (Phe 102, Phe151, Phe154), que formam uma parte do "core" hidrofóbico deste domínio (Herberg et al., 1985, 1988), poderiam afetar a fluorescência do Trp¹⁰⁵. A adição de Mg^{2+} tem um efeito maior na intensidade de fluorescência do que o Ca^{2+} , resultando num aumento de aproximadamente 100% na F_{max} (Tabelas 1-4). Estas observações são consistentes com a idéia de que a estrutura do domínio C-terminal é diferente na presença de Mg^{2+} ou na presença de Ca^{2+} (Zot e Potter, 1987; Grabarek et al., 1992).

Os mutantes F154W-TnC e F154W-Cdom têm triptofanos na posição 154 da TnC. Esta posição está situada na hélice H, após o sítio IV (Fig 4). As propriedades fluorescentes destas TnCs são semelhantes às das TnCs com triptofanos na posição 105 (Chandra et al., 1994). No estado Apo, os λ_{max} são ~ 343 nm, indicando um ambiente polar. Na presença de Mg^{2+} ou Ca^{2+} , os desvios para o azul (λ_{max} = 318-322 nm) são maiores do que quando observados com F105W-TnC e F105W-Cdom (Tabelas 1-3; Chandra et al., 1994). Os aumentos na intensidade de fluorescência causados pelo Mg^{2+} são maiores do que aqueles causados pelo Ca^{2+} (Tabelas 1-3; Chandra et al., 1994). Deve ser notado que um componente das mudanças observadas nos espectros de emissão de todas estas TnCs é devido às mudanças nos coeficientes de absorção dos triptofanos no comprimento de onda de excitação (Pearlstone et al., 1992; Chandra et al., 1994).

Li et al. (1994) demonstraram que a soma dos espectros de dicroísmo circular dos dois domínios da TnC (F29W-Ndom + C-TnC) é virtualmente igual ao espectro do F29W-TnC ou uma mistura equimolar dos dois domínios, indicando que os elementos estruturais dos dois domínios da molécula estão presentes nos domínios isolados. O mesmo estudo também demonstrou que titulações de fluorescência da F29W-TnC e F29W-Ndom pelo Ca^{2+} produzem semelhantes curvas e constantes de associação para Ca^{2+} dos sítios I e II. Por outro lado, foram observadas diferenças entre F105W-TnC e F105W-Cdom. A F105W-Cdom tem uma afinidade para Ca^{2+} ~ 2 vezes maior do que F105W-TnC (Li et al., 1994). Titulações com Ca^{2+} da fluorescência da F154W-TnC produziram Kas iguais aos Kas dos sítios de alta afinidade determinadas pelas titulações do dicroísmo circular, mas estes sítios de alta afinidade de F154W-TnC têm afinidades para Ca^{2+} ~ 2 vezes menor do que wt-TnC (Chandra et al., 1994). Estes estudos indicaram que, pelo menos com respeito à ligação de Ca^{2+} , mudanças na fluorescência do triptofano na posição 29 são uma indicação de mudanças estruturais no domínio N-terminal da TnC e mudanças na fluorescência no triptofano 105 ou triptofano 154 são indicações de mudanças estruturais no domínio C-terminal da TnC.

II) Espectros de emissão dos complexos entre fragmentos de TnI e as TnCs fluorescentes. Utilizamos as TnCs fluorescentes para estudar as interações entre fragmentos da TnI e os domínios da TnC. Observamos que a adição da TnI₁₋₉₈, da TnI₁₋₁₁₆ ou da TnI₁₋₁₅₆ altera os espectros das TnCs com triptofanos no domínio C-terminal (F105W-TnC e F154W-TnC) e dos domínios C-terminais isolados (F105W-Cdom e F154W-Cdom) na presença de Ca^{2+} , de Mg^{2+} ou mesmo na ausência dos metais divalentes. Todas estas mudanças envolveram desvios do λ_{max} para o azul (Figs 22-24, Tabelas 1-3), indicando que a região N-terminal da TnI, comum em todos os fragmentos, diminui a acessibilidade ao solvente dos resíduos 105 e 154 da TnC.

No caso de F105W-TnC e F105W-Cdom, a adição de fragmentos da TnI na presença de Ca^{2+} resultou num aumento da intensidade da fluorescência. Por outro lado, a adição de fragmentos da TnI na presença de Mg^{2+} diminuiu a intensidade de fluorescência (Figs. 22-24, Tabelas 1-3). A adição de Ca^{2+} e Mg^{2+} resultou em espectros semelhantes aos espectros dos complexos na presença de Ca^{2+} , indicando que o Ca^{2+} desloca grande parte do Mg^{2+} ligado nos sítios III e IV da TnC nestes complexos. O mesmo fenômeno é observado nas TnCs

isoladas (Pearlstone et al., 1992). Nos mutantes F105W-TnC e F105W-Cdom, as mudanças relativas ($F_{\text{max-TnC-TnI}}/F_{\text{max-TnC}}$) induzidas pela TnI₁₋₁₅₆ foram comparáveis às mudanças relativas induzidas pela TnI₁₋₉₈, na presença de Ca^{2+} ou na presença de Mg^{2+} (Tabela 4). Isto sugere que, nestas condições, a presença dos aminoácidos 99 a 156 tem somente um pequeno efeito no ambiente do Trp¹⁰⁵ (sítio III) e a maior contribuição é devida à interação com a metade N-terminal da TnI. É importante notar que as mudanças relativas induzidas da TnI₁₋₁₅₆ e TnI₁₋₉₈ na F105W-TnC na ausência de metais divalentes não são iguais (Tabela 4).

No caso de F154W-TnC e de F145W-Cdom, a adição das três TnIs causou aumentos na intensidade de fluorescência das TnCs em $\sim 60\%$ na presença de Ca^{2+} ; maiores do que foram observados com as TnCs com triptofanos na posição 105 (Tabela 4). Na presença de Mg^{2+} , a adição das três TnIs não mudou significativamente a intensidade da fluorescência (Tabela 4) apesar de observarmos um desvio para azul na λ_{max} . Como no caso das TnCs com triptofanos na posição 105, a presença de aminoácidos 99-156 da TnI não mudou significativamente os espectros dos complexos na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

Estudos de N.M.R., indicaram que um peptídeo inibitório (resíduos 104-115) da TnI interage com resíduos distribuídos em várias posições da C-TnC- Ca^{2+} (o domínio C-terminal da TnC): Phe¹⁰², Ile¹⁰³ e Ile¹⁰⁴ da hélice E, Phe¹¹² do sítio III, Ile¹²¹ da hélice F, Ile¹⁴⁹, Asp¹⁵⁰ e Phe¹⁵¹ do sítio IV, e a própria Phe¹⁵⁴ da hélice H (B.D. Sykes e colaboradores, comunicação pessoal; Cachia et al., 1983; Tsuda et al., 1992). Peptídeos inibitórios também mudam os espectros da F105W-TnC e F105W-Cdom (Pearlstone et al., dados não publicados) e os espectros de F154W-TnC (Chandra et al., 1994). Apesar das constantes de associação entre peptídeos inibitórios e a TnC serem inferiores a 10^6 M^{-1} (Swenson e Fredricksen, 1992; Chandra et al., 1994), a presença da região N-terminal da TnI, que liga o domínio C-terminal da TnC com alta afinidade ($K_{\text{aCa}} \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$, Tabela 5 e Farah et al., 1994), deve aumentar a possibilidade de interação entre a região inibitória e o domínio C-terminal da TnC em concentrações micromolares. Portanto, esperamos observar diferenças dependentes da presença da região inibitória da TnI nos espectros dos complexos contendo TnCs com triptofanos nas posições 105 ou 154 da TnC. A ausência de um efeito pronunciado coloca em dúvida a relevância dos detalhes das interações observadas em concentrações altas do peptídeo inibitório (0.1 - 1 mM) e TnC (0.1 - 1 mM) nos estudos de N.M.R. na

ausência da região N-terminal da TnI (Cachia et al., 1983; Tsuda et al., 1992). As regiões N-terminal (aminoácidos 1-40) e inibitória da TnI são altamente carregadas positivamente e é possível que, na ausência da região N-terminal, peptídeos inibitórios possam estar interagindo com este domínio de uma maneira diferente daquela presente no complexo TnI-TnC intacto.

A adição dos fragmentos de TnI não induziu grandes mudanças relativas nas intensidades de fluorescência da F29W-TnC ou da F29W-Ndom; menos de 22% para todas as TnIs com a F29W-TnC e menos de 10% para todas as TnIs com a F29W-Ndom (Tabela 4). Logo, é difícil distinguir as contribuições das regiões N-terminal, inibitória e C-terminal da TnI para a ligação da região N-terminal da TnC utilizando este parâmetro. Na presença de Ca^{2+} , a adição da TnI₁₋₉₈, da TnI₁₋₁₁₆ ou da TnI₁₋₁₅₆ causou um desvio para o azul do λ_{max} do espectro de emissão da F29W-TnC (Figuras 22-24, Tabelas 1-3), indicando uma transição para um ambiente mais apolar do Trp²⁹ causado pela ligação destas TnIs. Um desvio para o azul semelhante foi observado no complexo entre TnI₁₋₁₅₆ e F29W-Ndom. Desvios para o azul do espectro da F29W-Ndom causados pelas TnI₁₋₉₈ e TnI₁₋₁₁₆ foram muito menores ou não detectáveis. Portanto, em contraste aos complexos com TnCs contendo triptofanos no domínio C-terminal, a fluorescência dos complexos com TnCs contendo triptofanos no domínio N-terminal foram sensíveis à presença dos resíduos 99-156 da TnI. Isto é consistente com a idéia de que a região C-terminal da TnI, em combinação com a região inibitória, liga ao domínio N-terminal da TnC (Farah et al., 1994).

A observação de que a TnI₁₋₉₈ não se liga à F29W-Ndom, mas afeta o espectro da F29W-TnC, indica que a ligação da região N-terminal da TnI ao domínio C-terminal da TnC afeta a conformação do domínio N-terminal da TnC. Mesmo sabendo que a TnI₁₋₉₈ liga F29W-TnC de maneira independente de Ca^{2+} , este efeito é mais evidente na presença de Ca^{2+} (Fig. 22 A e Tabela 4). Ainda não sabemos se esta interação é dependente da ligação do Ca^{2+} nos sítios N-terminais ou C-terminais da TnC. Esta mudança conformacional em F29W-TnC induzida por TnI₁₋₉₈ pode ser explicada de duas formas: 1) Existe um sítio secundário na região N-terminal da TnC para ligação em TnI₁₋₉₈. Esta interação é relativamente fraca e só pode ser detectada na presença do domínio C-terminal da TnC (o sítio principal de ligação da região N-terminal da TnI; Farah et al., 1994). 2) A região N-

terminal da TnI só se liga ao domínio C-terminal da TnC, mas esta ligação induz, através da TnC, uma mudança conformacional no domínio N-terminal da TnC. Grabarek et al. (1986) demonstraram que a ligação de Ca^{2+} aos sítios N-terminais da TnC induz mudanças conformacionais no domínio C-terminal da TnC (detectadas por um marcador fluorescente na Cys⁹⁸). Isto indica que pelo menos na presença de Ca^{2+} , existem contatos entre os dois domínios da TnC. Estes contatos podem ser sensíveis à ligação da região N-terminal da TnI ao domínio C-terminal da TnC. Contatos entre os dois domínios dos outros membros da família "EF-hand" foram observados nas estruturas de calmodulina (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992) e das cadeias leves da miosina (Rayment et al, 1993a; Xie et al., 1994) em complexos com os próprios substratos polipeptídicos.

III) Titulações de fluorescência. Titulamos as TnCs fluorescentes com fragmentos de TnI para determinar as constantes de ligação. Estes estudos revelaram que a TnI₁₋₉₈ e a TnI₁₋₁₁₆ se ligam à TnC inteira ou ao domínio C-terminal de uma maneira mais forte na presença de Ca^{2+} ($K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$) do que na presença de Mg^{2+} ($K_a \sim 10^6 - 10^7, \text{ M}^{-1}$) ou na ausência de metais divalentes ($K_a \sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$). É interessante notar que, na presença de Ca^{2+} , a TnI₁₋₁₅₆ liga-se à TnC inteira e ao domínio C-terminal com constantes de associação uma e duas ordens de magnitude, respectivamente, menores do que os fragmentos da TnI de menor tamanho (Tabela 5). Ngai e Hodges (1991) observaram que um peptídeo correspondente aos aminoácidos 1-40 da TnI pode competir com o peptídeo inibitório (aminoácidos 104-115) ou a TnI inteira (que também contém aminoácidos 1-40) pela ligação à TnC. O mesmo efeito foi observado num ensaio de competição entre a TnI₁₋₉₈ e a wt-TnI (S.M. Ngai e R.S. Hodges, comunicação pessoal). Isto indica que peptídeos provenientes do N-terminal da TnI ligam-se à TnC de uma maneira diferente da observada em fragmentos maiores.

Não observamos ligação entre TnI₁₋₉₈ e F29W-Ndom. As constantes de associação de TnI₁₋₁₁₆ e de TnI₁₋₁₅₆ com F29W-Ndom foram $0,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ respectivamente, semelhantes às do complexo entre TnI₁₀₃₋₁₈₂ e TnC ou F29W-Ndom ($3,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Isto é consistente com as estabilidades destes complexos observadas nos géis de poliacrilamida e confirma a idéia de que a região inibitória e a região C-terminal da TnI contribuem para a ligação no domínio N-terminal da TnC.

IV) *Comparação dos resultados dos estudos de eletroforese e fluorescência.* Em geral, as séries de estabilidades relativas dos complexos obtidos pelos dois métodos foram muito semelhantes. Os dois tipos de experimento indicam que deleções das regiões inibitórias e C-terminais da TnI afetam a interação com o domínio N-terminal da TnC, mas não afetam a interação com o domínio C-terminal da TnC. Na maioria dos casos, os complexos observados em géis contendo 6 M uréia (complexos com TnCs inteiras e com o domínio C-terminal da TnC na presença de Ca^{2+}) correspondem à constantes de associação ($K_a \geq 10^7 \text{ M}^{-1}$) maiores do que aquelas dos complexos observados somente nos géis sem uréia (todos os complexos na presença de Mg^{2+} e o complexo entre TnI_{1-116} e N-TnC na presença de Ca^{2+} tinham $K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$). Exceções a este padrão foram observadas nos casos dos complexos do domínio N-terminal da TnC com TnI_{1-156} e $\text{TnI}_{103-182}$, no caso do complexo entre o domínio C-terminal da TnC e TnI_{1-156} e também no caso do complexo entre TnC inteira e $\text{TnI}_{103-182}$. Estes complexos foram observados em géis contendo 6 M uréia e Ca^{2+} , mas as constantes de associação medidas pela fluorescência foram da ordem de $2-4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Tabela 4), a mesma ordem de magnitude das constantes obtidas para a maioria dos complexos na presença de Mg^{2+} (que não são observadas em géis contendo 6 M uréia). Isto é remanescente do que foi observado em estudos dos complexos entre TnC e TnT por métodos diferentes (cromatografia de afinidade, titulações de fluorescência e eletroforese) (Pearlstone e Smillie, 1978; Ingraham e Swenson, 1984; Cheung et al., 1987; B. Malnic, comunicação pessoal; vide a seção sobre a TnT na *Introdução*). Em adição à possibilidade de que algumas das diferenças observadas entre as estabilidades dos complexos em géis de eletroforese e por fluorescência possam ser atribuídas à diferenças nas constantes cinéticas de associação e dissociação (vide a seção sobre TnT na *Introdução*), o modo de ação da uréia deve ser considerado. Este caótropro provavelmente interfere mais com as interações hidrofóbicas do que com as interações hidrofílicas (Monera et al., 1993; R.S. Hodges, comunicação pessoal). O fato de que todos estes complexos envolvem as regiões inibitória e C-terminal da TnI com o domínio N-terminal da TnC (exceto o complexo entre o domínio C-terminal da TnC e TnI_{1-156}) sugere que a superfície de contato entre estes domínios na presença de Ca^{2+} pode envolver muitas interações hidrofílicas (pontes de hidrogênio, pontes salinas).

Mais um modelo da interação entre a região inibitória da TnI e a TnC

Há muito interesse no modo de interação entre a região inibitória da TnI e a TnC, uma vez que esta interação é provavelmente central na regulação da interação acto-miosina. Como foi discutido acima e também na *Introdução*, existem dados indicando que a região inibitória faz contatos com os dois domínios da TnC. Comparações diretas desta interação com os complexos da calmodulina e alfa-hélices anfifílicas devem ser feitas com cuidado, pois a região inibitória é provavelmente uma alfa-hélice dobrada em volta das duas prolinas centrais (Pro¹⁰⁹ e Pro¹¹⁰, Fig . 7; Campbell e Sykes, 1991). Recentemente, a determinação da estrutura da cabeça da miosina esquelética (Rayment et al., 1993a) e do complexo do domínio regulatório da cabeça da miosina de "scallop" (Xie et al., 1994) sugerem maneiras alternativas de como as proteínas da família "EF-hand" podem ligar substratos. Nestas estruturas, as cadeias leves da miosina estão ligadas à hélice anfifílica comprida do domínio de 20 kDa da cadeia pesada da miosina de uma maneira antiparalela. As sequências dos sítios de ligação na cadeia pesada são longas, mas cada uma contém um "IQ-motif" que também é observado em vários substratos de calmodulina e cadeias leves de miosina (Cheney e Moonseker, 1992; Xie et al., 1994). No complexo do domínio regulatório da cabeça da miosina de "scallop" (Xie et al., 1994), os dois tipos de cadeia leve ligam-se na cadeia pesada de maneiras distintas. A cadeia leve essencial (ELC) liga-se à uma região reta da cadeia pesada, de maneira semelhante ao que foi observado no complexo entre a calmodulina e o peptídeo de quinase da cadeia leve da miosina (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992). Em contraste, a cadeia leve regulatória (RLC) liga-se a uma região da cadeia pesada que é dobrada, formando um ângulo de 60° em volta do resíduo 824-826 no final do "IQ-motif" (Xie et al., 1984). Esta dobra da cadeia pesada é remanescente do modelo da estrutura do peptídeo inibitório da TnI, dobrada em volta de Pro¹⁰⁹ e Pro¹¹⁰, quando está ligada na TnC (Campbell e Sykes, 1991; vide *Introdução* e Figura 7).

Uma análise da sequência da região inibitória permitiu-nos identificar uma região contendo as propriedades de um "IQ-motif" situada no lado N-terminal (resíduos 98-111) da dobra observada no peptídeo inibitório.

	12	34	5	6
consenso "IQ-motif" (Xie et al., 1994):	I	Q	x	x
	R	G	x	x
	R	x	x	Φ
Cadeia pesada 785-798 (sítio de ELC):	F	Q	A	H
	I	R	G	Y
	L	I	R	K
	A	Y		
Cadeia pesada 811-824 (sítio de RLC):	I	Q	R	N
	I	R	K	W
	L	V	L	R
	N	W		
TnI de galinha 96-117:	S	Q	K	L
	F	D	L	R
	G	K	F	K
	R	P	P	L
	R	R	V	R
	M	S		

(Φ representa resíduos hidrofóbicos e x representa qualquer aminoácido (Xie et al., 1994). Os aminoácidos sublinhados são altamente conservados em TnI e os aminoácidos em negrito são hidrofóbicos em todas as TnIs de vertebrados.)

Este alinhamento tem quatro resíduos altamente conservados (Arg¹⁰³, Gly¹⁰⁴, Arg¹⁰⁸ e Leu¹¹¹) que coincidem com as últimas quatro das seis posições de consenso do "IQ-motif". Um problema deste alinhamento é que a Pro¹⁰⁹, onde começa a dobra no peptídeo inibitório, é posicionada dois resíduos antes do começo do dobramento no sítio da cadeia leve regulatória (Trp⁸²⁴) (Xie et al., 1994). Se alinharmos a primeira e conservada prolina (109) da TnI com Trp⁸²⁴ da cadeia pesada, perderemos as outras posições conservadas da TnI que coincidem com o consenso.

Grand et al. (1982) observaram que a TnC perturba os sinais de NMR de resíduos localizados predominantemente na metade N-terminal do fragmento CN4 da TnI (aminoácidos 96-116), enquanto que a actina perturba os sinais de aminoácidos localizados predominantemente na metade C-terminal deste fragmento. Entretanto, é importante notar que mutações em qualquer aminoácido do peptídeo inibitório afetam, em graus diferentes, sua ligação à TnC e à actina (Van Eyk e Hodges, 1987). Portanto, provavelmente todo o peptídeo inibitório faz contato com a TnC.

As duas regiões que flanqueiam os "IQ-motifs" da cadeia pesada da miosina estão intimamente envolvidas na ligação com as cadeias leves (Xie et al., 1994). Nesta estrutura, o domínio C-terminal da RLC está ligado ao "IQ-motif" no lado N-terminal da dobra da cadeia pesada e o domínio N-terminal da RLC está ligado ao lado C-terminal da dobra da cadeia pesada. Por analogia, a metade N-terminal da região inibitória da TnI estaria ligada ao domínio C-terminal da TnC, enquanto que a metade C-terminal da região inibitória estaria ligada ao domínio N-terminal da TnC (Fig. 30).

Interações entre a TnI e a TnT e a organização do complexo terciário da troponina

Reconstituição dos complexos terciários

Quando reconstituímos complexos de troponina usando os fragmentos recombinantes de TnI, de wt-TnC e de wt-TnT, somente observamos complexos terciários quando utilizamos fragmentos de TnI contendo os aminoácidos 1 a 98. A mistura de TnI₁₀₃₋₁₈₂ com TnC e TnT gerou o complexo binário TnI₁₀₃₋₁₈₂-TnC, indicando que a presença da metade N-terminal da TnI é importante para permitir a incorporação da TnT ao complexo terciário *in vitro*. Estes resultados são consistentes com a localização da interação TnI-TnT no domínio globular C-terminal da TnT (Pearlstone e Smillie, 1985) e nos resíduos 40-98 na metade N-terminal da TnI (Hitchcock DeGregori, 1982; Chong e Hodges, 1983). Estes experimentos foram feitos somente na presença de Ca²⁺. Na ausência de Ca²⁺, esperamos um resultado diferente uma vez que a interação entre TnI₁₀₃₋₁₈₂ e TnC é dependente de Ca²⁺ e não foi observada na presença de Mg²⁺ (Farah et al., 1994). Como a TnT é necessária para a regulação da atividade ATPásica da actomiosina pelo complexos reconstituídos com TnI₁₀₃₋₁₈₂, isto sugere que o complexo terciário realmente é formado na presença de actina e tropomiosina (Figura 4 de Farah et al., 1994).

Na presença de Ca²⁺ ou Mg²⁺, a interação entre TnC e TnT é relativamente forte ($\sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; Ingraham e Swenson, 1984; Cheung et al, 1987). Entretanto, como explicar porque, numa mistura de TnI₁₀₃₋₁₈₂, TnC e TnT na presença de Ca²⁺, a TnT não foi incorporada ao complexo terciário através de sua interação com a TnC, apesar da interação com a TnI estar diminuída. Uma possível explicação para este fenômeno é que a energia livre acoplada ("free-energy coupling") de formação do complexo terciário a partir dos três complexos binários é positiva e grande e que o aumento da estabilidade no complexo troponina causado pela presença de Ca²⁺ é devido somente a um fortalecimento na interação TnI-TnC (Cheung et al., 1987). Isto sugere que as interações TnT-TnC e TnT-TnI estão diminuídas no complexo terciário, quando comparadas às interações observadas nos complexos binários. Se no caso de TnI₁₀₃₋₁₈₂ a interação entre TnI e TnT estiver diminuída graças à ausência da região N-terminal de TnI (Hitchcock-DeGregori, 1982; Chong e Hodges, 1983), a interação TnT-TnC pode não ser suficiente para incorporar a TnT no

complexo.

Leszyk et al. (1988a) observaram que a Cys⁹⁸ da TnC pode ser "cross-linked" com TnI ou TnT no complexo troponina, sugerindo que a TnI e a TnT poderiam estar competindo pelo mesmo sítio de ligação na TnC. Além disso, TnI e TnC podem estar competindo por sítios no domínio C-terminal da TnT. Este tipo de competição poderia explicar a energia livre acoplada positiva e pode ser importante para "desestabilizar" interações observadas nos complexos binários, facilitando rearranjos estruturais no complexo terciário quando o Ca²⁺ se-liga à TnC (Cheung et al., 1987).

Modo de interação entre TnI e TnT. Uma possível interação "coiled-coil"?

Foi mostrado que a TnI pode interagir com fragmentos derivados da região C-terminal da TnT (Tanokura e Ohtsuki, 1982; Pearlstone e Smillie, 1983). Vários estudos de ligação entre a TnI e peptídeos menores da TnT (Tanokura et al., 1983; Pearlstone e Smillie, 1983, 1985; Tanokura e Ohtsuki, 1982, 1984) e de proteção química (Hitchcock et al., 1981) sugerem que a TnI possa estar se ligando a vários sítios na metade C-terminal da TnT. Por exemplo, Pearlstone e Smillie (1985) observaram que peptídios de TnT CB4 (resíduos 176-230), CB5 (152-175) e CB6 (239-259) se ligam à TnI. Experimentos utilizando mutantes de TnT e TnI deverão permitir a localização das regiões de interação entre TnI e TnT.

A análise da sequência entre os aminoácidos 53 e 106 da TnI revela uma repetição heptapeptídica (Pearlstone e Smillie, 1985) com resíduos hidrofóbicos em 15 das 17 posições **a** e **d** (sublinhadas):

*
LPGSMQELQELCKKLHAKIDSVDEERYDTEVKLQKTNKELEDLSQKLFDLRGKF
defgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefgabcdefga

Sequência dos aminoácidos 53-106 na região N-terminal da TnI, provavelmente envolvida na interação com a TnT. A posição da treonina marcada (*) é um resíduo hidrofóbico em todas as outras TnIs.

Uma região localizada na metade N-terminal desta repetição é mais conservada (linha acima da sequência dos aminoácidos 60 a 86) do que o resto da cadeia polipeptídica, mas a natureza química (hidrofóbica, polar, etc.) dos resíduos em todas as 17 posições **a** e **d** são

É interessante notar que o domínio globular C-terminal da TnT também tem duas repetições heptapeptídicas fracas entre os resíduos 155 e 205 (resíduos hidrofóbicos sublinhados ou em negrito, dependendo de onde começa a repetição; Farah e Reinach, não publicado):

Também existe uma forte repetição heptapeptídica entre os resíduos 205 e 255 da TnT (Pearlstone e Smillie, 1981, 1985) que está em fase com a repetição sublinhada acima:

Uma hipótese, inicialmente sugerida por Pearlstone e Smillie (1985), é que o motivo estrutural da interação TnI-TnT é uma "coiled-coil" entre os aminoácidos 53 e 103 da TnI e a repetição heptapeptídica forte no domínio C-terminal da TnT (Figura 30). Por outro lado, a repetição heptapeptídica da TnT pode estar interagindo com uma parte da "coiled-coil" da tropomiosina de uma maneira tripla-fita (Squire, 1981). A existência de duas repetições heptapeptídicas em TnT, uma fraca e fora de fase, sugere que a TnT: A) Poderia se ligar à TnI utilizando uma repetição e se ligar à tropomiosina utilizando a outra ou B) Poderia ter duas maneiras, uma forte e uma fraca, de interagir através de uma estrutura "coiled-coil" com a TnI.

Nas duas hipóteses acima, é fácil imaginar como as interações podem ser moduladas pela ligação de Ca^{2+} ao complexo terciário: A sequência da TnI que se liga à TnT (aminoácidos 40-98; Hitchcock-DeGregori, 1982) está entre as duas sequências que se ligam à TnC (aminoácidos 1-40 e 96-116, Figs 5 e 30; Syska et al., 1976), ambas interações fortalecidas pelo Ca^{2+} . Isto sugere aproximações íntimas e extensas das regiões das três subunidades no complexo terciário (Fig. 30). Mudanças induzidas pelo Ca^{2+} na interação TnI-TnC podem ser transmitidas à TnT, em parte pelas mudanças na região de contato entre a TnI e a TnT. Isto pode explicar a necessidade da TnT para regular a atividade ATPásica da acto-miosina *in vitro* em razões fisiológicas da actina, tropomiosina e troponina. Isto também pode explicar porque todos os complexos terciários reconstituídos com fragmentos da TnI contendo os aminoácidos 1 a 98 aumentam a atividade ATPásica da acto-miosina de 25 a 50% acima do que foi observado na ausência da troponina (Fig. 4 de Farah et al., 1994).

Propriedades regulatórias dos fragmentos de TnI.

Como foi demonstrado por Syska et al. (1976) e confirmado neste trabalho, as sequências centrais da TnI (aminoácidos 103-116) são essenciais para a atividade inibitória da TnI. Todos os fragmentos que não contêm esta região não apresentam atividade inibitória e todos os fragmentos possuindo esta região exibem atividade inibitória. Os fragmentos TnI₁₋₁₅₆ e TnI₁₀₃₋₁₈₂ apresentaram atividade inibitória idêntica à wt-TnI, enquanto a TnI₁₋₁₁₆ tem atividade inibitória sub-máxima, indicando que parte ou toda a sequência entre os resíduos 117 e 156 da TnI é necessária para a inibição máxima. Isto explica porque os peptídeos sintéticos ou proteolíticos, correspondendo somente à região inibitória, possuem atividade inibitória sub-máxima (Syska et al., 1976; Talbot e Hodges, 1979, 1981; Ngai e Hodges, 1992).

Tanto a região inibitória, quanto a região C-terminal da TnI, são necessárias para a regulação da atividade ATPásica de maneira dependente de Ca^{2+} . Isto foi concluído a partir de observações feitas com os fragmentos da TnI em complexos binários com TnC e em complexos terciários com TnC e TnT. Wt-TnI e TnI₁₀₃₋₁₈₂, que contêm estas duas regiões, conseguiram manter a inibição na presença de TnC e na ausência de Ca^{2+} . A região inibitória, sem a região C-terminal da TnI (TnI₁₋₁₁₆), não manteve a inibição na ausência de Ca^{2+} , na presença de TnC. Aparentemente, toda a região C-terminal é necessária para a regulação completa porque a TnI₁₋₁₅₆, que tem a região inibitória e a primeira metade da região C-terminal não manteve a inibição na ausência de Ca^{2+} em complexo binário e, quando em complexo terciário com a TnC e a TnT, inibiu bem menos do que o complexo troponina reconstituído com wt-TnI. Logo, podemos concluir que os aminoácidos 103-182 da TnI constituem a região regulatória da proteína.

Peptídeos inibitórios e TnI₁₀₃₋₁₈₂ liga actina e actina-tropomiosina (Talbot e Hodges, 1981; Farah et al., 1994). Estudos de transferência de energia de fluorescência demonstraram que num filamento fino reconstituído o Trp¹⁵⁸ da região C-terminal da TnI está mais próximo da actina na ausência do que na presença de Ca^{2+} (Tao et al., 1990). Nossa demonstração de que a região C-terminal de TnI é necessária para a inibição máxima também sugere que

esta região poderia interagir com actina-tropomiosina na ausência de Ca^{2+} . A análise da sequência da TnI entre os aminoácidos Arg¹³⁷ e Lys¹⁴⁴ possui um grau de homologia com a sequência Arg¹⁰⁸-Arg¹¹⁵ na região inibitória (C.H.I. Ramos, C.S. Farah e F.C. Reinach, não publicado):

	* * * * * *
TnI de galinha 96-117:	SQK L <u>FDLRGKFKRPPLRRVRMS</u>
	: : : :
TnI de galinha 125-146:	<u>LLGSKHKVNMDLRANLKQVKKE</u>

Os aminoácidos sublinhados são altamente conservados e os aminoácidos em negrito são hidrofóbicos em todas as TnIs de vertebrados. Sítios de homologia são marcados por (:). Em alguns casos R é substituído pelo K (.). Resíduos da região inibitória nas posições do consenso de "IQ-motif" estão marcados (*).

Esta homologia envolve os resíduos na metade C-terminal do peptídeo inibitório, exatamente a região identificada como envolvida na ligação com a actina (Grand et al., 1982; Van Eyk e Hodges, 1987). Portanto, a sequência Arg¹³⁷-Lys¹⁴⁴ pode representar um sítio secundário de ligação à actina-tropomiosina e pode explicar a nossa observação de que a sequência entre os aminoácidos 117 e 156 é necessária para a inibição completa. Isto sugere que, na ausência de Ca^{2+} , estas regiões da TnI possam estar se ligando ao filamento fino de maneiras semelhantes, possivelmente definidas pela repetição estrutural ao longo da estrutura "coiled-coil" da tropomiosina.

Estas duas regiões da TnI também possuem homologia com os dois domínios (N e C) da subunidade γ da fosforilase quinase que se ligam à calmodulina (Dasgupta et al., 1989; Paudel e Carlson, 1990).

TnI 96-117	TnI 125-146
<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> ** ** * * </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 5px;"> # ## ## </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> SQK<u>LF</u>DLRGK<u>F</u>KR<u>P</u>P<u>LRRV</u>RMS ----- <u>LL</u>GSKHKVNMDLR<u>AN</u>L<u>KQ</u>V<u>K</u>KE </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> . : : : : : . . </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> EVRHFSPRGKFKVICLTVLASV ----- RPLRRLIDAYAFRIYGHVVKKG </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> γ: domínio N domínio C </div>	

Os aminoácidos sublinhados são altamente conservados; os aminoácidos em negrito são hidrofóbicos em todos os TnIs de vertebrados. Sítios de homologia entre as sequências da TnI (acima) e os domínios (N e C) da subunidade γ da fosforilase kinase que ligam calmodulina (abaixo) estão marcados (:). Substituições conservativas estão marcadas por pontos (.). Resíduos da região inibitória nas posições do consenso de "IQ-motif" (*) e resíduos de homologia entre as sequências 108-115 e 137-144 da TnI (#) são marcadas.

Isto pode explicar a nossa observação de que aminoácidos 117-156, em combinação com a região inibitória, são necessários para observar um complexo com o domínio N-terminal da TnC em 6 M uréia (Farah et al., 1994). Consequentemente, na presença de Ca^{2+} , as duas regiões da TnI podem estar fazendo contatos com as regiões equivalentes da TnC. Por exemplo, em duas superfícies estruturalmente semelhantes nos dois domínios da TnC ou duas superfícies equivalentes nos dois "EF-hands" do mesmo domínio da TnC.

Conclusão

Estas observações permitiram compreender a lógica do arranjo antiparalelo do complexo TnI-TnC (Figura 30; Figura 8 de Farah et al., 1994). Ambas as proteínas (TnI e TnC) podem ser divididas em dois domínios: um regulatório e um estrutural. Os domínios estruturais de ambas as proteínas - o domínio C-terminal da TnC e a região N-terminal de TnI - interagem na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Esta interação é importante para manter as duas proteínas ligadas e orientadas, em baixa concentração de Ca^{2+} , no músculo relaxado. Os domínios regulatórios - o domínio N-terminal da TnC e as regiões inibitória e C-terminal da TnI - interagem de maneira dependente de Ca^{2+} . Esta interação é importante para desligar a região regulatória da TnI da actina-tropomiosina e liberar a interação acto-miosina.

A Figura 31 ilustra como este tipo de complexo TnI-TnC pode estar regulando a interação acto-miosina no músculo esquelético:

No músculo relaxado, sob baixa concentração de Ca^{2+} , os sítios regulatórios no domínio N-terminal da TnC estão vazios e os sítios estruturais no domínio C-terminal estão ocupados pelo Mg^{2+} . A região N-terminal da TnI está ligada com a região C-terminal da TnC e com a região globular C-terminal da TnT. As regiões inibitória e C-terminal da TnI estão interagindo com a actina e a tropomiosina de forma a inibir a atividade ATPásica da acto-miosina (Fig. 31A).

Quando o músculo é estimulado, a ligação de Ca^{2+} nos sítios N-terminais da TnC resulta numa mudança conformacional neste domínio, que agora apresenta um sítio de alta afinidade para as regiões inibitória e C-terminal da TnI. Quando o Ca^{2+} substitui o Mg^{2+} , o domínio C-terminal da TnC também aumenta sua afinidade pela região inibitória da TnI. Estas regiões da TnI desligam-se da actina-tropomiosina e ligam-se à TnC. A interação entre a região inibitória da TnI e a TnC pode ser semelhante à que foi observada na estrutura do complexo entre a cadeia pesada e a cadeia leve regulatória da miosina (Rayment et al., 1993b; Xie et al., 1994; Campbell e Sykes, 1989, 1991), como discutido acima. Neste esquema, a hélice central da TnC está dobrada, deixando os dois domínios da TnC

aproximarem-se para interagir com a região inibitória da TnI (Fig. 31B). O desligamento da TnI da actina-tropomiosina e a reorganização no complexo troponina induzida pelo Ca^{2+} pode iniciar mudanças na estrutura do filamento fino (por exemplo, na posição da tropomiosina; Fig. 31 C) que libera a interação cíclica entre a actina e a miosina.

FIGURAS 30-31

Figura 30: Modelo da organização do complexo troponina. As regiões inibitória (I) e C-terminal (C) da TnI interagem com os dois domínios da TnC de uma maneira dependente de Ca^{2+} . Ambas regiões da TnI possuem sequências com homologia aos substratos de outras proteínas da família "EF-hand". A estrutura do peptídeo inibitório sugere que a região inibitória da TnI é uma hélice anfifílica dobrada ao meio em torno das duas prolínas (P). A metade N-terminal desta região possui uma homologia com o "IQ-motif" observado nos sítios das cadeias leves, na cadeia pesada da miosina, e em alguns substratos da calmodulina. O domínio C-terminal da cadeia leve regulatória da miosina muscular liga-se a um "IQ-motif" adjacente ao lado N-terminal de um dobramento da cadeia pesada da miosina e o domínio N-terminal da cadeia leve liga-se ao lado C-terminal deste dobramento (Xie et al., 1994). Acreditamos que esta interação com a miosina pode ser um modelo para a interação entre a região inibitória da TnI e a TnC. A metade C-terminal da região inibitória e uma sequência da região C-terminal da TnI apresentam homologia entre si e podem ligar sítios repetitivos na actina-tropomiosina. A região inibitória e os aminoácidos 137-144 da TnI também possuem homologia com os dois sítios de ligação da calmodulina na fosforilase quinase. Portanto, acreditamos que a interação calmodulina-fosforilase quinase também pode ser um modelo de como as regiões inibitória e C-terminal da TnI se ligam à TnC. Aminoácidos 1-40 da TnI estão associados com o domínio C-terminal da TnC de uma maneira independente de Ca^{2+} , mas esta interação é mais forte na presença de Ca^{2+} do que de Mg^{2+} . Entre esta região e a região inibitória, existe um sítio de ligação para o domínio C-terminal da TnT. Repetições heptapeptídicas nestas regiões da TnI e TnT podem estar interagindo de uma maneira "coiled-coil". Mudanças induzidas pelo Ca^{2+} nas interações entre TnI e TnC podem ser, em parte, transmitidas à TnT através de mudanças neste "coiled-coil".

Figura 30: Modelo da organização do complexo troponina

Figura 31: Modelo das mudanças estruturais induzidas pelo Ca^{2+} no complexo troponina ligado ao filamento de actina. **A)** No estado relaxado, os sítios Ca^{2+} -específicos do domínio N-terminal da TnC estão vazios e os sítios $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ no domínio C-terminal da TnC estão ocupados por Mg^{2+} . A região inibitória/C-terminal da TnI esta ligada à actina-tropomiosina e inibe a interação ATPásica entre actina e miosina. **B)** Quando o músculo é estimulado, o Ca^{2+} liga nos sítios Ca^{2+} -específicos da TnC. Isto aumenta a afinidade entre o domínio N-terminal da TnC e a região inibitória/C-terminal da TnC o que faz com que a TnI se desligue da actina/tropomiosina. **C)** O desligamento da TnI permite que a tropomiosina assuma uma nova posição, mais próxima da fenda do filamento de actina. Este movimento da tropomiosina pode ser induzido por uma reorganização da estrutura de troponina na presença de Ca^{2+} que muda a interação entre a TnT e a tropomiosina ou pela ligação de uma número crítico de cabeças da miosina na unidade regulatória do filamento fino. A nova conformação do filamento fino permite a interação ATPásica entre actina e miosina.

Figura 31: Modelo das mudanças estruturais induzidas pelo Ca^{2+} no filamento fino

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelstein, R.S. e Eisenberg, E. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 921-956
- Babu, Y.S., Sack, J.S., Greenhough, T.J., Bugg, C.E., Means, A.R., e Cook, W.J. (1985) *Nature* **315**, 37-40
- Baldwin Jr., A.S., Kittler, E.L.W., e Emerson Jr, C.P. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 8080-8084
- Bartegi, A., Ferraz, C., Fattoum A., Sri Widada, J., Heitz, F., Kassab, R, e Liautard, J.-P. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 845-852
- Beall, C.J. e Fyrberg, E. (1991) *J. Cell. Biol.* **114**, 941-951
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. (1991) Protein Methods (Wiley-Liss, Inc, New York, N.Y.)
- Brenner, B. (1990) "Muscle Mechanics and Biochemical Kinetics" in Molecular Mechanisms in Muscular Contraction Ed. John M. Squire (C.R.C. Press Inc. Boca Raton, Florida) pp. 77-149.
- Butters, C.A., Willadsen, K.A. e Tobacman, L.S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15565-15570
- Cachia, P.J., Sykes, B.D., e Hodges, R.S. (1983) *Biochemistry* **22**, 4145-4152
- Cachia, P.J., Van Eyk, J.E., Ingraham, R.H., McCubbin, W.D., Kay, C.M., e Hodges, R.S. (1986) *Biochemistry* **25**, 3553-3562
- Campbell, A.P. e Sykes, B.D. (1988) *Adv. Exptal. Med. Biol.* **255**, 195-204
- Campbell, A.P. e Sykes, B.D. (1991) *J. Mol. Biol.* **222**, 405-421
- Carter, P. (1987) *Meth. Enzymol.* **154**, 382-403
- Chalovich, J.M. (1993) *Pharmac. Ther.* **55**, 95-148
- Chalovich, J.M. e Eisenberg, E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2432-2437
- Chandra, M., McCubbin, W.D., Oikawa, K., Kay, C.M., e Smillie, L.B. (1994) *J. Biol.Chem.*, submitted.
- Cheney, R.J. e Moonseker, M.S. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 27-35
- Cheung, H.C., Wang, C.-K., e Malik, N.A. (1987) *Biochemistry* **26**, 5904-5907
- Cho, Y.-J., Lui, J., e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 538-545

- Chong e Hodges, R.S. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2549-2555
- Cohen, C., Caspar, D.L.D., Johnson, J.P., Nauss, K., Margossian, S.S., e Parry, D.A., (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 287-297
- Côté, G.P. e Smillie, L.B. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11999-12004
- Cox, J.A., Comte, M e Stein, E.A. (1981) *Biochem. J.* **195**, 205-211
- Cummins, P. e Perry, S.V. (1972) *Biochem. J.* **128**, 106
- Cummins, P. e Perry, S.V. (1973) *Biochem. J.* **133**, 765-777
- Cummins, P. e Perry, S.V. (1974) *Biochem. J.* **141**, 43-49
- Dalgarno, D.C., Grand, R.J.A., Levine, B.A., Moir, A.J.G., Scott, G.M.M. e Perry, S.V. (1982) *FEBS Lett.* **150**, 54-58
- Dasgupta, M., Honeycott, T., e Blumenthal, D.K. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17156-17163.
- Dobrovol'sky, A.B., Gusev, N.B., e Friedrich, P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **789**, 144-151
- Eaton, B.L., Kominz, D.R. e Eisenberg, E. (1974) *Biochemistry* **14**, 2718-2725
- Ebashi, S. (1963) *Nature* **200**, 1010
- Ebashi, S. e Kodama, A. (1966) *J. Biochem.* **59**, 425-426
- Ebashi, S., Wakabayashi, T., e Ebashi, F. (1971) *J. Biochem.* **69**, 441-445
- El-Saleh, S.C., Thieret, R., Johnson, P., e Potter, J.D. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11014-11021
- Farah, C.S. Miyamoto, C.A., Ramos, C.H.I., da Silva, A.C.R., Quaggio, R.B., Fujimori, K., Smillie, L.B., e Reinach, F.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5230-5240
- Flicker, P.F., Phillips, G.N. e Cohen, C. (1982) *J. Mol. Biol.* **162**, 495
- Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moulton, J. e Reinach, F.C. (1990) *Nature* **345**, 182-184
- Geeves, M. (1991) *Biochem. J.* **274**, 1-14
- Grabarek, Z., Drabikowski, W., Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., e Gergely, J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 13121-13127
- Grabarek, Z., Leavis, P.C., e Gergely, J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 608-613

- Grabarek, Z., Tan, R.Y., Wang, J., Tao, T., e Gergely, J. (1990) *Nature* **345**, 132-135
- Grabarek, Z., Tao, T. e Gergely, J. (1992) *J. Muscle Res. Motility* **13**, 383-393
- Grand, R.J.A., Levine, B.A., e Perry, S.V. (1982) *Biochem J.* **203**, 61-68
- Greaser, M. e Gergely, J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 4226-4233
- Greaser, M. e Gergely, J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2125-2133
- Hanson, J. e Lowy, J. (1963) *J. Mol. Biol.* **6**, 46-60
- Hartree, E.F. (1972) *Anal. Biochem.* **48**, 422-427
- Haselgrove, J.C. (1972) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **37**, 341-352
- Head, J.F. e Perry, S.V. (1974) *Biochem. J.* **137**, 145-154
- Heald, R.W. e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5254-5259
- Heeley, D.H., Golosinska, K. e Smillie, L.B. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9971-78
- Heidorn, D.B. e Trewella, J. (1988) *Biochemistry* **27**, 909-915
- Heinomen, J.K. e Lahti, R.J. (1981) *Anal. Biochem.* **113**, 653-659
- Herzberg, O. e James, M.N.G. (1985) *Nature* **313**, 653-659
- Herzberg, O. e James, M.N.G. (1988) *J. Mol. Biol.* **203**, 761-779
- Herzberg, O., Moulton, J., e James, M.N.G. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 2638-44
- Hill, L.E., Mehegan, J.P., Butters, C.A., e Tobacman, L.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16106-16113
- Hitchcock, S.E. (1975) *Eur. J. Biochem.* **52**, 255-263
- Hitchcock, S.E., Zimmerman, C.J. e Smalley, C. (1981) *J. Mol. Biol.* **147**, 125-151
- Hitchcock-DeGregori, S.E. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7372-7380
- Hitchcock-DeGregori, S.E. e Heald, R.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9730-9735
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., e Kabsch, W. (1990) *Nature* **347**, 44-49
- Huxley, A.F. (1957) *Prog. Biophys.* **7**, 255-313
- Huxley, H.E. (1969) *J. Gen. Physiol.* **50**, 71-83

- Huxley, H.E. (1972) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **37**, 361-376
- Ikura, M., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Zhu, G., Klee, C.B., e Bax, A. (1992) *Science* **256**, 632-638
- Ingraham, R.H. e Swenson, C.A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 9544-9548
- Johnson, J.D. Collins, J.H., e Potter, J.D. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 6451-6458
- Johnson, J.D., Charlton, S.C., e Potter, J.D. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3497-3502
- Johnson, P., e Blazyk, J.M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 1013-1018
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990) *Nature* **347**, 37-44
- Kabsch, W. e Vandekerckhove, J. (1992) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **21**, 49-76
- Katayama, E. e Nozaki, S. (1982) *J. Biochem.* **91**, 1449-1452
- Kendrick-Jones, J. e Scholey, J.M. (1981) *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2**, 347-372
- Kluwe et al., 1993 *FEBS Lett.* **323**, 83-88
- Kobayashi, T., Takagi, T., Konishi, K., e Cox, J.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1551-1557
- Kobayashi, T., Tao, T., Grabarek, Z., Gergely, J., e Collins, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13746-13751
- Koppe, R.I., Hallauer, P.L., Karpati, G., e Hastings, K.E.M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14327-14333
- Kretsinger, R.H. (1992) *Science* **258**, 50-51
- Kunkel, T.A. (1987) *Meth. Enzymol.* **154**, 367-382
- Lacowicz, J.R. (1983) em "Principles of Fluorescence Spectroscopy" (Plenum Press, New York), capítulo 11.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Lan, J., Albaugh, S., e Steiner, R.F. (1989) *Biochemistry* **28**, 7380-7385
- Leavis, P.C., Rosenfeld, S.S., Gergely, J., Grabarek, Z. e Drabikowski, W. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 5452-5459
- Leavis, P.C. e Gergeley, J. (1984) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **16**, 235-305

- Lehman, W., Craig, R., e Vilbert, P. (1994) *Nature* **368**, 65-67
- Leszyk, J., Collins, J.H., Leavis, P.C., e Tao, T. (1987) *Biochemistry* **26**, 7042-7047
- Leszyk, J., Collins, J.H., Leavis, P.C., e Tao, T. (1988a) *Biochemistry* **27**, 6983-6987
- Leszyk, J., Dumaswala, R., Potter, J.D., e Collins, J.H. (1988b) *Biochemistry* **27**, 2821-2827
- Leszyk, J., Grabarek, Z., Gergely, J., e Collins, J.H. (1990) *Biochemistry* **29**, 299-304
- Li, M.X., Chandra, M., Pearlstone, J.R., Racher, K.I., Trigo-Gonzalez, G., Borgford, T., Kay, C.M., e Smillie, L.B. (1994) *Biochemistry* **33**, 917-925
- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G., e Baker, H. (1969) *J. Mol. Biol.* **42**, 1-29
- Lowey, S., Waller, G.S., e Trybus, K.M. (1993) *Nature* **365**, 454-456
- Lymm, R.W. e Taylor, E.W. (1971) *Biochemistry* **10**, 4617-23
- Mak, A.S. e Smillie, L.B. (1981) *J. Mol. Biol.* **149**, 541-550
- Mak, A.S., Smillie, L.B., e Stewart, G.R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3647-3655
- Mak, A.S., Golosinska, K., e Smillie, L.B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14330-14334
- Malnic, B. e Reinach, F.C. (1994) *Eur. J. Biochem.*, em press.
- Margossian, S.S. e Lowey, S. (1982) *Methods Enzymol.* **85**, 55-71
- Marsden, B.J., Shaw, G.S., e Sykes, B.D. (1990) *Biochem. Cell Biol.* **68**, 587-686
- McLaclan e Stewart, 1975, *J. Mol. Biol.* **98**, 23-304
- Meador, W.E., Means, A.R. e Quijcho, F.A. (1992) *Science* **257**, 1251-1255
- Monera, O.D., Zhou, N.E., Kay, C.M., e Hodges, R.S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 19218-19227
- Moore, P.B., Huxley, H.E., e DeRosier, D.J. (1970) *J. Mol. Biol.* **50**, 293-295
- Mornet, D., Bertrand, R., Pantel, P., Adernard, E., e Kassab, R. (1981) *Biochemistry* **20**, 2110
- Needham, D.M. (1971) Machina Carnis: The Biochemistry of Muscular Contraction in its Historical Development (Cambridge University Press, London)
- Negele, J.C., Dotson, D.G., Liu, W., Sweeney, H.L., e Putkey, J.A. (1992) *J. Biol. Chem*

267, 825-831

Ngai, S.-M. e Hodges, R.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15715-15720

Nozaki, S., Kobayashi, K., Katayama, E., e Miramatsu, I. (1980) *Chem. Lett.* **345**-348

Ohtsuki, I. (1979) *J. Biochem.* **86**, 491-497

Ohtsuki, I., Maruyama, K., e Ebashi, S. (1986) *Adv. Prot. Chem.* **38**, 1-67

Pan, B.-S. e Potter, J.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 23052-23056

Pan, B.-S., Gordon, A.M., e Potter, J.D. (1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 12432-12438

Pardee, J.D. e Spudich, J.A. (1982) *Meth. Enzymol.* **85**, 164-182

Parry, D.A.D. e Squire, J.M. (1973) *J. Mol. Biol.* **75**, 33-55

Paudel, H.K. e Carlson, G.M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7285-7289

Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1978) *Can. J. Biochem.* **56**, 521-527

Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1981) *FEBS Lett.* **145**, 147-149

Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10587-10592

Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 2534-2542

Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1985) *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **63**, 212-218

Pearlstone, J.R., Borgford, T., Chandra, M., Oikawa, K., Kay, C.M., Herzberg, O., Moul, J., Herklotz, A., Reinach, F.C., e Smillie, L.B. (1992) *Biochemistry* **31**, 6545-6553

Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F., e Wilson, F.J. (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 251-262

Phillips Jr., G.N., Lattman, E.E., Cummins, P., Lee, K.Y., e Cohen, C. (1979) *Nature* **278**, 413-417

Potter, J.D. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 436-441

Potter, J.D. (1982) *Meth. Enzymol.* **85**, 241-264

Potter, J.D. e Gergely, J. (1974) *Biochemistry* **13**, 2697-2703

Potter, J.D. e Gergeley, J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 4628-4633

Quaggio, R. B. (1991) Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

- Quaggio, R. B., Ferro, J.A., Monteiro, P.B., e Reinach, F.C. (1993) *Prot. Sci.* **2**, 1053-1056
- Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G., e Holden, H.M. (1993a) *Science* **261**, 50-58.
- Rayment, I., Holden, H., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., e Milligan, R.A. (1993b) *Science* **261**, 58-65.
- Reinach, F.C. e Karlsson, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2371-2376
- Reinach, F.C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T., e Fischman, D.A. (1982) *J. Cell. Biol.* **95**, 78-84
- Robertson, S.P., Johnson, J.D., e Potter, J.D. (1981) *Biophys. J.* **34**, 559-569
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laborator Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)
- Sanger, F., Nicklen, S. e Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **74**, 5463-5467
- Sheng, Z., Strauss, W.L., Francois, J-M., e Potter, J.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21554-21560
- Sheng, Z., Pan, B.-S., Miller, T.E., e Potter, J.D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25407-25413
- Silva, A.C.R. e Reinach, F.C. (1991) *TIBS* **16**:53-57
- Silva, A.C.R., Araujo, A.H.B., Herzberg, O., Moulton, J. Sorenson, M., e Reinach, F.C. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 599-604
- Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Sorenson, M. e Reinach, F.C. (1994) *submitted*
- Sivaramakrishnan, M. e Burke, M. (1982) *J. Biol Chem.* **257**, 1102-1105
- Smillie, L.B. (1979) *Trends Biochem. Sci.* **4**, 151-155
- Smillie, L.B. (1982) *Meth. Enzymol.* **85**, 234-241
- Smillie, L.B., Golosinska, K., e Reinach, F.C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18816-18820
- Squire, J.M. (1981) em "The Structural Basis of Muscular Contraction" (Plenum Press, New York).
- Stryer, L. (1988) em "Biochemistry, Third Edition" (W.H. Freeman and Company, New York).
- Strynadka, N.C.J. e James M.N.G. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 951-998

- Strynadka, N.C.J. e James M.N.G. (1990) *Proteins*. **7**, 234-248
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., e Dunn, J. (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89
- Sutoh, K. (1982) *Biochemistry* **21**, 4800-4804
- Swenson, C.A. e Fredricksen, R.S. (1992) *Biochemistry* **31**, 3420-3429
- Syska, H., Wilkinson, J.M., Grand, R.J.A., e Perry, S.V. (1976) *Biochem. J.* **153**, 375-387
- Szabo, A.G. (1989) em "The Enzyme Catalysis Process" Ed.: A. Cooper, J.L. Houben, e L.C. Chien (Plenum Press, New York), pp. 123-139
- Szent-Gyorgyi, A. (1942) *Stud. Inst. Med. Chem. Szeged.* **1**, 17
- Szilagyi, L., Balint, M., Sreter, F.A., e Gergely, J. (1979) *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 936
- Szilagyi, L. e Lu, R.C. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 204-211
- Talbot, J.A. e Hodges R.S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3720-3723
- Talbot, J.A. e Hodges R.S. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 2798-2802
- Tanokura, M. e Ohtsuki, I. (1982) *FEBS Lett.* **145**, 147-149
- Tanokura, M. e Ohtsuki, I. (1984) *J. Biochem.* **95**, 1417-1421
- Tanokura, M., Tawada, Y., Ono, e Ohtsuki, I. (1983) *J. Biochem.* **93**, 331-337
- Taylor, E.W. (1991) *J. Biol Chem.* **266**, 294-302
- Toyoshima, Y.Y., Toyoshima, C., e Spudich, J.M. (1989) *Nature* **341**, 154-156
- Tao, T., Gowell, E., Strasburg, G.M., Gergely, J., e Leavis, P.C. (1989) *Biochemistry* **28**, 5902-5908
- Tao, T., Gong, B-J. e Leavis, P.C. (1990) *Science* **247**, 1339-1441
- Tsuda, S., Aimoto, S., e Hikichi, K. (1992) *J. Biochem.* **112**, 665-670
- Vale, R.D. (1992) *Trends Biochem. Sci.* **17**, 300.
- Van Erd, J-P. e Kawasaki, Y. (1973) *Biochemistry* **12**, 4972-4980.
- Van Eyk, J.E. e Hodges, R.S. (1987) *Biochem. Cell. Biol.* **65**, 982-989
- Van Eyk, J.E. e Hodges, R.S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1726-1732

- Wade, R., Eddy, R., Shows, T.B., e Kedes, L. (1990) *Genomics* **7**, 346-357
- Wagner, P.D. (1982) *Methods Enzymol.* **85**, 72-81
- Wagner, P.D. e Weeds A.G. (1977) *J. Mol. Biol.* **109**, 455-470
- Wagner, P.D. e Giniger, E. (1981) *Nature* **292**, 560-562
- Wakabayashi, Y., Huxley, H.E., Mos, L.A. e Klug, A (1975) *J. Mol. Biol.* **93**, 477-497
- Wang, C.K. e Cheung (1984) *J. Mol. Biol.* **190**, 509-521
- Wang, C.-L. A., Zhan, Q., Tao, T., e Gergely, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 9636-9640
- Warrick, H.M. e Spudich, J.A. (1987) *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**, 379-421.
- Warrick, H.M., DeLozanne, A., Leinwald, L.A., e Spudich, J.A (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9433-9437
- Waye, M.M.Y., Verhoeyen, M.E., Jones, P.T., e Winter, G. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 8561-8571
- Weeks, R.A. e Perry, S.V. (1978) *Biochem. J.* **173**, 449-457
- Whitby, F.G., Kent, H., Steward, F., Steward, M., Xie, X., Hatch, V., e Cohen, C. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 441-452
- White, S.P., Cohen, C. e Phillips Jr. G.N. (1987) *Nature* **325**, 825-828
- Wilkinson, J.M. e Grand, R.J.A. (1978) *Nature* **271**, 31-35
- Willadsen, K.A., Butters, C.A. Hill, L.E., e Tobacman, L.S. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 23746-23752
- Yanagisawa, M., Hamada, Y., Katsuragawa, Y., Imamura, M, Mikawa, T., e Masaki, T. (1987) *J. Mol. Biol.* **198**, 143-157.
- Zot, H.G. e Potter, J.D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7678-7683
- Zot, A.S. e Potter, J.D. (1987) *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 535-559
- Zot, A.S. e Potter, J.D. (1987b) *J. Biol. Chem.* **262**, 1966-1969
- Xie, X., Harrison, D.H., Schlichting, I., Sweet, R.M., Kalabokis, V.N., Szent-Györgyi, A.G. e Cohen, C. (1994) *Nature* **368**, 306-312

PUBLICAÇÃO

Farah, C.S. Miyamoto, C.A., Ramos, C.H.I., da Silva, A.C.R., Quaggio, R.B., Fujimori, K., Smillie, L.B., e Reinach, F.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5230-5240

OBSERVAÇÃO

O artigo na íntegra está disponível no site:

<http://www.jbc.org/content/269/7/5230.full.pdf>