UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**TROPOMIOSINAS CONTENDO 5-HIDROXITRIPTOFANO:
SONDAS ESPECÍFICAS PARA INTERAÇÕES NO
FILAMENTO FINO**

Aurea Denise de Sousa

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

*São Paulo
08 de março de 2002*

Ficha Catalográfica

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

S725t Sousa, Aurea Denise de
Tropomiosinas contendo 5 - hidroxitriptofano : sondas
específicas para interações no filamento fino / Aurea Denise
de Sousa. -- São Paulo, 2002.
131p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Farah, Chuck Shaker

1. Proteína - proteína : Interação : Bioquímica 2.
Tropomiosina : Bioquímica 3 Troponina : Bioquímica 4.
Actina : Bioquímica I. T. II. Farah, Chuck Shaker,
orientador.

574.19245 CDD

**“Tropomiosinas Contendo 5-
Hidroxitriptofano: Sondas Específicas para
Interações no Filamento Fino”**

AUREA DENISE DE SOUSA

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. SHAKER CHUCK FARAH
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. SHIRLEY SCHREIER
IQ – USP

Prof. Dr. SERGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP

Prof. Dr. SERGIO TEIXEIRA FERREIRA
UFRJ

Profa. Dra. MARTHA MERIWETHER SORENSON
UFRJ

SÃO PAULO
08 DE MARÇO 2002.

*"Theories come and theories go, the frog
remains..."*

Jean Rondstadt

AGRADECIMENTOS

Ao Chuck, pela receptividade e pela oportunidade de começar. Agradeço sua orientação firme e paciente.

Julgo-me feliz por ter trabalhado em uma “Equipe”. Adriana, Ângela, Alessandra, D. Cleuza, Eric, Leonor, Luís, Marcos e Sandro, esse trabalho tem um pouco de cada um de vocês. Agradeço a vocês pelas trocas de diálises nos finais de semana e feriados, pelas “caronas” em transformações de bactérias e em dosagens de proteínas, pelas discussões e sugestões, e por muitas outras atitudes que fizeram parte de nossos dias de forma tão espontânea, que tenho dificuldades em contabilizá-las. Não esquecerei as sextas-feiras, nas quais nos reuníamos para saborear bons vinhos e bons momentos.

À Daniela Oliveira e Patrícia Monteiro, pelo incentivo que influenciou grandemente essa “mudança de direção”.

Ao Walmir, pelo inegável apoio durante grande parte desse trabalho.

Aos integrantes do ReinaLab, da AnaLab e do QuaggioLab, por serem amigos, solícitos e prestativos.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química, pelo muito que aprendi com cada um.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro, sem o qual não me seria possível estar aqui.

Aos grandes amigos que me ofereceram apoio nos momentos difíceis: Cláudia Arianna, Diciola Rodrigues, Martha Furlaneto, Rosana Misseroni, Rosângela e João Piazza, Rose e Santa de Almeida.

Aos meus irmãos, que estiveram sempre ao meu lado, apesar dos quase 500 Km que nos distanciavam, particularmente à Ana, pela revisão - paciente e corajosa - da ortografia e da gramática desse trabalho.

Aos meus sobrinhos, por me lembrarem o quanto é fácil sorrir depois dos tombos.

Agradeço muito aos meus pais, Fernando e Nilza, pela educação e pelo amor, que me tornaram corajosa o suficiente para mudar de direção no meio do caminho.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Objetivos	1
1.Introdução	1
1.1.O Objeto de Estudo: Tropomiosina	2
1.1.1. <i>Ocorrência</i>	2
1.1.2. <i>Diversidade Gênica</i>	2
1.1.3. <i>Diferenciação funcional</i>	3
1.2. Estrutura da Tropomiosina	4
1.2.1. <i>Um modelo para estrutura coiled-coil</i>	4
1.2.2. <i>Tropomiosina como uma proteína filamentosa</i>	6
1.3. O Contexto: Sistema Muscular Esquelético	11
1.4. Filamentos do Sarcômero	13
1.4.1. <i>Ligação de fragmentos de TnT promove a interação cabeça-cauda entre moléculas de Tm</i>	14
1.5. Regulação da contração muscular	15
1.5.1. <i>Modelo do Bloqueamento Estérico</i>	15
1.5.2. <i>A Montagem do Filamento Fino</i>	16
1.5.3. <i>A Ligação de Tm Modula Atividade ATPásica da Actomiosina</i>	19
1.5.4. <i>Modelo de Hill</i>	20
1.5.5. <i>Modelo Cinético</i>	20
1.5.6. <i>Modelos Atômicos da Interação Actomiosina</i>	21
1.5.7. <i>O Modelo de Tobacman</i>	23
1.6. As evidências geram alguns questionamentos...	24
1.7. A Ferramenta para Medidas: Fluorescência de Análogos de Triptofano	25
2. Materiais e Métodos	30
2.1. Mutagênese	30
2.2. Transformação das Linhagens Bacterianas	36
2.3. Preparação e Purificação de Plasmídeos	36
2.4. Sequenciamento	36
2.5. Indução da Expressão de Proteínas	37
2.5.1. <i>Com triptofano</i>	37
2.5.2. <i>Com incorporação de análogos de triptofano</i>	37
2.6. Purificações de Proteínas	38
2.7. Dosagem de Proteínas	38

2.8. Ensaio de Ligação à Actina/Tropomina	39
2.9. Medidas de Fluorescência	39
2.10. Medidas de Viscosidade	40
2.11. Espectros de Dicroísmo Circular (CD)	40
2.12. Cálculo das Constante de Afinidade	40
2.12.1. Polimerização da Tropomiosina	40
2.12.2. Ligação de Troponina à Tropomiosina	43
3. Resultados	45
3.1. Construção dos Mutantes de ASTm	45
3.1.1. Estratégia para a Escolha da Região de Inserção da Sonda	45
3.1.2. Análise da Seqüência de Aminoácidos Codificados Pelo Exon 9	47
3.1.3. Análise da Estrutura do Segmento 258-275	49
3.2. Construção dos mutantes	50
3.3. Caracterização das Proteínas	50
3.3.1. Solubilidade	51
3.3.2. Ensaio de ligação ao filamento fino	52
3.3.3. Propriedades espectroscópicas dos mutantes	55
3.4. Mapeamento da Interação do resíduo 263 Tropomiosina com Troponina	59
3.5. Estudo Quantitativo da Polimerização da Tropomiosina	64
3.5.1. A sonda na posição 269 é especificamente sensível a interação cabeça-cauda	64
3.5.2. A inserção da sonda na posição 269 não afetou significativamente as propriedades da molécula	68
3.5.3. Investigação quantitativa da afinidade da interação cabeça-cauda em diversas concentrações de sal	70
3.5.4. Quantificação da dependência entre a interação cabeça cauda e a força iônica do meio	73
3.6. Abordagem quantitativa para investigar as Interações Tropomiosina /Troponina	74
3.7. Estudo da influência da interação Tm-Tm na afinidade entre Tm e outras proteínas do filamento fino	76
3.7.1. O quanto a formação de polímeros de Tm contribui para a afinidade de suas interações com outras proteínas?	76
3.7.2. O quanto apenas região de sobreposição Tm-Tm contribui para a afinidade das interações de Tm com outras proteínas?	80
3.7.3. A região de interação cabeça-cauda gera um sítio de alta afinidade para actina?	81
3.7.4. Um novo C-terminal que mimetiza o sítio de interação cabeça-cauda de maior afinidade que o da ASTm?	84

4. Discussão	87
4.1. Caracterização dos Mutantes	87
4.2. Estudo quantitativo da interação de Tm e Tm.Actina à Tn	88
4.3. Mapeamento da interação Tropomiosina (resíduo 263)/Troponina	91
4.4. Estudo quantitativo da polimerização da Tropomiosina	92
4.5. Estudo da Influência da interação Tm-Tm na afinidade entre Tm e outras proteínas do filamento fino	102
4.6. Simulação de um novo sítio de interação cabeça-cauda entre moléculas de Tm	109
4.7. Análise da Variação da Solubilidade da Tropomiosina Promovida por Alterações Atômicas no Anel Indólico do Triptofano que Substitui Ala na Posição 262 da Tm	111
Conclusões	113
Bibliografia	116
<i>Curriculum Vitae</i>	129
Artigos Publicados	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	5
Figura 2	9
Figura 3	12
Figura 4	16
Figura 5	19
Figura 6	22
Figura 7	26
Figura 8	30
Figura 9	32
Figura 10	33
Figura 11	46
Figura 12	48
Figura 13	49
Figura 14	51
Figura 15	54
Figura 16	55
Figura 17	56
Figura 18	57
Figura 19	59
Figura 20	61
Figura 21	63
Figura 22	65
Figura 23	66
Figura 24	67
Figura 25	69
Figura 26	71
Figura 27	73
Figura 28.	74
Figura 29	77
Figura 30	81
Figura 31	82
Figura 32	82
Figura 33	85
Figura 34	86
Figura 35	88
Figura 36	96
Figura 37	97
Figura 38	100
Figura 39	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	4
Tabela 2	32
Tabela 3	37
Tabela 4	47
Tabela 5	49
Tabela 6	52
Tabela 7	58
Tabela 8	64
Tabela 9	72
Tabela 10	110

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTm – tropomiosina recombinante com fusão dipeptídica Ala-Ser
ATP – trifosfato de adenosina
BSA – albumina sérica bovina
CD – dicroísmo circular
DNA – ácido desóxirribonucleico
cDNA – DNA complementar
DEAE – diaminoetil
DO – densidade óptica
DTT – ditionitrito
EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético
EGTA – ácido etileno-glicol-bis(β -aminoetil-éter)-n, n, n', n'-tetracético
F – intensidade de fluorescência
fo – fração de C-terminais de Tropomiosina na forma livre
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
K – constante de associação
MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
nfTM – tropomiosina recombinante sem fusão dipeptídica Ala-Ser
PCR – reação de polimerase em cadeia
Pi – fosfato inorgânico
S1 – subfragmento 1 da miosina
SDS-PAGE – gel de poliacrilamida com SDS
Tm – tropomiosina
Tn – complexo troponina
TnI – troponina I
TnC – troponina C
TnT – troponina T
Tris-HCl – solução de tris-(hidroximetil)-aminometano cujo pH é ajustado pela adição de ácido clorídrico
W – triptofano
(5OHW) – 5-hidroxitriptofano
(7NW) – 7-azatriptofano
WT – tipo selvagem (*wild type*)
 ΔF – variação na intensidade de fluorescência

RESUMO

Tropomiosina (Tm) é uma proteína *coiled-coil* de 284 aminoácidos que interage de uma maneira cabeça-cauda para formar filamentos e liga-se a filamentos de actina. Em músculos esqueléticos Tm interage com Troponina (Tn) e participa na regulação da contração muscular de forma dependente de cálcio. Após a análise da sequência de isoformas de Tm observamos que os resíduos 258-275 apresentam um padrão de polaridade específico para isoformas de músculos estriados, porém atípico para estruturas *coiled-coil*. Baseados nessas observações, produzimos versões recombinantes da tropomiosina polimerizável (ASTm) e não polimerizável (nfTm) com 5-hidroxitriptofano (5OHw) incorporado em posições específicas na região C-terminal. A caracterização desses mutantes permitiu a identificação de posições em regiões da molécula onde Tm interage com várias proteínas (actina, troponina e outras moléculas de tropomiosina) porém cada sonda apresenta fluorescência especificamente sensível a apenas uma dessas interações. A tropomiosina com 5OHw na posição 269 tem sua fluorescência sensível à polimerização. Utilizando esse mutante, obtivemos valores para a constante de afinidade para a polimerização de Tm em várias concentrações de sal, que descrevem a alta dependência entre interação cabeça-cauda e força iônica (Sousa & Farah, J. Biol. Chem., 2002, J. Biol. Chem., 277 (3), 2081-8). Tropomiosinas contendo 5OHw nas posições 261 e 263 possuem fluorescência seletivamente sensível à ligação de actina e troponina, respectivamente (Sousa & Farah, 2001, Biophysical J., 80 (1), Part 2, 91^a, abstract). Utilizando fragmentos de TnT, mapeamos a sensibilidade de AS263(5OHw) à região T1 da TnT (Oliveira *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275 (36), 27513-9). Obtivemos valores de afinidade para ligação da troponina à tropomiosina: em ausência de actina -Ca²⁺ (2, 5 x 10⁶ M⁻¹) e em presença de actina +Ca²⁺ (4, 3 x 10⁷ M⁻¹) e de actina -Ca²⁺ (5, 3 x 10⁷ M⁻¹). Utilizando os mutantes não polimerizáveis (nfTm) investigamos a influência da interação cabeça-cauda nas interações para as quais cada sonda é sensível (Sousa *et al.*, Biophys. J., 2002, abstract in press)

ABSTRACT

Tropomyosin (Tm) is a coiled-coil protein that polymerizes by head-to-tail interactions in an ionic-strength-dependent manner. In skeletal muscle, Tm interacts with troponin (Tn) to modulate muscle contraction via its Ca^{2+} -dependent repositioning on the actin filament. Since residues 258-275 present a striated muscle-specific pattern atypical for a coiled-coil structure, we produced a total of 18 polymerizable (ASTm) and non-polymerizable (nfTm) versions of recombinant Tm with tryptophan analogues probes incorporated at specific positions near their C-termini. We found three mutants whose fluorescence are specifically sensitive to Tn-binding (position 263), actin-binding (261) or Tm polymerization (269). We used these mutants to: i) quantitatively investigate the ASTm monomer – polymer equilibrium and its dependence on ionic strength and determine a minimum number effective charges involved in stabilizing the head-to-tail interaction, ii) demonstrate that amino acid residue 263 of Tm interacts with residues 77-157 of TnT and that neighboring amino acid sequences along the primary structure of TnT modulate this interaction, iii) quantitatively analyze the binding of the ASTm mutants to Tn, in the presence and in the absence of actin and Ca^{2+} ; and iv) qualitatively investigate the influence of the head-to-tail overlap in Tm binding to actin and/or Tn.

Supported by FAPESP

OBJETIVOS

- ✓ Obter e caracterizar mutantes de tropomiosina com análogos de triptofano incorporados na região C-terminal, cuja fluorescência seja especificamente sensível a interações com outras proteínas do filamento fino muscular.

- ✓ Investigar a termodinâmica de polimerização da tropomiosina e sua dependência da força iônica.

- ✓ Investigar a influência da polimerização da tropomiosina em suas interações com outras proteínas do filamento fino.

1.INTRODUÇÃO

O objeto de estudo desse trabalho consiste nas interações proteicas envolvidas na montagem do filamento fino muscular esquelético, focalizando as interações nas quais as moléculas de tropomiosina participam. A ferramenta principal utilizada para as medidas adotadas é a fluorescência de análogos de triptofano, incorporados em α -tropomiosina muscular esquelética de galinha, expressa em bactéria. Inicialmente serão abordadas dentre as diversas propriedades da molécula de tropomiosina aquelas que contribuíram para as informações referentes à essa proteína, numa perspectiva cronológica dos estudos já realizados. O contexto muscular é descrito, tendo como enfoque tópicos pertinentes às interações aqui estudadas. Finalmente, são descritas as propriedades da sonda utilizada como ferramenta de estudo.

1.1.O OBJETO DE ESTUDO: TROPOMIOSINA

1.1.1. Ocorrência

Tropomiosinas são proteínas capazes de ligar-se à actina em vários tipos de tecido, associando-se ao filamento fino dos músculos e aos microfilamentos em células não musculares, tendo sido inicialmente isoladas em músculos esqueléticos (Bailey, 1948). Em músculos estriados, tropomiosinas ligadas ao complexo troponina regulam a contração muscular em função de variações nas concentrações intracelulares do íon cálcio (Zot & Potter, 1982, Farah & Reinach, 1995; Tobacman, 1996). Músculos lisos e células não musculares possuem tropomiosinas, mas não possuem o complexo troponina. Nesses tecidos, há indícios de que a fosforilação das cadeias leves da miosina seja o principal mecanismo de regulação da interação actina-miosina (Trybus, 1994).

1.1.2. Diversidade Gênica

Apesar de formarem uma família conservada, as tropomiosinas de vertebrados possuem uma grande quantidade de isoformas. Algumas isoformas são encontradas em mais de um tipo de tecido, embora possam estar diferentemente localizadas dentro da célula (Lin *et al.*, 1988), enquanto outras são específicas para determinados tecidos, sendo esse o caso dos músculos estriados, músculos lisos e isoformas de α -tropomiosinas de cérebro (Ruiz-Opazo *et al.*, 1985; Less-Miller & Helfman, 1991). Essa diversidade pode ser explicada pelo fato da tropomiosina ser codificada por mais de um gene e pela utilização de mecanismos de *splicing* alternativo de RNA e de promotores alternativos. Já foram descritos pelo menos 4 tipos de genes que codificam tropomiosinas em vertebrados: gene α (Ruiz-Opazo & Nadal-Ginard, 1987), gene β (Libri *et al.*, 1989), gene TPM-3 (Martin-Zanca *et al.*, 1986) e gene TPM-4 (Less-Miller *et al.*, 1990). Destes, o gene α é o mais complexo, possuindo quinze exons e codificando um mínimo de nove isoformas em mamíferos. Mecanismos de *splicing* alternativo em

tropomiosina humana foram evidenciados pela primeira vez por MacLeod e colaboradores (1985). O uso de promotores alternativos permite a produção de mRNAs que codificam proteínas com N-terminais distintos.

Como será descrito adiante, a Tm é uma proteína dimérica. A razão entre as isoformas do polipeptídeos que compõem o dímero varia com o tipo de tecido; músculos esqueléticos de contração rápida são compostos predominantemente por dímeros $\alpha\alpha$ -Tm e uma fração minoritária de $\alpha\beta$ -Tm (Bronson & Schachat, 1982).

1.1.3. Diferenciação funcional

Em vertebrados, genes α e β codificam, respectivamente, α -Tm e β -Tm com diferentes seqüências para a região C-Terminal. O exon 9a é utilizado para codificar os últimos 27 aminoácidos das isoformas de tecidos musculares estriados. Músculos lisos e tecidos não musculares, que não possuem o complexo troponina, não têm sua porção C-terminal codificada pelo exon 9a, o que pode ser um indicativo de que essa região esteja relacionada com a função regulatória do complexo troponina-tropomiosina. O exon 9a é o único utilizado exclusivamente em músculos estriados (para revisão ver Less-Miller & Helfman, 1991). Alguns estudos realizados evidenciam que essa região seja responsável pela diferenciação funcional das isoformas de tropomiosina. Estudos de Hammell e Hitchcock-DeGregori, (1996) demonstraram (através de quimeras e mutantes de deleção de α -Tm não acetiladas de músculos estriados de ratos) que os primeiros 18 resíduos (258-275) codificados por esse exon são decisivos para a interação da troponina com a tropomiosina no filamento fino.

Existem evidências de que os exons 6 e 9 do gene β - que codificam, respectivamente, resíduos 189-213 e 258-284 de β -tropomiosinas - conferem especificidade funcional à isoforma expressa em cada tecido (Clayton *et al.* 1988; Hammell & Hitchcock-DeGregori, 1996). Essas seqüências da Tm coincidem com os domínios previstos para a interação com a troponina, em músculos estriados. No gene β , o exon 2 é utilizado em

vários tipos de tecido (Libri *et al.*, 1989). Os exons 2 e 9 do gene α - que codificam, respectivamente, as seqüências 39-80 e 258-284 de α -tropomiosinas - são específicos para diferentes tecidos. Em genes α não foi observada nenhuma relação entre a seqüência codificada pelo exon 6 e o tecido para o qual a isoforma é expressa (Ruiz-Opazo *et al.*, 1985). Todos os genes de tropomiosina conhecidos utilizam o exon 9a para codificar isoformas de Tm em tecidos musculares estriados, sendo que as isoformas α e β são altamente homólogas (para revisão leia Less-Miller & Helfman, 1991). A Tabela 1 faz uma associação de exons alternativos com os tipos de tecido.

	M. Liso	M. Estriado
Gen α	exons 2a e 9d	exons 2b e 9a
Gen β	exons 6a e 9d	exons 6b e 9a

*Tabela 1: Exons em genes α e β . Foi adotada a nomenclatura utilizada na revisão de Less-Miller & Helfman (1991), mas nem todos os autores citados nesse trabalho utilizaram essa nomenclatura. Alguns grupos se referem aos exons 9a (músculos esqueléticos) e 9d (músculos lisos) da seguinte forma: 1) foram nomeados exon VIII_{nm} - para tecido não muscular- e exon VIII_{sk} - para músculos esqueléticos - pelo grupo que publicou os primeiros trabalhos sobre o gene hTM_{nm}, (Clayton *et al.* 1988) ; 2) foram denominados exon 7 - para músculos esqueléticos - e exon 8 - para músculos lisos/tecidos não musculares - por grupos que publicaram trabalhos sobre o gene β de ratos (Helfman & Ricci, 1989); 3) foram denominados exon 11 - para músculos esqueléticos - e 12 - para músculos lisos - por grupos que publicaram trabalhos sobre α gene (Ruiz-Opazo *et al.* 1985). Comparações de seqüências de isoformas com diferentes tamanhos são feitas pelo alinhamento a partir da porção C-Terminal, já que essas diferenças em tamanho se dão por utilização de promotores alternativos - codificando diferentes porções N-Terminal.*

1.2. ESTRUTURA DA TROPOMIOSINA

1.2.1. Um modelo para estrutura coiled-coil

A tropomiosina é uma proteína dimérica. Em músculos esqueléticos, possui cadeias α -helicoidais com 284 aminoácidos cada, que podem ser idênticas ou altamente homólogas e encontram-se super-enoveladas em uma estrutura conhecida como *coiled-coil*. Em estruturas *coiled-coil*, as

cadeias α -helicoidais (rotação para a mão-direita) são super-espiraladas em rotação para a mão-esquerda, reduzindo a cada volta na α -hélice de 3,6 para 3, 5 aminoácidos.

Analisando a sequência primária de proteínas que adotam a estrutura *coiled-coil*, podemos observar a existência de uma periodicidade estrutural a cada 7 resíduos. Cada um desses períodos corresponde duas voltas de 3, 5 resíduos na α -hélice. Tal periodicidade acarreta a existência de sete posições definidas na superfície da hélice (*a-g*), que apresentam funções distintas na manutenção da estrutura. Os resíduos nas posições *a* e *d* encontram-se na interface hélice-hélice e são tipicamente hidrofóbicos, promovendo o contato entre as cadeias. Os resíduos nas demais posições encontram-se expostos ao solvente e são tipicamente hidrofílicos promovendo a solubilização da proteína no meio aquoso, sendo que os resíduos nas posições *e* e *g* geralmente apresentam carga e contribuem para a estabilização da estrutura através de pontes salinas entre as cadeias (para revisão leia Smillie, 1979, Lupas, 1996, 1997).

A Figura 1 apresenta um esquema que sumariza as posições estruturais e a contribuição de cada uma delas para a estrutura *coiled-coil*.

Figura 1: Esquema das interações que estabilizam a estrutura *coiled-coil*, para as quais cada posição (*a-g*) contribui de forma específica. Interações hidrofóbicas entre resíduos nas posições *a-d'* e *d-a'* e pontes salinas entre resíduos com cargas opostas nas posições *g-e'* e *e-g'* mantêm as duas hélices unidas. Os resíduos hidrofílicos nas posições *b, c* e *f* garantem a alta solubilidade da tropomiosina.

A tropomiosina é, dentre as proteínas com estrutura conhecida, a que apresenta a maior estrutura *coiled-coil* ininterrupta. Os dados estruturais obtidos a partir da difração de raios-x em cristais da Tm forneceram resolução de 7Å (Whitby & Phillips, 2000). Apesar desses serem os melhores dados disponíveis até agora para a molécula inteira, são ainda insuficientes para localizar precisamente as posições dos aminoácidos nas cadeias da Tm. Fragmentos correspondendo a N-terminal da molécula tiveram suas estruturas determinadas por RMN e raio-x (Greenfield *et al.*, 1998, Brown *et al.*, 2001), o que será discutido posteriormente.

1.2.2. Tropomiosina como uma proteína filamentosa

A. Evidências para a reversibilidade da polimerização da Tm

Já em 1948, quando a Tm foi purificada pela primeira vez a partir de músculos esquelético (Bailey, 1948), Bailey observou sua alta viscosidade em baixa concentração de sal. Em 1951, Tsao e colaboradores demonstraram que a força iônica do meio é um fator determinante para viscosidade da Tm. Kay e Bailey (1960) estabeleceram uma relação entre o comprimento do polímero de Tm e a concentração de sal do solvente e propuseram que sua polimerização ocorre sob a forma de simples agregação das extremidades da molécula (*end-to-end*). Até 1961, acreditava-se na irreversibilidade da polimerização da Tm. Essa idéia baseava-se em estudos que utilizavam altas concentrações da proteína (maiores que 0,4mg/mL), condições nas quais a tropomiosina ainda se apresentava bastante polimerizada e a polimerização era pouco sensível ao aumento na concentração da proteína (Tsao *et al.*, 1951, Kay & Bailey, 1960). Os autores previam que, mesmo em diluições infinitas de Tm, a proteína estaria no estado polimerizado. Contudo, no início dos anos 60, estudos de birefringência elétrica (Asai, 1961) e de espalhamento de luz (Ooi *et al.*, 1961) demonstraram que o comprimento da Tm varia conforme a concentração da proteína, desde que se trabalhe com baixas concentrações da mesma. Diferentemente de estudos anteriores, os estudos de Asai e Ooi

demonstraram que a relação estabelecida entre o comprimento da Tm e sua concentração fornece valores consistentes com a completa dissociação da Tm em monômeros, quando extrapolados para uma diluição infinita. Nesses estudos de polimerização, cada “dímero” (coiled-coil com cadeias alinhadas e paralelas) representa um “monômero” que interage capaz de interagir de maneira cabeça-cauda com outros “monômeros” para formar grandes filamentos, os “polímeros”.

B. Explicações para a alta viscosidade da Tm: polimerização linear versus agregações laterais

Nessa mesma época – início da década de 60 -, baseados na relação entre as estimativas para comprimento do polímero e o peso total do agregado, Ooi e colaboradores (1961) sugeriram que a polimerização da Tm não ocorreria por simples polimerização linear, devendo envolver outras formas de agregação (por exemplo, agregação lateral). Experimentos realizados por Asai (1961) demonstraram que o momento dipolo permanente da Tm era parcialmente anulado em solventes sem sal, o que corroborava a hipótese da contribuição de agregações diferentes da interação cabeça-cauda na polimerização da Tm.

Em 1969, porém, estudos mais profundos com Tm cardíaca realizados por McCubbin e Kay - utilizando várias técnicas (velocidade de sedimentação, sedimentação em equilíbrio, osmometria, viscosimetria e dispersão óptica rotatória) - demonstraram que a agregação da Tm pode ser interpretada como uma polimerização puramente linear através de interações entre extremidades dos monômeros, que assumem a forma de bastão. Nesse estágio de conhecimento das propriedades da Tm, os estudos estavam mais direcionados para uma investigação qualitativa da natureza das interações entre moléculas de Tm. Em 1993, a questão da importância das interações laterais na polimerização da Tm foi retomada pelo grupo de Maeda, que obteve cristais de Tm onde as moléculas de Tm se empilhavam, sugerindo que o empacotamento foi direcionado por interações laterais entre os monômeros (Miegel *et al.*, 1993). Esses dados

sugerem que a Tm é potencialmente capaz de agregar-se de forma diferente da interação cabeça-cauda em alta concentração proteica, sendo que os estudos de McCubbin e Kay (1969) demonstram que os aumentos na viscosidade de soluções de Tm são decorrentes da sua polimerização linear.

C. O que se sabia sobre a Tm quando os principais estudos sobre sua polimerização foram realizados?

Já se sabia que a Tm apresenta um percentual de α -hélice maior que 90% (Cohen & Szent-Györgyi, 1957) e que é formada pela dimerização de duas cadeias formadas por isoformas idênticas ou homólogas (Cummins & Perry, 1973). Também a sobreposição de aminoácidos entre as regiões C- e N-terminais já havia sido proposta com base nas repetições observadas nos cristais de Tm, que apresentavam uma distância (410 Å) menor do que a esperada para uma proteína cujos 284 aminoácidos assumem estrutura α -helicoidal (~423 Å). Foi proposto que a diferença entre o tamanho observado e o previsto corresponderia à sobreposição promovida pela interação cabeça-cauda da Tm envolvendo aproximadamente 9 aminoácidos de cada terminal (Caspar *et al.*, 1969, Cohen *et al.*, 1972).

Depois do seqüenciamento da Tm nos anos 70, foi proposto que as repetições *abcdefg*, típicas para estruturas *coiled-coil*, ocorreriam em toda a extensão da Tm, sendo que as duas cadeias fariam contato através das posições *a* e *d* (Sodek *et al.*, 1972, Stone *et al.*, 1978). Estudos clássicos na análise estrutural da Tm foram realizados por McLachlan e Stewart (1975, 1976) e, apesar de consistirem em análises teóricas, têm sido validados por dados experimentais obtidos desde então. Os dois estudos consistiram em uma proposta para a estrutura da Tm baseada em uma análise da sua seqüência de aminoácidos. No primeiro estudo, em 1975, os autores propuseram que (1) as duas cadeias da Tm encontram-se paralelas (corroborando com a sugestão de Caspar *et al.*, 1969) e alinhadas (*in register*). (2) A estrutura *coiled-coil* seria estabilizada por interações hidrofóbicas entre resíduos nas posições *a* e *d* e pontes salinas entre resíduos *e* e *g*. (3) A sobreposição de nove aminoácidos das N- e C-

terminais da Tm maximizaria interações hidrofóbicas e eletrostáticas em suas análises (McLachlan & Stewart, 1975).

No ano seguinte, num segundo trabalho, os mesmos autores propuseram uma outra periodicidade de 14 vezes para a molécula de Tm, que deveria estar relacionada com os sítios de ligação à actina no estado ativado e não ativado do filamento fino (McLachlan & Stewart, 1976). A proposta considera o fato de que cada molécula de Tm interage com sete monômeros de actina no filamento fino e, durante a regulação da contração muscular, a tropomiosina se reposiciona sobre o filamento de actina, o que pode significar que Tm possui 14 sítios de ligação para actina (Figura 2).

Figura 2: Esquema da periodicidade proposta por McLachlan e Stewart (1975) para a sequência primária da Tm. Os nove primeiros aminoácidos encontram-se envolvidos na interação cabeça-cauda e, por esse motivo não foram considerados na análise dos autores, que dividiram 275 aminoácidos em 7 pseudo-repetições de 39 ½ aminoácidos. Cada uma dessas repetições estaria envolvida na interação com um monômero de actina (esfera rosa), no estado "ligado" (região β) ou "desligado" (região α). Cada região alfa ou beta, por sua vez, divide-se em duas porções: uma predominantemente positiva/hidrofóbica contendo aproximadamente 8 resíduos (azul) e outra predominantemente negativa contendo aproximadamente 12 resíduos (laranja). Os números entre parênteses correspondem à numeração dos aminoácidos na sequência da Tm.

A Figura 2 ilustra a proposta de McLachlan e Stewart (1976), onde os autores dividiram os últimos 275 aminoácidos da Tm em 7 pseudo-repetições de cerca de 40 aminoácidos. Cada uma dessas repetições estaria envolvida na sua interação com um monômero de actina (esfera rosa), no estado "ligado" (região β) ou "desligado" (região α). Cada região alfa ou beta, por sua vez, divide-se em duas porções: uma predominantemente positiva/hidrofóbica contendo aproximadamente 8 resíduos (azul) e outra predominantemente negativa contendo aproximadamente 12 resíduos

(laranja). Os números entre parênteses correspondem à numeração dos aminoácidos na sequência da Tm. Os nove primeiros aminoácidos encontram-se envolvidos na interação cabeça-cauda e, por esse motivo não foram considerados na análise dos autores.

D. Modificações nos aminoácidos das regiões N- e C-terminais afetam a polimerização da Tm

Uma vez que os estudos apontavam as extremidades N- e C-terminais da Tm como responsáveis por sua polimerização, foram iniciadas as análises da proteína modificada nessa região (Johnson & Smillie, 1977, Mak *et al.*, 1978, Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Heeley *et al.*, 1989, Monteiro *et al.*, 1994). Estudos de deleções de aminoácidos na extremidade C-terminal da Tm, através de digestões com carboxipeptidase A (Johnson & Smillie, 1977) e do efeito da acetilação do grupamento ϵ -NH₂ da lisina 7 (Johnson & Smillie, 1977) demonstraram que a remoção de mais de três aminoácidos da extremidade C-terminal e que o impedimento (modificação química) do grupamento ϵ -NH₂ (Lys 7) de participar de ponte salinas abolia a alta viscosidade promovida pela polimerização cabeça-cauda. Em 1978, Mak e colaboradores demonstraram a fosforilação da Ser-283 da α -Tm, utilizando a proteína marcada radioativamente com [³²P]fosfato (O-fosfatoserina-283) e previram que formação de ponte de salina com as cadeias laterais de Lys-6 e Lys-12 na região de sobreposição Tm-Tm poderia estabilizar polímeros de Tm. Em 1989, Heeley e colaboradores estudaram o efeito da fosforilação da Ser-283 nas propriedades da Tm e observaram que, em ausência de Tn, tropomiosinas apresentam maior viscosidade quando fosforiladas (Heeley *et al.*, 1989). Os autores demonstraram que a fosforilação não afeta a habilidade de Tm de ligar-se à actina ou à Tn (Heeley *et al.*, 1989). Todavia, a ligação de Tn induziu um aumento de viscosidade da Tm não fosforilada, o que não ocorreu com a proteína fosforilada (Heeley *et al.*, 1989). Esse estudo sugeriu que a fosforilação afeta a capacidade da Tm de polimerizar-se, mas não a afinidade da interação Tm-Tn, que foi similar para as duas formas, fosforilada ou não. A tropomiosina recombinante expressa em

bactéria (nfTm) não sofre acetilação N-terminal e não polimeriza (Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987). Em 1994, o grupo de Reinach demonstrou que uma fusão de dois aminoácidos à região N-terminal (ASTm) reestabelece as propriedades de polimerização da Tm (Monteiro *et al.*, 1994).

E. O que se sabe hoje sobre a estrutura da Tm?

Ainda hoje não foram obtidas informações estruturais de toda a Tm com resolução atômica. Os maiores avanços nesse sentido são relativamente recentes e consistem na estrutura da proteína inteira resolvida a 7Å (Whitby & Phillips, 2000), na estrutura coiled-coil de um peptídeo quimérico obtida por RMN (Greenfield *et al.*, 1998) e na estrutura cristalina do fragmento Tm₁₋₈₀ (Brown *et al.*, 2001). O peptídeo quimérico estudado por Greenfield e colaboradores consiste na fusão dos primeiros 14 aminoácidos da região N-terminal da Tm com os 18 aminoácidos do fator de transcrição GCN4 de levedura, proteína utilizada como modelo de estudo para estruturas coiled-coil. Brown e colaboradores obtiveram a estrutura cristalina (resolução de 2Å) dos primeiros 81 resíduos de α -Tm esquelética recombinante (Brown *et al.*, 2001). Estas recentes estruturas das formas α -acetilada (Greenfield *et al.*, 1998) e não acetilada (Brown *et al.*, 2001) do fragmento N-terminal da Tm fornecem grandes indicativos de como acetilação no grupo α -amino deve afetar a polimerização da Tm e suas propriedade de ligação à actina. Como inicialmente sugerido por Monteiro e colaboradores (1994), na ausência da extensão dipeptídica da extremidade N-terminal, repulsões entre os grupamentos carregados α -amino na posição *a* (localizada na interface hidrofóbica do dímero) desestabilizam a estrutura *coiled-coil*. Essa desestabilização deve comprometer a estabilidade do complexo cabeça-cauda, responsável pela polimerização.

1.3. O CONTEXTO: SISTEMA MUSCULAR ESQUELÉTICO

Os músculos estriados são compostos por fibras musculares, células multinucleadas que geralmente estendem-se por todo o comprimento do músculo. Cada fibra é subdividida em miofibrilas, que são feixes longitudinais com aparência estriada, daí decorrendo a denominação “músculo estriado”. A análise longitudinal de miofibrilas, por microscopia óptica, revela um padrão de bandas claras e escuras (bandas I e A). Pode-se observar também a presença de um disco que corta transversalmente a miofibrila, na metade de cada banda I: o disco Z. A miofibrila consiste na sequência de unidades repetitivas e funcionais, delimitadas pelo disco Z: os sarcômeros (Figura 3).

No início dos anos 50 já se sabia que as miofibrilas eram compostas por duas proteínas principais – a miosina (60% p/p) e a actina (20% p/p) – e já haviam sido observados dois tipos de filamentos, diferenciados por suas espessuras. Em 1954, H.E. Huxley e Hanson observaram, em microscópio óptico, a contração de miofibrilas na presença de ATP e constataram que ocorria o encurtamento de apenas uma das bandas: a banda I. Estudos de microscopia óptica demonstraram o desaparecimento das bandas I ou A quando as miofibrilas eram submetidas a soluções que solubilizavam preferencialmente actina ou miosina, respectivamente (Hanson & Huxley, 1955). Em 1957, H.E. Huxley otimizou condições (cortes finos e longitudinais) para observar os filamentos com maior resolução. Os resultados permitiram que o autor observasse que a banda I é composta pelos filamentos finos e a banda A, por filamentos grossos (Figura 3). Dessa forma, foi demonstrado que os dois tipos de filamentos – até então diferenciados por suas espessuras – possuíam composições diferentes, sendo o filamento fino composto por actina e o filamento grosso, por miosina. Ainda nesse estudo, foi observada a sobreposição dos filamentos durante a contração, acompanhada pela projeção do filamento grosso em direção ao filamento fino. Em 1969, H.E. Huxley propôs um mecanismo no

qual uma sucessão de ligações entre miosina e actina promoveria a sobreposição dos filamentos durante a contração muscular.

Figura 3: Modelo de um sarcômero. A) Músculo em repouso e B) Músculo contraído

A Figura 3 apresenta um esquema para as mudanças observadas no sarcômero durante a contração da miofibrila. A contração isotônica do músculo ocorre com a aproximação das linhas Z, devido ao aumento da sobreposição entre os filamentos de actina e miosina, consequência direta da interação entre essas duas proteínas. O processo de contração inicia-se com um estímulo nervoso, que atinge a placa motora (sinapse nervo-músculo) e promove a despolarização da membrana. A liberação de íons cálcio na fibra pelo retículo sarcoplasmático promove o aumento da concentração de Ca^{2+} de 10^{-7}M para 10^{-5}M . O cálcio, em última instância, promove a liberação dos sítios de actina para a ligação de miosina e consequentemente, a contração muscular. A energia requerida para a contração é fornecida pela hidrólise de ATP pelo domínio globular da miosina (S1), no decorrer da ligação com actina (Lymn & Taylor, 1971). O processo é revertido quando o cálcio é sequestrado pelo retículo sarcoplasmático e a concentração de cálcio retorna para valores submicromolares.

1.4. FILAMENTOS DO SARCÔMERO

O filamento grosso do sarcômero é composto principalmente por miosina, que é uma proteína de 520 kDa composta por seis polipeptídeos: duas cadeias pesadas (220 kDa cada) e dois pares de cadeias leves (com cerca de 20 kDa cada). A proteína estrutural do filamento fino é a actina. A forma monomérica da actina (G-actina) é uma proteína globular (cristalização: Kabsch *et al.*, 1990) de 42kDa que, em concentrações fisiológicas de sal, polimeriza-se na forma de dupla hélice (aproximadamente 13 monômeros por volta por fita) para formar a F-actina. A cada sete monômeros de F-actina no filamento encontra-se ligada uma molécula de Tm. Associado a cada Tm encontra-se um complexo Tn, que é composto por três subunidades: TnT, TnI e TnC. Sobre a metade C-terminal da tropomiosina, e estendendo-se até a região de interação cabeça-cauda, encontra-se ligada antiparelelamente a TnT, que é a subunidade responsável pela ancoragem do complexo troponina ao filamento fino. Em 1987, White e colaboradores analisaram a estrutura de co-cristais de Tm-Tn e confirmaram que a TnT interage com a tropomiosina em duas regiões: na região C-Terminal e na região dos resíduos 150-180 da tropomiosina. Ligada à TnT e ao complexo acto-tropomiosina, encontra-se a TnI, que é a subunidade responsável pela inibição da atividade ATPásica da actomiosina. A TnI interage com o complexo actomiosina, com a TnT e com a TnC, que é a subunidade responsável pela ligação a íons de cálcio (Zot & Potter, 1987) .

1.4.1. Ligação de fragmentos de TnT promove a interação cabeça-cauda entre moléculas de Tm

A ligação do complexo Tn promove um grande aumento na viscosidade de Tm de músculos esqueléticos (Ebashi & Kodama, 1965) e cardíacos (Tobacman, 1988). TnT é uma subunidade do complexo troponina, que liga-se a Tm. TnT é insolúvel em baixas forças iônicas. Estudos demonstraram que fragmentos solúveis N- e C-terminais da TnT podem ser obtidos através da clivagem da TnT por quimotripsina, são eles

T1 e T2, respectivamente (Ohtsuki, 1979, esquematizado na Figura 19). Os dois fragmentos ligam-se a Tm, mas somente T2 interage com as outras subunidades da troponina, TnI e TnC. Enquanto a T1 liga-se fortemente a Tm de maneira independente da concentração de cálcio (Pearlstone & Smillie, 1982), T2 tem sua afinidade por Tm reduzida em presença de cálcio e TnC (Pearlstone & Smillie, 1983). A análise da estrutura de co-cristais de Tm-Tn demonstrou que o N-terminal da TnT (T1) apresenta a forma de um longo bastão (160 Å) que se posiciona sobre a região de interação cabeça-cauda da Tm, e que a região C-terminal da TnT (T2) assume uma conformação globular e interage com as outras proteínas do complexo e com Tm, a aproximadamente 200 Å da região de sobreposição Tm-Tm (resíduos 150-180 da Tm) (White *et al.*, 1987).

A digestão de TnT com brometo de cianogênio gera sete fragmentos, CB1 a CB7, sendo que a região N-terminal da TnT, CB1, apresenta uma metionina interna que não é completamente clivada e quando clivada gera CB2 e CB3 (Pearlstone *et al.*, 1977). Jackson e colaboradores demonstraram que ligação de CB1 sozinho já é capaz de aumentar a viscosidade de Tm (Jackson *et al.*, 1975). Pato e colaboradores (1981), utilizando fragmentos N- e C-terminais de Tm, demonstraram através de cromatografia de gel filtração e de afinidade que o fragmento C-terminal (190-284) da Tm liga-se a CB1 e que essa ligação promove a interação cabeça-cauda entre N- e C- terminais da Tm. Pearlstone e Smillie (1982) imobilizaram vários tipos de Tm em coluna de afinidade e demonstraram que a Tm não-polimerizável (Tm₁₋₂₇₃ produzida por digestão enzimática) liga-se a T2, embora não se ligue a T1. Entretanto a ligação de Tn à tropomiosina tratada com carboxipeptidase A (sem os últimos três aminoácidos) não promove a polimerização da proteína (Ueno *et al.*, 1976). Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a região N-terminal da TnT expande-se pela região de interação cabeça –cauda da Tm (Flicker *et al.*, 1982).

1.5. REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

1.5.1. Modelo do Bloqueamento Estérico

No início da década de 70, várias evidências permitiram que fosse proposto um modelo para as mudanças na estrutura do filamento fino promovidas pela ligação de cálcio (Huxley, 1972, Haselgrove, 1972, Parry & Squire, 1973), como é esquematizado na Figura 4.

Considere que o esquema apresenta somente uma fita do filamento de actina linearizado, sendo que temos no plano superior a interface com a outra fita do filamento de actina e no plano inferior a interface de ligação com miosina. No músculo relaxado, a tropomiosina estaria assumindo uma posição que impede estericamente a ligação de miosina à actina (modelo do bloqueamento estérico, Huxley, 1972), sendo que a interação de Tn com o complexo acto-tropomiosina estaria estabilizando essa posição da tropomiosina no filamento (posição desligada).

Figura 4: Modelos para as mudanças conformacionais no filamento fino durante a contração do músculo esquelético. Adaptação da Figura 1 da revisão de Farah & Reinach, 1995. No estado desligado, a TnC apresentaria seus sítios específicos para a ligação a cálcio (N-terminal) vazios e seu C-terminal ligado ao N-terminal da TnI, TnI encontra-se ligada ao domínio C-terminal da TnT e ao filamento fino. A ligação de cálcio ao N-terminal da TnC promoveria o aumento da afinidade de TnC para TnI, que se desligaria da acto-tropomiosina e permitiria o reposicionamento da tropomiosina no filamento, liberando a interação acto-miosina.

A ligação de cálcio promoveria uma mudança conformacional da TnC, que seria transmitida a todo o complexo, enfraquecendo a interação Tn com acto-tropomiosina e reposicionando a tropomiosina no filamento (posição ligada), de forma a liberar os sítios de interação miosina-actina. As

mudanças conformacionais promovidas no filamento fino em função da ligação de cálcio, assim como detalhes das interações existentes, ainda não estão bem esclarecidos, sendo objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa (para revisão vide, Zot & Potter, 1987, Farah & Reinach, 1995, Holmes, 1995, Tobacman, 1996, Squire & Morris, 1998, Chen *et al.*, 2000, Gordon *et al.*, 2000, 2001).

1.5.2. A Montagem do Filamento Fino

Algumas informações referentes às interações envolvidas na montagem do filamento fino são de fundamental importância para a análise e interpretação das mudanças conformacionais intermediárias do sinal disparado pela ligação de cálcio à TnC.

i) Tm polimeriza-se de uma maneira cabeça-cauda (Kay & Bailey, 1960; McCubbin & Kay, 1969). Ainda não haviam sido elucidados detalhes dessa polimerização (ie K de associação, tamanho médio do polímero em condições específicas) mas sabe-se que Tm não polimerizável produzida por tratamento com peptidase (Mak *et al.*, 1983), modificações químicas (Johnson & Smillie, 1977) ou técnicas recombinantes (Hitchcock-De-Gregori & Heald, 1987; Monteiro *et al.*, 1994) têm sua capacidade de ligação à actina drasticamente reduzida.

ii) TnT interage com Tm em duas regiões (Figura 4, vide também Figura 19), uma de ancoragem (C-terminal da Tm e N-terminal da TnT) e outra regulatória (próximo ao resíduo 190 da Tm e na região 157-263 da TnT) (Jacskon *et al.*, 1975; Pearlstone *et al.*, 1977; Flicker *et al.*, 1982; Pearlstone & Smillie, 1982, 1983, White *et al.*, 1987).

iii) Tm liga-se ao longo do filamento de actina (Hanson & Lowy, 1963) de forma cooperativa (para revisão vide Tobacman, 1986), podendo ocupar duas (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972; Parry & Squire, 1973) ou mais (McKillop & Geeves, 1993; Holmes, 1995) posições no filamento fino.

iv) Apesar de serem observadas sete pseudo-repetições (α/β) ao longo da molécula de Tm, que corresponderiam a regiões de interação de

Tm com actina (McLachlan & Stewart, 1975 – esquematizado na Figura 2), essas interações ainda não foram bem caracterizadas. Estudos realizados com mutantes de Tm demonstraram que a deleção de seqüências que correspondam integralmente a uma (resíduos 47-88) ou meia repetição α/β (resíduos 47-67) não interferem na habilidade dos mutantes de ligarem-se à actina, enquanto que a deleção de 2/3 dessa seqüência (resíduos 47-74) comprometem essa propriedade da proteína (Hitchcock-DeGregori & Varnell, 1990).

v) A ligação de Tn não promove a polimerização de Tm não acetilada (Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987), mas reestabelece a ligação de tropomiosinas não polimerizáveis à actina (Mak *et al.*, 1983; Heeley *et al.*, 1987, Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Willadsen *et al.*, 1992, Monteiro *et al.*, 1994), sendo ainda observada uma pequena cooperatividade nessa interação (Mak *et al.*, 1983).

vi) A afinidade de Tm à actina, mas não a cooperatividade da ligação Tm-actina, é aumentada quando Tm forma complexo com Tn (Hill *et al.*, 1992; Butters *et al.*, 1993).

As evidências citadas, exceto pelos itens v e vi, suportariam a hipótese de que a cooperatividade da ligação de Tm ao filamento de actina é promovida pela polimerização da Tm, que induziria a ligação de outra molécula de Tm aos 7 monômeros de actina vizinhos no filamento (a “unidade cooperativa” de Hill, 1980). Isso explicaria o fato de não ocorrer a formação de lacunas (*gaps*) entre as moléculas de Tm ligadas ao filamento de actina, o que é confirmado pela estequiometria 1:7 Tm:actina (Potter, 1974; Potter & Gergely, 1974). Essas evidências também poderiam explicar o aumento da afinidade de Tm para actina promovido pela ligação de Tn, considerando-se que a ligação de Tn induz a polimerização de Tm em ausência de actina.

Em contraste, essa hipótese não explica as seguintes questões: i) Porque o complexo TnI-TnC-T2 também promove um aumento na ligação de Tm não polimerizável à actina (Heeley *et al.*, 1987 e Figura 16, géis 13, 19,

25 e 31 desta tese), mesmo não possuindo a região da TnT que se sobrepõe à região de interação cabeça-cauda da Tm (T1)? ii) Porque a cooperatividade da ligação Tm-actina é pouco afetada pelo aumento da força iônica para 300 mM de KCl (Hill *et al.*, 1992) quando se sabe que, nessas condições, Tm encontra-se na forma monomérica (Sousa & Farah, 2002 e Figuras 25A e 26 desta tese)? iii) Porque a cooperatividade da ligação de Tm, polimerizável (Hill *et al.*, 1992) ou não (Mak *et al.*, 1983), à actina não aumenta em presença de Tn? Alguns autores sugerem que a ligação de Tm altera a estrutura da actina adjacente no filamento fino, provendo o efeito cooperativo (Mak *et al.*, 1983, Butters *et al.*, 1993). Hill e colaboradores (1992) sugerem que as interações Tm-Tm (cabeça-cauda) podem ser muito diferentes em presença e na ausência de actina. Para avaliar o efeito da ligação de Tn na polimerização de Tm e o efeito da polimerização da Tm sobre a cooperatividade de sua ligação com actina seria importante investigar melhor as interações cabeça-cauda, responsáveis pela polimerização da Tm.

1.5.3. A Ligação de Tm modula a Atividade ATPásica da Actomiosina

O modelo do bloqueamento estérico (Huxley, 1972) parte da premissa de que o domínio motor da miosina e Tm competem por um mesmo sítio (ou sítios próximos) de ligação na actina, o que é consistente com o fato de que tanto Tm quanto S1 (fragmento contendo o domínio motor da miosina) protegem resíduos de Lys em comum no filamento de actina (Szilagyi e Lu, 1982). O modelo postula que, no estado desligado, Tm bloqueia a ligação de S1 à actina, que pode ser medido pelas alterações na atividade ATPásica da actomiosina (Figura 5). Entretanto, Tm pode ativar ou inibir a atividade ATPásica da actomiosina em, respectivamente, altas ou baixas razões de miosina:actina (Eaton *et al.*, 1975). Esse efeito duplo não é compatível com o modelo do bloqueamento estérico na sua forma mais simples, no qual a atividade ATPásica da actomiosina assumiria valores máximos em ausência de Tm.

Figura 5: Esquema das mudanças estruturais e químicas envolvidas na geração de força pela actomiosina. A troca de ADP por ATP causa a dissociação de S1 do filamento de actina (1). Após a hidrólise de ATP, S1 ainda ligado aos produtos de hidrólise, recupera fracamente sua afinidade por actina(2) e posteriormente liga-se fortemente à actina, perdendo sua afinidade por P_i (3). A dissociação de P_i promove mudanças conformacionais em S1 que iniciariam a geração de força (Power Stroke) (4). A liberação de ADP promove a translocação do filamento de actina e a fenda de ligação do nucleotídeo em S1 abre-se permitindo a ligação de ATP e o início de um novo ciclo (1).

Além disso, estudos demonstraram que a ligação de cálcio afeta a cooperatividade da ligação de S1 ao filamento fino regulado, que não ocorre em ausência de Tm (Greene & Eisenberg, 1980, Trybus & Taylor, 1980).

Finalmente, ao contrário do esperado para o modelo do bloqueamento estérico, a Tm aumenta a afinidade de miosina à actina ao invés de diminuí-la. Ainda, a ligação de miosina aumenta a afinidade de Tm pela actina, ao invés de diminuí-la (Eaton, 1976, Greene & Eisenberg, 1980, Geeves & Halsall, 1986; Cassel & Tobacman, 1996).

1.5.4. Modelo de Hill

Visando explicar a cooperatividade da ligação de S1 à actina em presença de Tm-Tn (Greene & Eisenberg, 1980, Trybus & Taylor, 1980), Hill e colaboradores propuseram um modelo no qual o filamento regulado é composto de um arranjo linear de unidades cooperativas ($Tm.Tn.Actina_7$) (Hill *et al.*, 1980). Cada unidade pode existir em dois estados, estado 1 (*on*) e estado 2 (*off*), sendo que o estado 1 apresenta alta afinidade tanto por cálcio como por miosina. A diferença estrutural entre os dois estados

continuaría relacionada com o posicionamento da Tm no filamento de actina, conforme foi inicialmente proposto no modelo do bloqueamento estérico. Quando ligado ao filamento regulado, cálcio promoveria a ligação forte de miosina à actina. A diferença básica entre o modelo de Hill e o modelo de Huxley seria que o reposicionamento da tropomiosina acarretaria na ligação forte S1-actina, não apenas por liberar estericamente os sítios de ligação de S1 à actina, mas por gerar um estado do filamento (*on*) de alta afinidade para S1 (que coincidiria com o estado de alta afinidade para cálcio). Isso explicaria porque a Tm pode ativar a atividade ATPásica da miosina. A cooperatividade da associação entre actina e S1 poderia ser explicada pela estequiometria 1:1:7 Tm:Tn:actina (unidade cooperativa), na qual a ligação de cálcio a cada unidade modificaria o estado de sete actinas, e o estado de cada unidade cooperativa afetaria os estados das unidades vizinhas (para revisão vide Chen *et al.*, 2001).

1.5.5. Modelo Cinético

Em 1982, estudos de Chalovich e Eisenberg demonstraram que a afinidade de S1 para o filamento regulado não varia com a presença de cálcio, mesmo em condições nas quais a atividade ATPásica é sensível aos níveis de cálcio. Esses resultados pareceram conflitar com o modelo de Hill *et. al* (1980) e do bloqueamento estérico (Huxley, 1972, Haselgrove, 1972, Parry & Squire, 1973), no qual a chave para a regulação da ligação de miosina ao filamento regulado seria a diferença entre as afinidades dos dois estados do filamento regulado por miosina. Chalovich e Eisenberg sugeriram que cálcio exerce um controle sobre a cinética da transição ligação fraca→ligação forte de S1 ao filamento fino regulado (passo 4 da Figura 5). Logo, nesse modelo, o passo regulado pela Tm-Tn +/- Ca^{2+} não seria a ligação da miosina à actina propriamente dita mas a transição entre dois estados conformacionais nos quais a miosina já se encontraria ligada à actina. Geeves tentou reinterpretar a cooperatividade da ligação de S1, conciliando os resultados de Chalovich e Eisenberg com os modelos anteriores, considerando inicialmente dois (Geeves & Halsall, 1987; McKillop

& Geeves, 1991) e posteriormente três estados para o filamento fino (McKillop & Geeves, 1993, Geeves & Lehrer, 1994). Nestes últimos estudos, o filamento fino poderia existir, não em dois, mas em três estados: (1) o estado bloqueado (*blocked*) no qual poderiam ocorrer apenas ligações fracas e não específicas de miosina, sendo a atividade ATPásica muito baixa; (2) o estado desligado (*closed*) no qual interações específicas entre actomiosina ocorrem (*A state*), porém com baixa afinidade sendo a atividade ATPásica ainda baixa; (3) o estado ligado (*open*) no qual é permitida uma forte interação estereoespecífica entre miosina e actina (*estado R*), havendo alta atividade ATPásica. O papel do cálcio seria deslocar o equilíbrio do estado bloqueado para o estado fechado e do fechado para o aberto (Figura 6). A ligação fraca de S1 (*estado A*) induziria a transição do filamento fino para o estado aberto que permitiria a ligação forte de S1 (*estado R*).

1.5.6. Modelos Atômicos da Interação Actomiosina

Em 1993, Rayment e colaboradores construíram um modelo atômico para a interação actomiosina (Rayment *et al.*, 1993b) baseado nas estruturas atômicas da actina (Kabsh *et al.*, 1990) e de S1 (Rayment *et al.*, 1993a), no modelo atômico do filamento fino (Holmes *et al.*, 1990) e no mapa eletrônico de baixa resolução do filamento de actina decorado com S1 (Milligan & Flicker, 1987). Nesse modelo, os sítios de ligação de actina e do nucleotídeo à miosina se comunicam por uma fenda em S1 (Figura 6). Essa fenda encontra-se aberta quando ATP ou ADP+Pi estão ligados à miosina (*estado A*) e fechada quando ADP está ligado ou o sítio encontra-se vazio (*estado R*). Quando essa fenda está aberta, S1 liga-se à actina com baixa afinidade (*estado A*). A ligação de ATP promove a abertura da fenda e a dissociação da ligação S1-actina (Figura 5, passo 1). Em 1995, Holmes propôs um modelo (Figura 6) correlacionando os dois estados conformacionais da miosina (A e R) com os três estados do filamento fino regulado baseados no posicionamento da tropomiosina (bloqueado, desligado e ligado), sugeridos no modelo de Geeves.

Estudos de difração de raio-x do filamento fino regulado demonstraram modificações no padrão de difração da actina em função da ligação de cálcio (Matsubara *et al.*, 1984; Wakabayashi *et al.*, 1985; Wakabayashi *et al.*, 1988). Essas mudanças estruturais no filamento fino também foram observadas quando foram analisadas fibras musculares estendidas até o limite de comprimento do sarcômero (Figura 3), no qual a ausência de sobreposição dos filamentos impede a ligação actomiosina (Yagi & Matsubara, 1988; Yagi & Matsubara, 1989; Yagi, 1991). Recentes estudos da estrutura do filamento fino regulado (+/- cálcio), através de microscopia eletrônica, demonstraram que a ligação de cálcio causa um movimento azimutal de Tm de ~25° e que a ligação de S1 completa a exposição dos sítios de ligação de actina por acentuar esse movimento em mais 10° (Vibert *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999). Vários estudos demonstram

que a ligação de Tm ou S1 à actina promove a ligação de S1 ou Tm, respectivamente, à actina (Eaton, 1976; Greene & Eselberg, 1980; Geeves & Halsall, 1986; Cassel & Tobacman, 1996), o que sugere a existência de uma interação direta entre essas duas proteínas ou que a ligação promova mudanças conformacionais no filamento de actina.

1.5.7. O Modelo de Tobacman

Em 2000, Tobacman e Butters propuseram um modelo considerando as mudanças estruturais observadas no filamento fino. Nesse modelo a ligação de Tm em uma (quarta) posição intermediária *closed-blocked* promoveria uma mudança conformacional no monômero de actina ligado à Tm, aumentando a afinidade de miosina para a actina em questão. A ligação de miosina promoveria a mesma mudança conformacional na actina, induzindo a ligação de Tm para a posição intermediária *closed-blocked*. Esse efeito duplo de aumento de afinidade seria o responsável pela cooperatividade da ligação de miosina ao filamento de actina regulado por Tm. O cálcio atuaria em um primeiro estágio, iniciando o processo ao promover um deslocamento inicial da tropomiosina para a posição intermediária (Tobacman & Butters, 2000). Assim como no modelo de Hill, o modelo de Tobacman considera que a polimerização da Tm deve exercer um papel importante na cooperatividade da ligação de S1 ao filamento regulado.

1.6. AS EVIDÊNCIAS GERAM ALGUNS QUESTIONAMENTOS...

Se a ligação de cálcio à TnC promove, em última instância, o reposicionamento da tropomiosina ao longo do filamento fino, quais mudanças conformacionais estariam envolvidas nesse reposicionamento? Apenas uma mudança de afinidade de Tn por actina-Tm estaria modulando esse reposicionamento?

É interessante notar que Fisher e colaboradores (1996) não observaram grandes alterações nas afinidades de Tm-Tn à actina em função

da adição de cálcio ao sistema. O estudo da contribuição do cálcio para a afinidade entre as proteínas do filamento fino (i.e. construção de um ciclo termodinâmico para essas interações – vide Discussão) poderia indicar uma resposta.

Seria a polimerização de Tm responsável pela cooperatividade da ligação de Tm à actina? Nesse caso, por que a ligação de Tn não afeta muito a cooperatividade da ligação Tm-actina (Hill *et al.*, 1992)? Estaria a Tm polimerizada nos diferentes estados do filamento regulado?

Finalmente, a difícil interpretação de todas essas interações cooperativas entre as proteínas envolvidas na regulação da contração muscular faz com que ainda não se tenha construído um modelo refinado para explicar esse fenômeno em detalhes.

De fato, existe pelo menos uma constante de afinidade publicada para cada interação entre as proteínas do filamento fino. O problema é que esses estudos não forneceram valores para essas afinidades em uma mesma condição (principalmente força iônica) ou para proteínas de um mesmo organismo. Não se sabe, quantitativamente, como cada variação nas condições influencia cada interação estudada, o que dificulta a comparação e interpretação de dados obtidos em estudos diferentes, realizados em condições variadas.

Um de nossos objetivos é normalizar condições para estudar as interações do filamento fino de músculos esqueléticos, partindo das informações obtidas até então sobre o comportamento de cada proteína. A normalização incluiria:

(1) condições experimentais: força iônica, pH e temperatura; (2) utilização de proteínas de um mesmo sistema (músculo esquelético de galinha); (3) obtenção dos principais dados a partir de um mesmo procedimento experimental, através do monitoramento de sondas pseudo-intrínsecas à Tm, posicionadas em uma mesma região da proteína, distante da região de regulação pelo cálcio.

Três dos mutantes construídos e caracterizados nesse projeto (Y261W, Q263W e A269W, polimerizáveis ou não) funcionam como ferramenta para o estudo quantitativo das principais interações entre actina, Tm e Tn, através da fluorescência da sonda 5-hidroxitriptofano, e podem auxiliar na compreensão da termodinâmica das mudanças entre os estados do filamento fino. Em particular, a sonda na posição 269 permite investigações inéditas da polimerização da tropomiosina em ausência e na presença de outras proteínas do filamento fino.

1.7. A FERRAMENTA PARA MEDIDAS: FLUORESCÊNCIA DE ANÁLOGOS DE TRIPTOFANO

O triptofano apresenta um máximo de absorção a 280 nm e o máximo de emissão entre 320 nm e 350 nm, sendo que tanto a intensidade e o tempo de vida do sinal quanto o próprio perfil do espectro sofrem variações com as características do solvente (para revisão vide Callis, 1997). Isso é particularmente útil no estudo de mudanças conformacionais e interações entre proteínas, onde o triptofano sofre mudanças em seu ambiente químico. Contudo, esse tipo de análise é limitado pela quantidade de triptofanos existente na sequência primária da proteína a ser estudada e de outras proteínas existentes no sistema de estudo.

Os análogos de triptofano, 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano, apresentam propriedades ópticas diferentes das do triptofano, sendo que ambos podem ser excitados por absorção de luz na faixa de 310-315 nm enquanto o triptofano já não absorve mais em comprimentos de onda maiores que 300 nm (Figura 7). O 5-hidroxitriptofano apresenta uma maior intensidade de fluorescência que o 7-azatriptofano, quando incorporado em proteínas. O 7-azatriptofano, porém, é capaz de apresentar grandes aumentos na intensidade de fluorescência e grandes deslocamentos no $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em função de alterações na hidrofobicidade do ambiente, podendo ser uma ferramenta muito válida para estudos de ligação (English & Petrich, 1993, Das *et al.*, 1999). O 7-azatriptofano tem seus espectros de

absorção e emissão deslocados em 10 e 46 nm, respectivamente, quando comparados com o triptofano (Chen *et al.*, 1993).

Figura 7: Espectros de emissão e de excitação do triptofano e seus análogos (obtidos experimentalmente em nosso laboratório) e suas estruturas químicas. Na legenda: W = triptofano, 7NW = 7-azatriptofano, 5OHW = 5-hidroxitriptofano, x = espectro de excitação (entre parênteses λ de emissão), em = espectro de emissão (entre parênteses λ de excitação). A: Espectros demonstrando a fluorescência relativa de soluções de $1\mu\text{M}$ de cada aminoácido. B: Espectros normalizados.

A idéia de promover, *in vivo*, a incorporação de análogos de triptofano em proteínas não é nova. Na década de 50, já havia sido relatada a incorporação de triptazano em proteínas, utilizando uma cepa de *E.coli* auxotrófica para triptofano (Brawerman e Ycas, 1957). Nesse estudo as bactérias foram cultivadas em meio mínimo até a total depleção do triptofano, que era evidenciada pela parada no crescimento das células. A retomada de um crescimento limitado, decorrente da adição de triptazano ao meio, evidenciava a incorporação do análogo nas proteínas, que era confirmada pelo deslocamento do espectro de UV das proteínas. Os autores sugeriram que a incorporação do análogo comprometia a estrutura nativa da proteína e, por esse motivo, o crescimento bacteriano cessava após a duplicação do DNA. Essa observação foi consistente com estudos anteriores que demonstraram que a presença de triptazano no meio impedia que o triptofano livre fosse totalmente utilizado em culturas de levedura, indicando

um efeito direto do triptazano no bloqueamento da síntese de proteínas (Halvorson *et al.*, 1955).

Nesse mesmo período, estudos analisaram o efeito da incorporação de vários análogos triptofano, inclusive do 7-azatriptofano, na atividade de diversas enzimas de *E.coli* e constataram que algumas enzimas são inativadas pela incorporação dos análogos, por exemplo, a β -galactosidase foi inativada pela incorporação de 7-azatriptofano (Pardee & Prestidge, 1958). Os autores monitoraram a fluorescência do ácido antranílico acumulado nas células e concluíram que 7-azatriptofano e 4-metiltryptofano bloqueiam a síntese do triptofano em um passo anterior à formação desse composto.

Em 1968, Schlesinger demonstrou que a incorporação de 7-azatriptofano e triptazano não interferiam na atividade da fosfatase alcalina. Esse estudo deixou claro que nem todas as enzimas são afetadas pela incorporação de análogos de triptofano, sendo necessário que se realize uma caracterização da proteína modificada. Os autores compararam os espectros de absorção dos análogos quando livres, incorporados na proteína enovelada e incorporados na proteína desnaturada (em meio a 6M de guanidina-HCl ou em etanol). Como resultado foi observado que, enquanto o espectro do triptazano não era influenciado por mudanças na polaridade do meio, o 7-azatriptofano incorporado na proteína apresentou um deslocamento de seu espectro para comprimentos de onda maiores, quando em presença de guanidina, e menores, quando em etanol. Esse foi o primeiro estudo que propôs a utilização do 7-azatriptofano, incorporado em proteínas, como uma sonda fluorescente, intrínseca à proteína.

O 5-hidroxitriptofano já havia sido proposto como sonda alternativa para o estudo de proteínas (Beechem & Brand, 1986). Porém a utilização do 5-hidroxitriptofano com uma ferramenta eficiente para estudo de proteínas foi demonstrada pela primeira vez em 1992, quando Hogue e colaboradores promoveram a incorporação de 5-hidroxitriptofano em um mutante sitio-específico de proteína recombinante (oncomodulina), expresso em uma

cepa de *E.coli* auxotrófica para triptofano. A estratégia de inserir, através de engenharia genética, uma sonda de fluorescência na proteína produzida *in vivo* ofereceu uma nova perspectiva para os estudos de fluorescência de análogos de triptofano incorporados em proteínas. Nesse trabalho, a investigação da ligação da oncomodulina marcada a seu anticorpo demonstrou a viabilidade de se estudar especificamente a fluorescência de uma proteína contendo 5-hidroxitriptofano, mesmo quando em presença de outras proteínas contendo triptofano.

Em 1995, Soumillion e colaboradores utilizaram o fenômeno de supressão da fluorescência do 7-azatriptofano, quando protonado em baixos pHs, para monitorar a acessibilidade de quatro triptofanos presentes na lisozima do fago λ . Dessa forma a exposição do 7-azatriptofano pôde ser determinada pela medida da supressão de sua fluorescência, devido à sua protonação, promovida por sua acessibilidade ao meio ácido. Essa é uma abordagem análoga à utilizada em estudos da supressão de fluorescência do triptofano pelos íons iodeto ou acrilamida (Eftink & Ghiron, 1976, Lehrer & Leavis, 1978).

Nesta tese, caracterizamos vários mutantes de tropomiosina com triptofano, 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano localizados em várias posições da cadeia polipeptídica. Inserimos o 5-hidroxitriptofano em uma região da Tm que interage com várias proteínas. Demonstramos que a fluorescência do 5-hidroxitriptofano, inserido em diferentes posições dessa região, funciona como uma ferramenta capaz de viabilizar o monitoramento da ligação de apenas uma proteína à Tm, mesmo quando na presença das outras proteínas ligantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MUTAGÊNESE

Os oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência do pET MASTm para codificar tropomiosina com fusão dipeptídica e pET nTm para codificar tropomiosinas sem fusão (Monteiro *et al.*, 1994) (Figura 8).

Figura 8: Mapa de restrição do pET-MASTm.

a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a		
M	D	A	I	K	K	K	M	Q	M	L	K	L	D	K	15	
ATG	GAT	GCC	ATC	AAG	AAA	AAG	ATG	CAG	ATG	CTG	AAA	CTG	GAC	AAG	45	
b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b		
E	N	A	L	D	R	A	E	Q	A	E	A	D	K	K	30	
GAG	AAT	GCC	TTG	GAC	AGA	GCC	GAG	CAA	GCC	GAA	GCG	GAC	AAG	AAG	90	
c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c		
A	A	E	E	R	S	K	Q	L	E	D	E	L	V	A	45	
GCA	GCG	GAG	GAG	AGG	AGC	AAG	CAG	CTG	GAG	GAC	GAG	CTG	GTG	GCT	135	
d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d		
L	Q	K	K	L	K	G	T	E	D	E	L	D	K	Y	60	
CTG	CAA	AAG	AAG	CTG	AAG	GGC	ACT	GAG	GAT	GAG	CTG	GAC	AAA	TAC	180	
e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e		
S	E	S	L	K	D	A	Q	E	K	L	E	L	A	D	75	
TCC	GAG	TCC	CTT	AAA	GAT	GCA	CAG	GAA	AAG	TTG	GAA	CTG	GCT	GAC	225	
f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f		
K	K	A	T	D	A	E	S	E	V	A	S	L	N	R	90	
AAA	AAG	GCC	ACA	GAT	GCT	GAG	AGT	GAA	GTA	GCT	TCC	CTG	AAC	AGA	270	
g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		
R	I	Q	L	V	E	E	E	L	D	R	A	Q	E	R	105	
CGC	ATC	CAA	CTG	GTT	GAG	GAA	GAG	TTG	GAT	CGG	GCT	CAG	GAG	CGC	315	
a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a		
L	A	T	A	L	Q	K	L	E	E	A	E	K	A	A	120	
TTG	GCT	ACT	GCC	CTG	CAG	AAG	CTG	GAG	GAG	GCT	GAG	AAG	GCT	GCA	360	
b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b		
D	E	S	E	R	G	M	K	V	I	E	N	R	A	Q	135	
GAT	GAG	AGT	GAA	AGA	GGA	ATG	AAG	GTC	ATT	GAA	AAT	AGA	GCC	CAG	405	
c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c		
K	D	E	E	K	M	E	I	Q	E	I	Q	L	K	E	150	
AAG	GAT	GAA	GAG	AAG	ATG	GAA	ATC	CAA	GAG	ATC	CAG	CTT	AAA	GAA	450	
d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d		
A	K	H	I	A	E	E	A	D	R	K	Y	E	E	A	165	
GCT	AAG	CAC	ATT	GCT	GAA	GAG	GCT	GAC	CGC	AAG	TAT	GAA	GAG	GCG	495	
e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e		
A	R	K	L	V	I	I	E	G	D	L	E	R	A	E	180	
GCT	CGT	AAG	CTC	GTG	ATC	ATT	GAG	GGT	GAC	CTG	GAG	CGG	GCT	GAG	540	
f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f		
E	R	A	E	L	S	E	S	K	C	A	E	L	E	E	195	
GAG	CGT	GCT	GAA	CTA	TCA	GAA	AGC	AAA	TGT	GCT	GAG	CTT	GAA	GAG	585	
g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g		
E	L	K	T	V	T	N	N	L	K	S	L	E	A	Q	210	
GAG	TTG	AAA	ACT	GTG	ACC	AAC	AAC	CTG	AAG	TCG	CTG	GAG	GCT	CAG	630	

a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a		
A	E	K	Y	S	Q	K	E	D	K	Y	E	E	E	E	I	225
GCT	GAG	AAG	TAC	TCG	CAG	AAA	GAA	GAC	AAA	TAT	GAA	GAG	GAG	ATT	675	
b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b		
K	V	L	T	D	K	L	K	E	A	E	T	R	A	E	240	
AAA	GTT	CTA	ACT	GAC	AAA	CTG	AAG	GAG	GCT	GAG	ACC	CGT	GCT	GAA	720	
c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c		
F	A	E	R	S	V	T	K	L	E	K	S	I	D	D	255	
TTT	GCT	GAG	AGG	TCA	GTA	ACC	AAG	CTG	GAG	AAG	AGC	ATT	GAT	GAT	765	
d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d		
L	E	D	E	L	Y	A	Q	K	L	K	Y	K	A	I	270	
CTA	GAA	GAT	GAG	CTT	TAT	GCT	CAG	AAA	CTG	AAG	TAC	AAA	GCC	ATC	810	
e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e		
S	E	E	L	D	H	A	L	N	D	M	T	S	I	*	284	
AGC	GAG	GAG	CTG	GAC	CAT	GCT	CTC	AAC	GAT	ATG	ACT	TCC	ATA	TAA	855	

Figura 9: Sequência de cDNA e tradução de aminoácidos de α -tropomiosina de músculo esquelético (fast-twitch) de galinha (Gooding et al., 1987). O codon de terminação é indicado pelo símbolo (*). As letras a,b,c,d,e,f,g indicam a posição prevista para os aminoácidos na estrutura "coiled-coil" e o padrão de cores indica as características químicas típicas para resíduos que ocupam essas posições, sendo que a cor vermelha indica resíduos apolares, a cor azul, resíduos polares com carga e a cor preta, resíduos polares sem carga.

OLIGO	SEQUÊNCIA 5' -> 3'
BstI (+)	AAGAGATCCAGCTTAAAGAAG
Y261W(-)	GTTTCTGAGCCCAAAGCTCATCTTC
A262W(-)	CTTCAGTTTCTGCCAATAAAGCTC
Q263W(-)	TTCAGTTTCCAAGCATAAAGCTC
L267W(-)	TGATGGCTTTCCACTTCAGTTTC
A269W(-)	CCTCGCTGATCCATTTGTACTTC
EcoRI (-)	CATTAACCTATAAAAAATAGGCG
Y261W(+)	AGATGAGCTTTGGGCTCAGAAAC
A262W(+)	GAGCTTTATTGGCAGAAACTGAAG
Q263W(+)	AGCTTTATGCTTGGAAACTGAAG
L267W(+)	AAACTGAAGTGGAAAGCCATCAG
A269W(+)	GAAGTACAAATGGATCAGCGAGG

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para mutagênese. Os nomes contêm as seguintes informações: aminoácido original / posição na proteína/ aminoácido mutado (fita correspondente no pET).

O protocolo de mutagênese consiste de duas etapas, utilizando quatro oligonucleotídeos conforme é esquematizado na Figura 10.

Figura 10: Representação esquemática da mutagênese do cDNA da Tm já inserido no vetor, o pET MASTm.

Como a figura demonstra, a primeira etapa consiste em duas reações isoladas para cada mutação. Para cada reação, foram preparados 50 μ L do meio reacional contendo 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 20 pmoles de cada dNTP, 2 pmoles do pET MASTm, 5 μ L de 10x Thermopol Buffer (composição final: KCl a 10 mM, Tris-HCl pH 8,8 a 20 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 10 mM, Mg_2SO_4 a 2 mM e 1% de Triton X-100), 1 unidade de Deep Vent Polimerase e água Milli-Q para o volume final. Nesta primeira etapa, o DNA foi desnaturado por 5 min a 94°C e submetido a 25 ciclos de 30 seg de desnaturação a 95°C/ 30 seg de hibridização a 58°C/ 30 seg de extensão a 72°C, e finalizado por 7 min de extensão a 72°C. O equipamento utilizado foi o Termociclador da Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400.

A segunda etapa correspondeu à combinação dos dois produtos obtidos na etapa anterior, desnaturação, reenovelamento, extensão e amplificação do inserto formado pelos dois fragmentos. Nessa etapa, a concentração desses fragmentos foi estimada visualmente em gel de agarose (1%) quando comparada com o produto de digestão BstEII/EcoRI do pET MASTm com concentração conhecida. Foi utilizado um volume de 50 μ L de reação: 5-10 μ L de cada um dos dois produtos de PCR purificado (Etapa

1) que contém a mutação, 20 pmoles de cada dNTP, 100 nmoles de Mg_2SO_4 , 10 pmoles de BstEII(+), 10 pmoles de EcoRI(-), 1 unidade de Deep Vent Polimerase, 5 μ L de 10x Thermopol Buffer e água Milli-Q para o volume final. O meio reacional, sem os oligos, foi desnaturado por 5 min a 94°C seguido de 5 min de hibridização a 25°C (nesse passo a T_m , correspondente apenas à zona de sobreposição dos pontos de mutação, é muito baixa) e de extensão do inserto a 72°C por 5 min, para a formação de um molde totalmente dupla fita. Em seguinte, os oligos BstEII(+) e EcoRI(-) foram adicionados e o inserto foi amplificado por 30 ciclos (nesse caso, 25 ciclos forneciam um rendimento muito baixo) de 30 seg de desnaturação a 95°C/ 30 seg de hibridização a 58°C/ 30 s de extensão a 72°C, finalizando com 7 min de extensão a 72°C.

Utilizou-se o programa OLIGO 4.0 para analisar temperatura de hibridização (T_m), formação de dímeros, e falsos pareamentos nas fitas codificadora (+) e complementar (-) dos oligonucleotídeos desenhados (Figura 9 e Tabela 2). Essa análise objetivou otimizar as condições da mutagênese por PCR, já que os oligonucleotídeos de um mesmo meio reacional devem ter T_m muito próximas entre si, para que se possa estabelecer a temperatura de hibridização ideal para o experimento. Para efetuar cada mutação, utilizamos quatro oligos, sendo que os dois que não envolviam a mutação - (EcoRI (-) e BstEII (+) - foram utilizados para todos os mutantes, a posição de hibridização desses dois oligos nos permitiu a obtenção do produto de PCR contendo os respectivos sítios de restrição (EcoRI e BstEII, Figura 10).

Os produtos de PCR correspondendo ao cDNA da T_m entre os sítios BstE II e EcoRI foram purificados por eletroforese em gel de agarose 0,8% com TAE (40 mM de Tris-Acetato e 1 mM de EDTA) a ~5 mg/L de brometo de etídio. Após eletroforese, o gel é cortado para formar um pequeno poço, alguns milímetros abaixo da banda, que é preenchido com TAE. O sistema de eletroforese é ligado novamente e a migração do DNA é monitorada por UV até que a banda de interesse atinja o poço. Após desligar o sistema, o

DNA é retirado do poço com pipeta. O brometo de etídio é removido com 2 a 3 extrações com o butanol equilibrado em água (cada extração utiliza o mesmo volume inicial de amostra). À fase aquosa recolhida são adicionados: acetato de sódio (pH 5,2) para uma concentração de 300 mM e etanol para 70% (aproximadamente o dobro do volume da mistura). O DNA é precipitado por 12h a -20°C e a mistura centrifugada a $14000\times g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante é descartado e o precipitado é lavado com 1 mL de etanol a 70% gelado e centrifugado a $14000\times g$ por 10 min (temperatura ambiente). O sobrenadante é descartado, o DNA é seco a vácuo, suspenso em 20 μL de TE e estocado a -20°C .

Os insertos purificados, assim como o vetor (pET MASTm), foram digeridos com BstEII-EcoRI. Foram utilizadas as seguintes condições para a digestão: aproximadamente 5 μg de DNA (concentrações dos insertos foram estimadas em gel de agarose), 2 μL de EcoRI (20000 unidades/mL), 10 μL de tampão para EcoRI (para concentrações finais de NaCl a 50 mM, Tris-HCl a 100 mM, MgCl_2 a 100 mM e Triton X-100 a 0,025%, pH 7,5) e água Milli-Q até 98 μL .

O DNA foi digerido com EcoRI por 3 h a 37°C e a enzima foi inativada por incubação a 65°C por 20 min. A seguir foram adicionados ao sistema 2 μL da enzima BstEII e a reação foi incubada em 60°C por 3 h. Após a digestão, a banda maior do pETMASTm foi purificada para eliminar o fragmento menor correspondente ao fragmento do cDNA da Tm do tipo selvagem, porém os produtos de PCR (insertos) foram precipitados com etanol em 300 mM de acetato de sódio pH 5,2.

A ligação do inserto ao vetor foi catalisada pela enzima T4 DNA ligase (NEB). Foram utilizados 10 μL reação contendo 1 μL da enzima (400.000 unidades/mL), 1 μL de 10x tampão para ligase com ATP (500 mM de Tris-HCl pH 7,8, 100 mM de MgCl_2 , 200 mM de ditioneitol (DTT), 10 mM de ATP, 500 $\mu\text{g/mL}$ de BSA) e o pET MASTm e o inserto. Quantidades do pET MASTm e do inserto digeridos foram adicionadas de maneira que a concentração do inserto fosse, pelo menos, o dobro da concentração do pET

em solução, após comparação das bandas em gel de agarose. O tempo de reação foi de 12-16 horas, a 16°C.

2.2. TRANSFORMAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

As transformações foram realizadas de acordo com o método modificado de Mandel & Higa (1970). Utilizou-se a cepa *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Studier *et al.*, 1990) para expressão de tropomiosina com triptofano e a cepa *E.coli* CY(DE3)pLysS (Drapeau *et al.*, 1968; Quaggio *et al.*, não publicado, Farah & Reinach, 1999) para incorporação de análogos de triptofano.

2.3. PREPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram preparados em pequena escala pelo método de TELT (2,5 M de LiCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 4% v/v de Triton X100 2 62,5 mM de EDTA) descrito por He e Kaderbhai (1990), utilizando-se cerca de seis clones isolados de HMS 174 (Studier *et al.*, 1990), transformada com o pET MASTm contendo a mutação. A seleção dos clones foi feita através de mini indução da expressão da proteína.

A preparação do plasmídeo em larga escala foi realizada utilizando a cepa de *E.coli* HMS 174 (Studier *et al.*, 1990) contendo o plasmídeo mutado que apresentou melhor mini-indução. O DNA foi extraído pelo método de lise alcalina e purificado por gradiente de césio, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

2.4. SEQÜENCIAMENTO

Os DNAs dupla fita mutados A262W e Y267W foram seqüenciados pelo método de Sanger *et. al* (1977) utilizando os oligos identificados na Tabela 3.

Oligo	Posição no cDNA da Tm
T7	Antes do início do cDNA
DC55	154
DC100	287
VC129	376
Bstell(+)	436
CA190	559

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para reações de seqüenciamento

Os demais DNAs foram seqüenciados por seqüenciador automático, ABI PRISM™ 377 DNA SEQUENCER, da Perkin Elmer utilizando o kit “Ready Reaction” da ABI. A reação foi feita de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (4 µL de Dye terminator, 250 ng do pET a ser seqüenciado, 1,6 pmoles do primer e H2O Milli-Q qsp 10 µL), nas seguintes condições de PCR (25 ciclos): 10 minutos de desnaturação a 96°C, 5 segundos de hidridização a 50°C e 4 minutos de extensão a 60°C

2.5. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

2.5.1. Com triptofano

A expressão das tropomiosinas foi induzida em *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Studier *et al.*, 1990) transformada pelos vetores de expressão com as mutações e crescida em meio rico (2xTY), sendo seguidas as condições descritas por Monteiro e colaboradores (1994).

2.5.2. Com incorporação de análogos de triptofano

Tropomiosinas com 5-hidroxitriptofano incorporado foram produzidas utilizando *E.coli* CY(DE3)LysS, conforme descrito por Farah & Reinach (1999). Após coletados 1 mL da cultura de células, antes e após a indução da expressão da proteína, as amostras são centrifugadas à temperatura ambiente a 1200 rpm por 15 min. Cada pellet é ressuspensionado em 150 µL de água e as células são lisadas pela adição de 50 µL de 5x tampão de amostra

(40% v/v de glicerol, 8% p/v de SDS, 200 mM de Tris-HCl pH 6,8, 400 mM de β -mercaptoetanol, 0,4% de azul de bromofenol) durante 5 min a 100°C. A seguir, as amostras são submetidas a análise por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

2.6. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Tropomiosina: Os mutantes de tropomiosina foram purificados seguindo o protocolo descrito por Monteiro e colaboradores (1994) com as modificações introduzidas por Farah & Reinach (1999). Depois da purificação, as proteínas foram dialisadas contra tampão de fluorescência (25 mM MOPS pH7,0, 1 mM DTT, 5 mM $MgCl_2$ e 50 mM NaCl).

Actina: A F-Actina é preparada a partir de pó-cetônico de músculo peitoral de galinha como descrito por Pardee & Spudich (1982) com algumas modificações descritas por Quaggio e colaboradores (1993).

Troponina: A TnC recombinante, de músculo de galinha, foi expressa segundo Quaggio e colaboradores (1993) e purificada segundo Fujimori e colaboradores (1990). O mutante com deleção do fragmento T2, TnT 157-263, foi purificado conforme descrito por Malnic e colaboradores (1998). A isoforma 3 de TnT (TnT-3, Smillie *et al.*, 1988) foi expressa e purificada como descrito por Farah e colaboradores (1994). A purificação dos demais fragmentos recombinantes de TnT (TnT1-191, TnT77-191, TnT77-157, TnT1-76) assim como a produção peptídeo sintetizado, TnT158-191, são descritos por Oliveira e colaboradores (2000). A purificação da TnI foi feita segundo o método descrito por Quaggio e colaboradores (1993). O protocolo para a reconstituição do complexo terciário é descrito em detalhes por Farah e colaboradores (1994).

2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de actina foi determinada por espectofotometria de absorção a 290 nm, sendo utilizado o coeficiente de extinção molar de 0,608 (mg/mL) (Johnson & Taylor, 1978), subtraindo-se o valor da absorbância a

320 nm (espalhamento de luz). A concentração dos mutantes de tropomiosina foi determinada seguindo no protocolo de Lowry modificado por Hartree (1972), utilizando ASTm como padrão ($\epsilon_{278}^{1\%} = 2,9$), conforme descrito anteriormente (Monteiro *et al.*, 1994).

2.8. ENSAIOS DE LIGAÇÃO À ACTINA/TROPONINA

Os ensaios de ligação à actina e troponina consistiram na mistura de Tm (+/-Tn, +/-Ca²⁺) e actina, seguida de ultracentrifugação (80000 rpm por 20min, a 25°C). Os experimentos foram realizados conforme descrito por Sousa & Farah (2002), utilizando ultracentífuga Beckman TDX – 120000. Amostras da mistura (antes da ultracentrifugação) e do sobrenadante e pellet (após centrifugação) foram analisadas em SDS-PAGE. As condições são descritas nas legendas das figuras.

2.9. MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

Os espectros de fluorescência foram obtidos usando um fluorímetro, Hitachi F-4500). Tropomiosina, actina e troponina foram misturadas em tampão de fluorescência (25 mM de MOPS pH 7,0, 50 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de DTT) (observar legendas das figuras para concentrações proteicas).

Para obter espectros de excitação, a amostra foi excitada em uma faixa de 240 nm a 320 nm e a leitura foi feita a 345 nm. Para obter os espectros de emissão das proteínas contendo triptofano, a amostra foi excitada a 290 nm e a leitura feita de 320 nm a 450 nm. Já para a obtenção de espectros de emissão de proteínas contendo análogos de triptofano, a amostra foi excitada a 312 nm, sendo utilizada a mesma faixa de leitura para o 5-hidroxitriptofano e a faixa de 320 nm a 550 nm para o 7-azatriptofano.

Titulações da Tm com Tn foram realizadas nas mesmas condições (tampão de fluorescência, 25°C, agitação suave), com excitação a 312 nm, sendo feita a seguinte sequência de correções para cada adição de solução de troponina: 1º subtração do espectro do tampão de fluorescência, 2º

correção para a diluição promovida pela adição do volume de solução de troponina e 3º subtração do espectro de troponina na concentração correspondente ao volume corrigido.

2.10. MEDIDAS DE VISCOSIDADE

As medidas de viscosidade foram obtidas, utilizando um semi-microviscosímetro Cannon-Manning (A50), sendo o tempo de escoamento do tampão de 236-241 s. Cada ponto na Figura 2A corresponde a uma solução à 8 μ M de Tm em tampão a 10 mM de imidazol (pH 7,0), a 2 mM de DTT e à concentração de NaCl especificada na legenda. As leituras foram realizadas após 7 h de equilíbrio, a 21 ± 1 °C.

2.11. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

As proteínas foram dializadas contra NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,0, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM e KCl 100 mM. Os estudos de dicróismo circular foram realizados utilizando um espectropolarímetro JASCO 720 a 25°C.

2.12. CÁLCULO DAS CONSTATANTE DE AFINIDADE

2.12.1. Polimerização da Tropomiosina

Consideramos a seguinte reação de adição do monômero à cadeia polimérica:

Onde $T_m = T_m$ livre e $[T_m]$ será chamada de λ_1 ; T_{m2} = dímero de T_m e $[T_{m2}]$ será chamada de λ_2 , T_{m3} = trímero de T_m e $[T_{m3}]$ será chamada de λ_3 , T_m , i = polímero de T_m com i monômeros e $[T_{mi}]$ será chamada de λ_i e K = constante de associação para a interação cabeça-cauda.

Pode ser demonstrado que:

$$\lambda_{tot} = \sum_{i=1} (i\lambda_i) = \frac{\lambda_1}{(1 - K\lambda_1)^2}$$

Equação 1: relaciona λ_1 , λ_{tot} e K (Oosawa & Kasai, 1961, Cantor & Schimmel, 1980).

$$\lambda_{tot} (1 - 2K\lambda_1 + K^2 \lambda_1^2) = \lambda_1 \quad \therefore K^2 \lambda_{tot} \lambda_1^2 - (2K \lambda_{tot} + 1) \lambda_1 + \lambda_{tot} = 0$$

$$\lambda_1 = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \text{ onde } a = K^2 \lambda_{tot}, b = -(2K \lambda_{tot} + 1) \text{ e } c = \lambda_{tot}$$

$$\lambda_1 = \frac{2K \lambda_{tot} + 1 - \sqrt{4K \lambda_{tot} + 1}}{2 K^2 \lambda_{tot}}$$

Equação 2: Relaciona valor de $[T_{m_{livre}}]$ (λ_1) com K e $[T_{m_{total}}]$ (λ_{tot}).

A sonda pode existir em dois ambientes, “livre” ou “polimerizado”, com intensidades de fluorescência diferentes para cada estado (F_{min} e F_{max} respectivamente; vide Figs. 15a, 15b, 19a e 19b). A concentração de sondas “livres” é igual à concentração de polímeros em solução, uma vez que cada polímero apresenta apenas uma extremidade C-terminal, o que independe do seu comprimento (Figura15d). Conforme a força iônica aumente, a afinidade da interação cabeça-cauda diminui até que todas as moléculas de T_m se encontrem no estado monomérico, cuja fluorescência intrínseca da sonda livre (F_{min}) corresponde à linha de base da titulação (vide seta na Figura 19A). Os dados foram normalizados com respeito às concentrações de T_m e os valores de F_{min} para cada curva. Definimos o fator, f_0 , como sendo a fração de sondas no ambiente “livre”, ou seja, a fração de moléculas de T_m cujas extremidades C-terminais não se encontram envolvidas em interações cabeça-cauda. Considerando F_N e F_{maxN} , respectivamente, como

as intensidades de fluorescência real e máxima, ambas normalizadas para a concentração de proteína e $F_{\min}$:

$$f_o = (F_{\max N} - F_N) / (F_{\max N} - 1) \quad \text{Equação 3: Definição experimental do fator } f_o.$$

Note também que f_o equivale a $\langle i \rangle^{-1}$, onde $\langle i \rangle$ corresponde ao número médio de monômeros por cadeia polimérica:

$$f_o = \langle i \rangle^{-1} = [\text{polímeros}] / [\lambda_{\text{tot}}] = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 \dots \lambda_i) / \lambda_{\text{tot}} = (\sum_{i=1} K^{i-1} \lambda_1^i) / \lambda_{\text{tot}}$$

Uma vez que $\sum x^i = x / (1-x)$, obtemos a seguinte expressão:

$$f_o = \lambda_1 / [\lambda_{\text{tot}} (1 - K \lambda_1)], \text{ sendo } \lambda_1 < K^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

A combinação das equações 1 e 2 permite-nos expressar f_o (equação 4) em termos de K e λ_{tot} :

$$f_o = \{2 / [(4 K \lambda_{\text{tot}} + 1)^{1/2} - 1]\} - (1 / K \lambda_{\text{tot}}) \quad \text{Equação 5}$$

Finalmente, a combinação das equações 3 e 5 permite expressar F_N em termos de $F_{\max N}$, K e λ_{tot} :

$$F_N = F_{\max N} - \{(F_{\max N} - 1) [(2 / [(4 K \lambda_{\text{tot}} + 1)^{1/2} - 1]) - (1 / K \lambda_{\text{tot}})]\} \quad \text{Equação 6}$$

As equações 5 e 6 foram utilizadas no ajuste dos dados experimentais (Figura 26B) e permitiram a obtenção simultânea de valores para K e $F_{\max N}$ (em cada força iônica) com o auxílio do programa SigmaPlot 3.0 (Jandel Scientific). Após selecionarmos o valor de $F_{\max N}$ que melhor se ajustava às curvas, os valores de K para cada força iônica foram recalculados fixando $F_{\max N} = 1,55$ (Figura 26). Os valores de K calculados quando utilizamos o valor fixo para $F_{\max N}$ não apresentaram uma variação significativa na faixa de força iônica mostrada na Figura 4 ($0,045M < I < 0,095M$), sendo sempre muito menor que 50%. Em forças iônicas fora da

faixa considerada, a variação da fluorescência da sonda analisada em função da variação nas concentrações da Tm foi muito pequena para permitir uma estimativa acurada dos valores de K nessas condições.

2.12.2. Ligação de Troponina à Tropomiosina

Considera-se que troponina liga-se à tropomiosina para formar um complexo binário:

Onde M = [Tm livre]; T = [Tn livre], C = [complexo Tm.Tn] e K = Constante de associação

$$K = \frac{C}{M_L T_L}$$

Equação 7: Cálculo de K para a ligação tropomiosina-troponina

$$M_{tot} = M_L + C$$

Equação 8

$$T_{tot} = T_L + C$$

Equação 9

Substituindo os termos M_L e T_L da equação 7 pelas equações 8 e 9, temos que:

$$K = \frac{C}{(M_{tot} - C)(T_{tot} - C)}$$

Equação 10

Considera-se $\Delta F/\Delta F_{max}$ é proporcional à fração de moléculas da Tm em complexo com troponina (C)

$$\frac{F - F_o}{F_{max} - F_o} = \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} = \frac{C}{M_{tot}}$$

O que implica que

$$C = M_{tot} \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}}$$

Equação 11

Substituindo C da equação 11 pela equação 10 podemos demonstrar que

$$M^2(\Delta F/\Delta F_{\max})^2 - M(\Delta F/\Delta F_{\max})(M + T + 1/K) + MT = 0$$

Obtendo a expressão quadrática que tem solução

$$\Delta F = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad \therefore \quad \begin{aligned} a &= M^2/\Delta F_{\max}^2 \\ b &= - (M/\Delta F_{\max})[(1/K) + M + T] \\ c &= MT \end{aligned}$$

e podemos demonstrar que

$$\Delta F = \Delta F_{\max} \left\{ \frac{[(1/K) + M + T] \pm \sqrt{[(1/K + M + T)^2 - 4MT]}}{2M} \right\}$$

Equação 12: Equação utilizada para o "curve-fit" para determinar o valor de K

A equação 12 permite estimar K em termos dos dados experimentais de fluorescência (ΔF e $\Delta F_{\max}$) e das concentrações de Tm (M) e Tn(T) em cada ponto. Inicialmente, utilizamos duas variáveis (K e $\Delta F_{\max}$) no ajuste dos dados à curva. Após o cálculo do $\Delta F_{\max}$ médio para todos os experimentos, K foi recalculado utilizando o valor médio de $\Delta F_{\max}$ como uma constante.

3. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados nas seguintes partes: i) Escolha da região de mutação e construção dos mutantes de tropomiosina; ii) caracterização dos mutantes com triptofano e análogos nas posições 261, 262, 263, 267 e 269 ; iii) mapeamento da sensibilidade do mutante AS263(5OHW) à região T1 da TnT (Oliveira *et al.*, 2000); iv) análise quantitativa da alta dependência da interação cabeça-cauda para a força iônica (Sousa & Farah, 2002) e v) obtenção de valores de afinidade para ligação da troponina à tropomiosina: em ausência de actina -Ca²⁺ e em presença de actina +Ca²⁺ e actina -Ca²⁺; vi) construção e caracterização de mutantes de tropomiosina não polimerizáveis para a investigação da influência da interação cabeça-cauda nas interações para as quais cada sonda é sensível.

3.1. CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES DE ASTM

3.1.1. Estratégia para a Escolha da Região de Inserção da Sonda

O primeiro desafio do projeto foi encontrar parâmetros que nos indicassem uma região na Tm onde as sondas inseridas pudessem ser sensíveis à ligação de Tm com outras proteínas do filamento fino. Tivemos pelo menos três razões para optar pelo estudo da região correspondente ao aminoácidos 258-275 da Tm :

1) É uma região de ligação à Tn independente das concentrações de cálcio. A Tm de músculos esqueléticos de rato apresenta apenas uma cisteína na posição 190 que permite a ligação covalente *in vitro* de sondas fluorescentes como N-(1-pireno)iodoacetoamida (Lin, 1982) ou N-(1-pireno)maleimida (Betcher-Lange & Lehrer, 1978). Essa posição permite uma marcação simples e específica da proteína para o estudo de ligação da Tm a outras proteínas do filamento fino. A região 190 da Tm, porém, coincide justamente com a região de ligação de Tm ao domínio globular da

Tn (TnT2-TnI-TnC). Esse domínio interage com o filamento fino de forma dependente das concentrações de cálcio (Heeley *et al.*, 1987), sendo que a inserção de uma sonda muito volumosa nessa região pode interferir grandemente nas interações estudadas.

2) Estudos anteriores sugeriram uma especialização funcional nessa região (Hammel & Hitchcock-DeGregori, 1996). Isso porque essa região é codificada por um exon alternativo específico para músculos estriados (tecidos que contém Tn) e há uma alta identidade entre esse exon (9a) nos genes α e β da Tm – isoformas encontradas em músculos estriados (para revisão vide Less-Miller & Helfman, 1991).

Figura 11: Região escolhida para inserção da sonda apresenta uma distribuição de polaridade interessante, considerando que a região assume uma estrutura coiled-coil caracterizada pela presença de resíduos hidrofóbicos na interface proteína-proteína (posições a e d) e de resíduos hidrofílicos na interface proteína-solvente (posições f, e, c e b). Coordenadas para a estrutura apresentada na figura: Whitby & Phillips, 2000

3) Resultados da análise da sequência primária de várias isoformas de Tm, realizada no início do projeto, e que é descrita adiante.

3.1.2. Análise da Seqüência de Aminoácidos Codificados Pelo Exon 9

Através de uma consulta na base de dados Medline, obtiveram-se 91 seqüências descritas para diversas isoformas de tropomiosina em vertebrados, sendo 65 de músculos estriados e 26 de músculos lisos e tecidos não musculares, todos com 284 aminoácidos. As seqüências foram alinhadas e separadas em segmentos de sete aminoácidos (que correspondem às repetições heptapeptídicas), visando facilitar a análise da molécula.

Nessa etapa, não houve preocupação com a discriminação dos genes que codificam as isoformas, mas apenas com a homologia das seqüências descritas. Na maioria dos casos, o gene codificador ainda não foi identificado (somente o tecido em que o cDNA ou a proteína foram obtidos). Posteriormente, foi analisada a conservação da natureza química dos resíduos em cada posição. Esses foram classificados em apolares (A), polares sem carga (P), polares com carga negativa (-), polares com carga positiva (+) e tirosina (Y), conforme é demonstrado na Tabela 4.

Aminoácido	natureza química
A, I, L, M, F, P, W, C e V	A
Y	Y
N, Q, G, S e T	P
D e E	-
R, H e K	+

Tabela 4: Critério de classificação da natureza química dos resíduos

Observou-se que, para o fragmento 258-275 -codificado pelos exons 9, as seqüências de músculos estriados (derivadas de exon 9a) continham um mesmo padrão de natureza química e que as seqüências de músculos lisos (derivadas de exon 9d) e tecidos não musculares obedeciam um padrão de natureza química diferente e bem menos conservado entre si.

Além disso, não foram encontradas seqüências de tropomiosinas de tecidos não musculares e de músculos lisos que obedecessem ao padrão observado em músculos estriados.

3.1.3. Análise da Estrutura do Segmento 258-275

Na Tabela 5 é demonstrado o padrão de polaridade/natureza química obtido para músculos estriados:

	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275
posição	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
M. Estriados	-	-	A	Y	A	P	+	A	+	Y	+	A	A	P	-	-	A	-

Tabela 5: Padrão de natureza química observado no segmento 258-275 de diferentes isoformas de tropomiosina em tecidos estriados de vertebrados. A, P, Y, + e - definidos na Tabela 5.

Se considerarmos a estrutura α -helicoidal heptapeptídica e a estrutura “coiled-coil” do dímero, podemos ressaltar algumas características interessantes desses padrões na Figura 13.

Figura 13: Modelo do fragmento 258(f) - 275(b) da tropomiosina, ilustrando a posição dos mutantes escolhidos na estrutura coiled-coil. A modelagem é baseada na estrutura de Phillips *et al.* (1986) e a figura foi editada utilizando programa InsightII. São mostradas as cadeias laterais dos resíduos que foram substituídos por triptofano. O esqueleto peptídico (em fita) é colorido pela escala de hidrofobicidade utilizada pelo programa, onde a hidrofobicidade da cadeia lateral aumenta com a cor vermelha.

A região dos aminoácidos 258-275 apresenta, em músculos estriados, vários resíduos com características hidrofóbicas nas posições *b*, *c* e *f* (superfície externa) e com características hidrofílicas no interior da hélice (*d*). Essas propriedades químicas não são típicas de resíduos que ocupam as referidas posições em repetições heptapeptídicas de estruturas *coiled-coil*. Como essa particularidade não é reproduzida em tecidos não musculares e músculos lisos, esses resíduos se mostraram interessantes para estudos através de mutação. Em particular, a conservação de quatro resíduos apolares (Ala, Leu ou Tyr) na superfície externa do “coiled-coil” (posições 261-*b*, 262-*c*, 265-*f* e 269-*c*) pode representar uma superfície hidrofóbica para interação com outra proteínas. Ainda a presença de um grupo polar (Gln) na superfície de dimerização da proteína (posições 263-*d*) também é

atípica. A Tm apresenta seis tirosinas em sua seqüência, sendo que cinco delas ocupam posições *a* ou *d* na estrutura *coiled-coil*, é o caso da Tyr-267 (posição *a*). A única tirosina na superfície exposta ao solvente é a Tyr-261 (posição *b*). Além disso, existe uma relativa semelhança estrutural entre tirosina e 5-hidroxitriptofano, ambos com cadeias laterais aromáticas com grupos hidrofílicos. Dessa forma, Tyr-267 ofereceu-nos uma boa oportunidade de inserir uma sonda na interface do *coiled-coil*, com a mínima perturbação possível da estrutura.

3.2. CONSTRUÇÃO DOS MUTANTES

Construímos os mutantes polimerizáveis AS261, AS262, AS263, AS267 e AS269 e expressamos, purificamos e caracterizamos as proteínas com triptofano, 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano incorporado, conforme descrito em Materiais e Métodos. Todas essas proteínas apresentam uma fusão dipeptídica Ala-Ser no N-terminal. Essa fusão é necessária para a produção de tropomiosinas funcionais em bactéria (Monteiro *et al.*, 1994). Uma vez que a caracterização das proteínas com 5-hidroxitriptofano nas posições 261, 263 e 269 forneceu resultados interessantes (como será discutido adiante), foram construídos, posteriormente, mais três mutantes não polimerizáveis - nf261(5OHW), nf263(5OHW) e nf269(5OHW). Estas proteínas não possuem a fusão N-terminal (nf = não-fusão). Foram ainda utilizados mutantes de Tm truncados na região C-terminal, ASTm₁₋₂₆₀ e ASTm₁₋₁₄₂, construídos por Ângela Mika Katsuyama.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Inicialmente, analisamos se as tropomiosinas mutantes mantinham as propriedades esperadas para a ASTm (Monteiro *et al.*, 1994). Foram analisadas a solubilidade dos mutantes e suas propriedades de ligação à actina e à troponina. Posteriormente, foram analisados os espectros de excitação/emissão de fluorescência dessas proteínas e as perturbações que a ligação de outras proteínas promoviam no espectro de emissão.

3.3.1. Solubilidade

A análise de ligação de Tm à actina e Tn parte da premissa de que Tm não sedimenta sozinha após ultracentrifugação. Porém, alguns mutantes produzidos apresentaram baixa solubilidade, como é demonstrado na Figura 14, sendo que mutantes contendo triptofano parecem ser menos solúveis que os mutantes com 5-hidroxitriptofano incorporado. Todos os mutantes com 7-azatriptofano apresentaram-se solúveis. Mutações na posição 262 ilustram bem essa observação: enquanto mais de metade de AS262W encontra-se na fração insolúvel (*pellet*) a 50 mM NaCl, AS262(5OHW) apresenta-se mais solúvel enquanto AS262(7NW) é completamente solúvel nessas condições.

	W			5OHW			7NW			S/ Sonda		
	M	S	P	M	S	P	M	S	P	M	S	P
AS261												
nf261												
AS262												
AS263												
nf263												
AS267												
AS269												
nf269												
Tm ₁ ~260												
Tm ₁ ~142												

Figura 14: SDS-PAGE a 15% ilustrando as variações na solubilidade do mutante AS262 em função dos aminoácidos (triptofano e análogos) incorporados na mesma posição da sequência. A Figura 15 apresenta experimentos realizados com ASTm e nfTm, nas mesmas condições. M, S e P coreespondem a amostras coletadas antes da centrifugação (M) e os sobrenadantes (S) e pellets (P) obtidos após ultracentrifugação. Condições: MOPS a 2 5mM, NaCl a 5 0mM, MgCl₂ a 5mM e DTT a 1mM.

Uma questão válida referente a sedimentação dos mutantes consiste na natureza dessa sedimentação. Estariam as proteínas agregando ou

super-polimerizando? Durante estudos de ligação de Tm e Tm-Tn à actina, Hill e colaboradores (1992) observaram a sedimentação de Tm quando Tn ligada à Tn, mesmo em ausência de actina. Os autores interpretaram essa sedimentação como sendo consequência do aumento da polimerização da Tm induzido pela ligação da Tn.

3.3.2. Ensaios de ligação ao filamento fino

Objetivando encontrar uma condição na qual os resultados dos experimentos de co-sedimentação informassem se os mutantes mantiveram a habilidade de ligar-se à actina e Tn, fizemos uma triagem utilizando diferentes condições, variando a força iônica e a presença de cálcio (Figura 15). Procuramos uma condição onde as proteínas permaneceram na forma solúvel. A Figura 15 apresenta os resultados dos experimentos de co-sedimentação de Tn, Tn-ASTm e Tn-nfTm em diferentes condições e os resultados estão resumidos na Tabela 6.

[NaCl]mM	+Actina	S/ Tm		+ ASTm		+nfTm	
		Tn	Tn(T2)	Tn	Tn(T2)	Tn	Tn(T2)
50	EGTA	D	D	D	D	D	D
	<i>Painéis</i>	1	3	11	13	23	25
	Ca ²⁺	ND	ND	D	ND	D	ND
	<i>Painéis</i>	2	4	12	14	24	26
150	EGTA	ND	ND	D	D	D	ND
	<i>Painéis</i>	5	7	17	19	29	31
	Ca ²⁺	ND	ND	D	ND	D	ND
	<i>Painéis</i>	6	8	18	20	30	32

Tabela 6: Resumo da interpretação dos resultados mostrados na Figura 15. A tabela indica se a ligação da(s) proteína(s) à actina é detectável (D) ou não (ND) em SDS-PAGE a 15%. Os números dos painéis fazem referência aos géis apresentados na Figura 15. São sinalizadas com a cor cinza as condições nas quais a presença de Tn no pellet evidencia sua ligação à Tm.

A tropomiosina polimerizável (ASTm, géis B9 e B15) ou não polimerizável (nfTM, géis B21 e B27) não sedimenta sozinha enquanto a actina sedimenta após ultracentrifugação (painél A). A presença de tropomiosina no *pellet*, após misturada com actina e ultracentrifugada,

significa que a proteína mantém sua capacidade de ligação à actina (géis B10, B16, B22 e B28).

O complexo troponina contendo TnT inteira (Tn) ou somente o fragmento T2 (Tn(T2)) não sedimenta sozinho, em tampão de fluorescência (painel A). Na presença de actina e 50 mM de NaCl, Tn e Tn(T2) co-sedimentam pouco em ausência de cálcio (géis B1 e B3) e não co-sedimentam em presença de cálcio e/ou na presença de 150mM de NaCl (géis B2, B4, B6 e B8). A presença de tropomiosina aumenta a afinidade de troponina por actina. Isso pode ser observado nas condições nas quais Tn não é capaz de ligar-se sozinha à actina (géis B2, B4, B5-B8). Nessas condições a presença de Tn no pellet indica a ligação de Tm à Tn (géis B12, B17-B19 para ASTm e B24, B29-B30 para nfTm).

A maior parte dos experimentos de co-sedimentação dos mutantes de Tm foi realizada em tampão de fluorescência (25 mM de MOPS pH 7,0, 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT e 50 mM de NaCl), porém, os mutantes que se apresentaram insolúveis nessas condições foram analisados utilizando o mesmo tampão a 150mM NaCl, condições nas quais não sedimentaram sozinhos. Em cada experimento foram analisadas as seguintes propriedades do mutante: solubilidade (controle), ligação à actina, e ligação à Tn (mais evidente em presença de Ca^{2+}). Todos os mutantes com a fusão dipeptídica mantiveram sua habilidade de ligar-se à actina e Tn (Figura 16A e dados não mostrados). Em adição, todos os mutantes sem a fusão dipeptídica contendo 5-hidroxitriptofano co-sedimentam com actina na presença de Tn (Figura 16B). Esses últimos resultados demonstraram que as mutações não afetaram drasticamente as interações Tm-actina e Tm-Tn.

Figura 15: Gel de SDS-PAGE 15% com resultado da triagem de condições para ensaio de co-sedimentação. A, mostra a solubilidade de actina, Tm(WT) e Tn(T2) em ausência de outras proteínas. B, mostra a solubilidade dessas proteínas em presença de ASTm ou nfTm, com ou sem cálcio, a 50 ou 150 mM de NaCl.

Figura 16: Gel de SDS-PAGE 15% com resultado representativo de um ensaio de co-sedimentação com Tropomiosinas mutantes. "A" apresenta, apenas para ilustração, um mutante polimerizável AS262(5OHW) que se apresentava insolúvel em NaCl 50 mM, sendo solúvel em NaCl150 mM. "B" apresenta os resultados dos ensaios de co-sedimentação realizados com os três mutantes não polimerizáveis construídos contendo 5-hidroxitriptofano. Os mesmos resultados foram observados para mutantes contendo triptofano e 7-azatriptofano. Condições: MOPS pH 7,0 25 mM, MgCl₂ 5mM, DTT 1 mM e NaCl150 mM.

3.3.3. Propriedades espectroscópicas dos mutantes

A Figura 17 mostra que as proteínas com triptofano ou os análogos 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano mantiveram as propriedades espectrais esperadas para os aminoácidos livres. As incorporações de 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano nas proteínas são evidenciadas, respectivamente, pela a banda de excitação na faixa de 300 nm-320 nm e pelo deslocamento de aproximadamente 10 nm no λ_{max} de excitação (Figura 17A), conforme observado em aminoácidos livres (Figura 17).

Figura 17: Espectros de excitação (A) e emissão (B) representativos para proteínas com triptofano e análogos incorporados. As cores da legenda indicam a sonda inserida na posição 262 da Tm. A figura A apresenta valores de fluorescência normalizados, para permitir a comparação dos espectros, enquanto a figura B apresenta os valores em unidades arbitrárias, para demonstrar a diferença entre as intensidades de fluorescência das sondas. Condições: A, $\lambda_{em} = 345$ nm para triptofano e 5-hidroxitriptofano e $\lambda_{em} = 400$ nm para 7-azatriptofano. B, $\lambda_{exc} = 312$ nm para todas as proteínas.

A Figura 17B demonstra que, nas condições escolhidas para os ensaios (excitação a 312 nm), os espectros observados correspondem ao 5-hidroxitriptofano incorporado nas proteínas, o que confere seletividade aos ensaios.

A. Perturbação da fluorescência pela ligação à outras proteínas do filamento fino

Os resultados dos experimentos de caracterização da perturbação da fluorescência dos mutantes promovida pela ligação de Tn e/ou actina (+/- Ca^{2+}) são resumidos na Figura 18. Nessa figura, mostramos que AS263(5OHW) é seletivamente sensível à ligação de troponina (Figura 18, 3A/B), AS261(5OHW) é seletivamente sensível à ligação de actina (Figura 18, 1A/B). AS262(5OHW) é sensível à ligação de actina e ligeiramente sensível à ligação de troponina (Figura 18, 2A/B), todavia, sua solubilidade fica muito alterada quando comparada com ASTm (Figura 14).

Figura 18: Espectros de emissão das tropomiosinas mutantes com 5-hidroxitriptofano incorporado em, sequencialmente, presença de A) Tropomiosina + troponina + cálcio e B) tropomiosina + actina + troponina + cálcio. A figura acima esquematiza o experimento. Condições experimentais: 1 μ M Tm em tampão de fluorescência (25 mM MOPS pH 7.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ e 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 25°C). Concentração das proteínas: 1 μ M de tropomiosina / 1 μ M de troponina / 7 μ M de actina. Agitação suave, tempo de equilíbrio: 3 min.

A269(5OHW) é bastante sensível à ligação de actina e troponina (Figura 18, 5A/B) e, finalmente, AS267 (5OHW) parece ser insensível à ligação de ambas as proteínas (Figura 18, 4A/B), mostrando, porém, alterações na fluorescência em função da desnaturação com uréia (dados não mostrados) parecendo ser uma boa ferramenta para estudos de desnaturação. O 7-azatriptofano incorporado nos mutantes estudados apresentou espectros com intensidade de fluorescência muito baixa nas concentrações utilizadas, o que inviabilizou o estudo da perturbação dos espectros promovida pela adição de outras proteínas ao sistema.

A Tabela 7 resume os resultados de caracterização dos mutantes construídos. Note que os valores para as mudanças de fluorescência demonstrados na tabela não correspondem à variação máxima de fluorescência da sonda ($\Delta F_{\max}$), pois referem-se à ligação observada entre Tm e Tn ou/e actina nas concentrações e condições utilizadas nos ensaios (vide legenda da Figura 18), que podem ou não corresponder à ligação estequiométrica.

MUTANTE	PROTEÍNA	SOLUBILIDADE	Habilidade de ligação		Mudanças na Fluorescência do Mutante por Associação com Outras Proteínas do Filamento Fino 100% = sinal de Tm sozinha		
			ACTINA	TROPONINA	Actina + Tm	Troponina + Tm	Troponina + Tm/Actina
AS261	W	2	S	S	-	-	-
	5OH	3	S	S	81%	97%	78%
	7N						
AS262	W	1	S	S	-	-	-
	5OH	1	S	S	84%	98%	79%
	7N	3	S	S	-	-	-
AS263	W	3	S	S	-	-	-
	5OH	3	S	S	105%	88%	83%
	7N	3	S	S			
AS267	W	2	S	S	-	-	-
	5OH	3	S	S	91%	102%	94%
	7N	3	S	S	-	-	-
A269	W	1	S	S	-	-	-
	5OH	2	S	S	114%	87%	107%
	7N						

Tabela 7: Resumo das características das proteínas purificadas. Foi estabelecida uma faixa de 1-3 para expressar a solubilidade das proteínas, baseada na sua sedimentação durante a ultracentrifugação em baixa força iônica (50 mM NaCl) (em ausência de actina): 1) $\leq 50\%$ da tropomiosina encontrada no sobrenadante; 2) $\geq 50\%$ da Tm encontrada no sobrenadante e 3) Toda Tm encontrada no sobrenadante. Para as proteínas apresentando solubilidade 1, os experimentos de co-sedimentação foram realizados a 150 mM NaCl. Para definir a capacidade dos mutantes de se ligarem às proteínas indicadas na tabela: S) A habilidade de ligar-se é mantida e N) TM não se liga à proteína indicada. Todas as tropomiosinas contendo 7-azatriptofano apresentaram um sinal de fluorescência muito fraco, e não puderam ser analisadas em presença das proteínas do filamento.

3.4. MAPEAMENTO DA INTERAÇÃO DO RESÍDUO 263 DA TROPOMIOSINA COM TROPONINA

O mutante AS263(5OHW) foi estudado com mais detalhes visando caracterizar a interação da troponina com a região na qual a sonda está inserida. Estabelecemos colaboração com o grupo de Fernando Reinach, que havia construído e caracterizado fragmentos de TnT. Os fragmentos foram baseados no estudo de Pearlstone e colaboradores (1977) e Malnic e colaboradores (1998), discutidos na Introdução. Os fragmentos da TnT utilizados - esquematizados na Figura 19 - foram produzidos por Daniela M. Oliveira.

Figura 19: Representação esquemática dos fragmentos de TnT utilizados na caracterização da resposta do 5-hidroxitriptofano na posição 263 da Tm. A nomenclatura entre parênteses indica que os fragmentos utilizados (isoforma 3 de TnT esquelética de galinha) foram construídos baseados em fragmentos análogos (TnT esquelética de coelho) descritos na literatura (Pearlstone et al., 1976). Conforme é demonstrado na Figura 20, os fragmentos representados por uma linha contínua vermelha (—) ligam-se à Tm-actina e perturbam o espectro de fluorescência de AS263(5OH)W, os fragmentos representados por uma linha contínua preta (—) ligam-se à ASTm-actina, mas não à AS263(5OH)W-actina, e não perturbam a fluorescência da sonda enquanto que os fragmentos representados por uma linha pontilhada preta (- - -) não são capazes de ligar-se a Tm-actina ou perturbar o espectro de fluorescência de AS263(5OH)W.

Figura 20: Perturbações promovidas no espectro de fluorescência de AS263(5OHW) pela ligação do complexo troponina (1), do complexo troponina reconstituído com T2 (2), e dos diversos fragmentos do TnT (3-8), em ausência (A) e em presença (B) de actina. Sequência de adição de proteínas: (A) AS263(5OHW) (espectro azul), + Tn (espectro rosa), +Ca²⁺ (espectro amarelo nos painéis 1 e 2); e (B) AS263(5OHW) (espectro azul), + Actina (espectro vermelho), + Tn (espectro rosa), +Ca²⁺ (espectro amarelo nos painéis 1 e 2). O painel C apresenta Tricina/SDS-PAGE 12,5% com os resultados de co-sedimentação do complexo Tn com Tm-actina. As figuras apresentam resultados típicos obtidos a partir de pelo menos dois experimentos independentes. Condições: Tampão de fluorescência a 0,5mM de EGTA (+/- 0,6mM CaCl₂), a 25°C. Concentração das proteínas: A e B) 0,5 µM de Tm: 3 µM de Tn : 7 µM de actina; e C) 1 µM de Tm: 3 µM de Tn : 7 µM de actina.

O mutante AS263(5OHW) tem sua fluorescência diminuída quando Tn é adicionada ao sistema (Figura 18, 3A/B). Não observamos o mesmo decréscimo na intensidade de fluorescência do mutante quando adicionamos o complexo Tn reconstituído com T2, TnT2-TnC-TnI (Figura 20, painéis A1, A2, B1 e B2). Essa observação sugeriu que a fluorescência do 5-hidroxitriptofano na posição 263 não é perturbada pela ligação de T2 ou dos outros componentes do complexo troponina, i.e. TnI e TnC. Visando definir qual o menor fragmento de TnT capaz de perturbar a intensidade de fluorescência da sonda, os mesmos experimentos foram realizados com os diversos fragmentos de TnT (Figura 20).

Investigamos a perturbação do espectro de AS263(5OHW) promovida pela ligação do mutante de Tm com os fragmentos de TnT, sendo que os resultados de fluorescência (Figura 20, A e B) foram confrontados com os resultados dos ensaios de ligação por co-sedimentação (Figura 20C).

Nas condições e concentrações indicadas na figura, o fragmento TnT 77-191 causou um decréscimo de ~20% no sinal de fluorescência do mutante, em presença de actina (Figura 20B, painel 5), mudança muito similar à provocada por adição de Tn, T1-157 e TnT1-191 (Figura 20B, painéis 1, 3 e 4). Em ausência de actina, a ligação de Tm promove uma menor variação da fluorescência de AS263(5OHW) (Figura 20A), o que é consistente com as observações de que Tm-Tn apresenta maior afinidade para actina que Tm sozinha (para revisão vide Tobacman, 1996). Por outro lado, os fragmentos TnT 77-157, TnT1-76 e TnT158-191 não promoveram mudanças na emissão de fluorescência da sonda, independente da presença de actina (Figura 20A e B, painéis 6-8).

Os ensaios de ligação dos fragmentos à Tm-actina demonstraram que os três únicos fragmentos que perturbam o espectro de emissão de AS263(5OHW) - TnT 1-191, TnT 1-157 e TnT 77-191, co-sedimentam com o complexo Tm-actina (Figura 20C). O complexo TnT2-TnC-TnI, apesar de co-sedimentar com o complexo Tm-actina (Figura 20C, painel 2) não altera a fluorescência da sonda. Esse resultado é consistente com estudos

estruturais que demonstram que o fragmento T2 liga-se à região 150-180 da Tm (White *et al.*, 1987), não sendo esperado que a ligação modifique o microambiente de uma sonda inserida na posição 263. É esperado que o fragmento TnT 1-76 (CB3) não influencie a fluorescência de AS263(5OHW), uma vez que CB3 não se liga à Tm (Pearlstone & Smillie, 1978). O estudo de Oliveira e colaboradores justamente demonstra que o fragmento TnT158-191 liga-se à actina (Figura 4, Oliveira *et. al.*, 2000) mas não à Tm (Figura 5 de Oliveira *et. al.*, 2000), sendo essa a explicação para a co-sedimentação do fragmento com Tm-actina (Figura 20C, painel 8).

Entretanto, o fragmento TnT 77-157 (CB2) liga-se à Tm (Pearlstone & Smillie, 1977). Os experimentos mostrados na Figura 20 não indicaram a ligação de TnT 77-157 ao complexo AS263(5OHW).actina. Duas hipóteses poderiam explicar essa observação: a baixa afinidade desse fragmento de TnT pela Tm.actina limitaria a observação da ligação em SDS-PAGE, ou a mutação promoveu a diminuição da afinidade de AS263(5OHW) pela TnT 77-157. Para testar essas hipóteses, comparamos os resultados de ligação de TnT 77-157 a ASTm com e sem o 5-hidroxitriptofano na posição 263 (Figura 21). Os resultados confirmaram a hipótese de que a mutação na posição 263 afeta a habilidade do mutante de ligar-se ao fragmento de TnT 77-157.

Figura 21: Comparação dos resultados de co-sedimentação do fragmento TnT 77-157(CB2) com ASTm-actina e com AS263(5OHW)-actina, analisados em SDS-PAGE 15%. Condições: Tampão de fluorescência a 0,5 mM de EGTA (+/- 0,6 mM CaCl_2), a 25°C. Concentração das proteínas: 2 μM de Tm: 3 μM de Tn : 7 μM de actina; e C) 2 μM de Tm: 6 μM de Tn : 14 μM de actina.

Essa observação foi interpretada como uma sugestão de que a ligação de TNT 77-157 a AS263(5OHW) é estabilizada pelas seqüências vizinhas na estrutura da TnT. Somente em presença dessa seqüências (TnT

1-157 e TnT 77-191) a ligação à AS263(5OHW) é detectada em experimentos de fluorescência e co-sedimentação (Figura 20).

Os resultados observados na Figura 20A, B e C, painéis 3-8 demonstram que todos os fragmentos capazes de ligar-se a AS263(5OHW)-actina (Figura 20C) e que possuem a região TnT 77-157 (Figura 20 – painéis 3-5) promovem um decréscimo no sinal de fluorescência da sonda em ausência (Figura 20A) e em presença de actina (Figura 20B). A Tabela 8 sumariza esses resultados. Vale enfatizar que os percentuais apresentados na Tabela 8 não podem ser interpretados como perturbações máximas da fluorescência, mas apenas como indicadores qualitativos da ligação.

	+ Actina	- Actina
Somente AS263(5OHW)	100%	100%
Tn	81%	88%
Tn (T2)	108%	99%
TnT 1-191	80%	89%
TnT 1-157	76%	82%
TnT 77-191	79%	92%
TnT 77-157	97%(96%)	96%(97%)
TnT 1-76	101%	98%
TnT 158-191	102%	98%

Tabela 8: Mudanças na intensidade de fluorescência de AS263(5OHW) promovidas pela ligação de TnT e fragmentos. Os dados da tabela foram obtidos a partir dos espectros apresentados na figura 5. Os valores entre parênteses referem-se a experimentos realizados com 10 μ M de TnT 77-157; 1 μ M de Tm; 7 μ M de actina. Esses experimentos foram realizados nessas condições para demonstrar que a intensidade da sonda é de fato insensível à ligação do fragmento TnT 77-157.

3.5. ESTUDO QUANTITATIVO DA POLIMERIZAÇÃO DA TROPOMIOSINA

3.5.1. A sonda na posição 269 é especificamente sensível a interação cabeça-cauda

Após analisadas as tropomiosinas recombinantes contendo 5-hidroxitriptofano, em várias posições ao longo de sua estrutura primária, constatamos que a fluorescência do 5-hidroxitriptofano na posição 269 (AS269(5OHW)) apresentou-se sensível ao aumento na força iônica, que promove a despolimerização da Tm (Figura 22A). A fluorescência do 5-

hidroxitriptofano livre tem é insensível à variação da concentração de NaCl (0-1 M de NaCl, dados não mostrados).

Tendo em mente que a polimerização da Tm é altamente dependente da força iônica do meio, como é discutido na Introdução desse trabalho, iniciamos uma investigação desse mutante. O 5-hidroxitriptofano pode ser seletivamente excitado em comprimentos de onda maiores do que 300 nm, onde proteínas contendo triptofano já não absorvem mais (Figura 22C).

Figura 22: Espectros de fluorescência mostrando que a sonda na posição 269 da Tm polimerizável (AS269(5OHW)) apresenta fluorescência sensível à variação na concentração de NaCl (A), o que não é observado para o mutante não polimerizável, nf269(5OHW) (B). (C) Espectro de excitação dos mutantes polimerizável (AS269(5OHW)) e não polimerizável (nf269(5OHW)) com 5-hidroxitriptofano incorporado na posição 269 e do mutante polimerizável com triptofano incorporado na mesma posição (AS269W). A incorporação de 5-hidroxitriptofano nos mutantes AS269(5OHW) e nf269(5OHW) é evidenciada pelo ombro observado nos espectros de emissão e ausente no espectro de emissão de AS269W. O esquema (D) ilustra nossa interpretação da relação inversa entre a fluorescência de AS269(5OHW) e a concentração de NaCl. Condições: Tm 10 μ M, MOPS pH7,0 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DTT 1 mM e NaCl, nas concentrações indicadas na legenda. Todas as amostras foram pre-equilibradas por 7 h a 25°C. A e B, $\lambda_{exc} = 312$ nm e C, $\lambda_{em} = 345$ nm.

A intensidade de fluorescência de AS269(5OHW) diminui em aproximadamente 38% (1,55 para 1,00) quando a concentração de NaCl é aumentada de 10 para 300 mM (Figura 22A). O λ_{max} da emissão de fluorescência dessa sonda mantém-se constante entre 10 e 300 mM de NaCl. A fluorescência do mutante com triptofano (no lugar de 5-hidroxitriptofano), incorporado na mesma posição (AS269W) também se apresentou sensível à força iônica do meio. Nesse caso, porém, o decréscimo na intensidade da fluorescência é acompanhado por um deslocamento de λ_{max} para o vermelho (Figura 23).

Figura 23: Espectro de emissão do mutante de tropomiosina com triptofano na posição 269. Além do decréscimo na intensidade de fluorescência observado como consequência do aumento da força iônica do meio, foi observado, paralelamente, um deslocamento do espectro para o vermelho. Condições: Tm 1 μ M, MOPS pH7,0 25 mM, MgCl_2 5 mM, DTT 1 mM e concentrações de NaCl que variaram de 1,61 a 400 mM, com intervalo de 10 mM para a faixa de 10-100 mM de NaCl, 20 mM para a faixa de 100-300 mM de NaCl e 50 mM para a faixa de 300-400 mM de NaCl. $\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm.

Essa combinação de deslocamento espectral com mudanças na intensidade complica a análise quantitativa em termos de equilíbrios de dois estados (Eftink, 1994). Por esse motivo, foi utilizada a variação da intensidade de fluorescência do mutante AS269(5OHW) para a investigação da interação cabeça-cauda da Tm. Excitando a sonda a 312 nm, foi eliminada a contribuição de fluorescência de qualquer pequena fração de moléculas contendo triptofano no lugar de 5-hidroxitriptofano (Figura 22C) (Das *et al.*, 1999, Farah & Reinach, 1999).

Apesar de indicações de que a sonda na posição 269 da Tm é sensível a modificações na interação cabeça-cauda, não poderíamos descartar a hipótese de estarmos monitorando alguma forma de agregação

ou interação inespecífica da Tm. Para testar essa hipótese analisamos a fluorescência da tropomiosina deficiente em polimerização com a sonda na posição 269, nf(5OH)W, cuja única diferença em relação a AS269(5OH)W é a ausência de dois aminoácidos (ala-ser) no N-terminal. Agregações ou interações inespecíficas percebidas pela sonda na posição 269 não deveriam ser influenciadas pela ausência de dois aminoácidos a 40 nm da sonda.

Analisamos os espectros de emissão do mutante nf269(5OH)W e constatamos que a sonda na posição 269 nesse mutante é insensível à força iônica (Figura 22B), diferentemente do que foi observado para AS269(5OH)W (Figura 22A).

A intensidade de fluorescência de outros mutantes polimerizáveis de tropomiosina - marcados com 5-hidroxitriptofano na mesma região (posições 261, 263 e 267) (Figura 24), no centro (posição 185) e na região N-terminal da proteína (posições 90, 101 e 111) (Farah & Reinach, 1999) - também se manteve insensível a variações na força iônica. Esta observação somada a observação de que a fluorescência de nf269(5OH)W é insensível à alteração na força iônica, confirma que a sonda na posição 269 está realmente respondendo a mudanças na interação cabeça-cauda da Tm.

Figura 24: Espectro de emissão de mutantes de Tm com 5-hidroxitriptofano nas posições 261, 263, 267 e 269, na estrutura primária da proteína. A legenda indica concentração de NaCl (mM) em cada espectro.

3.5.2. A inserção da sonda na posição 269 não afetou significativamente as propriedades da molécula

Para verificar se a mutação na posição 269 - com ou sem a fusão N-terminal de ala-ser - afetou de forma relevante propriedades da Tm, testamos sua habilidade de ligar-se à actina e/ou à troponina, e examinamos seu espectro de dicroísmo circular e sua viscosidade (Figura 25).

Como é mostrado na Figura 25C, não foram observadas diferenças significativas entre os espectros de CD das quatro proteínas (ASTm, nfTm, AS269(5OHW) e nf269(5OHW)), o que é um indício de que as mutações não afetaram significativamente a estrutura secundária da molécula como um todo. Entretanto, o método não é sensível o suficiente para detetar possíveis pequenas mudanças na estrutura local da proteína, isto é, desenovelamento de um trecho pequeno de α -hélice. Tendo em vista que o resíduo 269 corresponde a uma posição externa (c) na repetição heptapeptídica da tropomiosina (McLachlan & Stewart 1975), consideramos pequena a probabilidade de que as interações na interface proteína-proteína da estrutura *coiled-coil* da unidade monomérica (que corresponde ao dímero, conforme mencionado na Introdução, página 6 desta Tese) sejam rompidas pela mutação.

A viscosidade cinemática das quatro tropomiosinas mutantes foi determinada a força iônica variável (Figura 25A). Conforme o esperado (Monteiro *et al.*, 1994), as tropomiosinas recombinantes contendo a fusão ala-ser apresentaram viscosidade dependente da concentração de sal, enquanto as tropomiosinas sem a fusão dipeptídica apresentaram viscosidade extremamente reduzida em todas as concentrações de sal testadas. Não foram observadas diferenças significativas de viscosidade entre ASTm e AS269(5OHW) e entre nfTm e nf269(5OHW) (Figura 25A), o que sugere que a mutação na posição 269 não promoveu grandes mudanças nas interações intermoleculares responsáveis pela polimerização.

Figura 25: Ensaio de viscosidade (A) e espectros de CD (C) comparando, respectivamente, a habilidade de polimerização de tropomiosinas recombinantes com (Tm269) e sem (Tm) a sonda e com (AS) e sem (nf) a fusão de Ala-Ser na extremidade N-terminal. (B) Os ensaios mostram a habilidade da Tm marcada, polimerizável (AS269) ou não (nf269), de ligar-se à actina na presença ou na ausência de Tn. Os símbolos x e □ na figura A correspondem à viscosidade de ASTm e AS269(5OHW), respectivamente, a 300 mM de NaCl. Condições: (A) Tm 8 µM em solução de imidazol pH 7,0 10 mM e DTT 2 mM; (B) Tm 2 µM, Tn 2 µM e actina 14 µM em solução de MOPS pH7,0 25 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e NaCl 50 mM; (C) Tm 10 µM em solução de NaH₂PO₄ pH 7,0 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM e KCl 100 mM. Todas as amostras foram pre-equilibradas por 7 h a 25°C.

Através de ensaios de co-sedimentação, verificamos as propriedades de ligação à actina e/ou à troponina dos quatro mutantes de tropomiosina (Figura 25B). Os resultados mostraram que AS269(5OHW) é capaz de ligar-se à actina e de promover a ligação de troponina ao filamento fino, de maneira similar à ASTm (Monteiro *et al.*, 1994). Além disso, nf269(5OHW) sozinha não se liga à actina mas o faz em presença de troponina, sendo essa característica também observada para nfTm (Figura 25B e Monteiro *et al.*, 1994).

A análise acima sugere que a sonda na posição 269 da Tm não afeta significativamente suas interações com actina e troponina ou sua polimerização dependente de sal. A única diferença química entre

AS269(5OHW) e nf269(5OHW) consiste na presença ou na ausência do dipeptídeo de fusão ala-ser, a aproximadamente 40 nm de distância da sonda na posição 269. Concluímos que a intensidade da fluorescência do 5-hidroxitriptofano na posição 269 é sensível às interações cabeça-cauda responsáveis pela polimerização da Tm.

A Figura 22D apresenta um esquema da polimerização linear da Tm, onde o 5-hidroxitriptofano pode existir em dois ambientes: i) um ambiente “polimerizado” (●) no qual a extremidade C-terminal da Tm (na qual a sonda encontra-se covalentemente ligada) interage com a extremidade N-terminal de outra molécula de Tm; e ii) um ambiente “livre” (○) que corresponde à extremidade C-terminal de cada polímero de Tm e a monômeros livres. A fração de sondas no ambiente “livre” é proporcional à concentração total de polímeros (nesse caso, os monômeros são considerados como polímeros cujo comprimento da cadeia (i)=1). A fração de sondas em cada um desses ambientes é uma função da concentração total da Tm e da constante de associação (K) do equilíbrio da interação cabeça-cauda nas condições especificadas. Oosawa e Kasai (1962) mostraram que, assumindo-se que a constante de equilíbrio independe do comprimento do polímero, é possível calcular a concentração de cada “i-mero” em função de K e da concentração total da Tm.

3.5.3. Investigação quantitativa da afinidade da interação cabeça-cauda em diversas concentrações de sal

Foi possível investigar a termodinâmica da interação cabeça-cauda da Tm através do monitoramento da variação na intensidade de fluorescência da sonda em diversas concentrações da proteína, como uma função da força iônica do meio como apresentado na Figura 26A.

Figura 26: Titulação da variação da fluorescência de AS269(5OHW) em função da concentração de NaCl. (A) O gráfico mostra seis das dez curvas de titulação de AS269(5OHW) com NaCl. O valor da ordenada corresponde à fluorescência normalizada pela concentração de Tm e por F_{min} (fluorescência da sonda livre) de cada curva. Após isolarmos os dados obtidos em cada concentração de NaCl, foi obtido o gráfico (B). As equações são descritas em detalhe em Materiais e Métodos e os valores de K podem ser obtidos pela equação linear mostrado na figura 4B. Os dados foram obtidos a partir de, no mínimo, dois ensaios independentes para cada condição. Condições: MOPS pH 7,0 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DT mM. As concentrações de Tm e de NaCl são indicadas na figura. Todas as amostras foram pré-equilibradas por 7 h a 25°C.

A intensidade de fluorescência intrínseca da sonda (normalizada para a concentração de Tm) é máxima em baixas forças iônicas e altas concentrações de Tm e decresce à medida que a força iônica aumenta e/ou a concentração da proteína diminui. Esse comportamento é evidente na

Figura 26B, cujas curvas correspondem à fração de sondas no ambiente polimerizado ($1-f_0$) nas forças iônicas selecionadas contra a concentração total de Tm. Conforme previsto (Oosawa & Kasai 1962), a extensão de polimerização é dependente da concentração da proteína.

O valor de $F_{\max}$ foi estimado em três etapas: (1) os dados foram ajustados, a equação 6 descrita em Materiais e Métodos manteve os valores de K e $F_{\max}$ como variáveis ($F_{\max}$ livre, na Tabela 9); (2) utilizamos para uma primeira estimativa a média (1,56) dos valores de $F_{\max}$ obtidos na faixa de 10-55 mM de NaCl; (3) utilizando valores fixos para $F_{\max}$, recalculamos K em cada força iônica.

[NaCl] (mM)	I ($\times 10^{-3}$)	$F_{\max}$ livre	$F_{\max}$ livre	$F_{\max} = 1,56$	$F_{\max} = 1,55$
			Ka (M^{-1})	Ka (M^{-1})	Ka (M^{-1})
10	35,36	1,55	$6,7 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
15	40,36	1,54	$5,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
20	45,36	1,54	$2,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
25	50,36	1,54	$1,6 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$9,4 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
30	55,36	1,56	$6,7 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	$7,4 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$
35	60,36	1,58	$3,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$
40	65,36	1,55	$2,0 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$
45	70,36	1,55	$1,8 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
50	75,36	1,61	$9,8 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
55	80,36	1,66	$6,2 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
60	85,36	1,68	$4,4 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$
65	90,36	1,69	$2,8 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$	$4,8 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$
70	95,36	1,76	$1,7 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$
80	105,36	2,08	$6,9 \times 10^4 \pm 6,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$
90	115,36	2,34	$3,7 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$
100	125,36	1,98	$4,3 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
125	150,36	5,37	$4,6 \times 10^3 \pm 24 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$
150	175,36	1,63	$2,2 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$
175	200,36	-	-	$9,2 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^3$	$9,4 \times 10^3 \pm 2,2 \times 10^3$
200	225,36	-	-	$1,6 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3 \pm 1,3 \times 10^3$

Tabela 9: Valores calculados para $F_{\max}$ e K a cada força iônica (I) e valores calculados para K fixando $F_{\max}$ em 1,55 (fundo cinza) e 1,56. Os valores foram obtidos a partir dos dados apresentados na Figura 26. Apenas os experimentos realizados entre 20 e 70 mM de NaCl (negrito) apresentaram variações de fluorescência grandes o suficiente para o cálculo de K.

A Tabela 8 sumariza os valores encontrados para $F_{\max}$ e K em cada concentração de NaCl. Na tabela, apresentamos os valores de K em cada

força iônica calculada usando um valor de $F_{\max}$ simultaneamente calculado e variável e valores de $F_{\max}$ fixos em 1,55 e 1,56. Após analisarmos a tabela, fixamos $F_{\max}$ em 1,55.

3.5.4. Quantificação da dependência da interação cabeça-cauda da força iônica do meio

Os dados mostrados na Tabela 9, considerando $F_{\max}=1,55$ foram utilizados para a construção da Figura 27, que ilustra a variação da constante de afinidade da interação cabeça-cauda (K) em função do aumento da concentração de NaCl (Figura 27A). Apesar de termos realizado experimentos em concentrações de NaCl que variam de 10-300 mM, consideramos em nossas análises apenas K obtido na faixa de 20-70 mM de NaCl. Como pode ser constatado na Figura 26, fora dessa faixa de força iônica, as mudanças na fluorescência intrínseca do mutante (em função do aumento na concentração de sal) são muito pequenas para uma estimativa precisa de K .

Figura 27: Variação de K aparente em função da força iônica. O gráfico descreve o quanto a interação cabeça-cauda depende da força iônica do meio. (A) Os valores da constante de afinidade (K) obtidos experimentalmente através das titulações com sal (Figura 26) diminuem com o aumento da força iônica. (B) A equação linear $\log K = 11.1 - 18.0[I]^{0.5}$ expressa matematicamente essa dependência.

3.6. ABORDAGEM QUANTITATIVA PARA INVESTIGAR AS INTERAÇÕES TROPOMIOSINA/TROPONINA

O fato de termos um mutante que responde à ligação de troponina, mas não de actina (AS263W) e outro que responde à ligação de actina, mas não de troponina (AS261W), em uma mesma região significa que atingimos um dos objetivos desse estudo.

Figura 28: A, Espectros de emissão de Tm.actina com Tn. O espectro em azul corresponde à fluorescência de 1 μ M de AS263(5OHW) (em presença de 7 μ M de actina) e o espectro em vermelho corresponde à fluorescência dessa mesma quantidade de proteína ligada à Tn (1:2:7, Tm:Tn:actina). B, Curvas C I, II e III são melhor comparadas quando visualizadas em um mesmo gráfico. C, Títulos do mutante AS263(5OHW) com troponina(-Ca²⁺) , em ausência(I) e presença de actina (II) e na presença de actina e cálcio (III). À direita, curvas de titulação ($n \geq 3$) que forneceram os seguintes valores para K_a : I . $2,5 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^5 M^{-1}$, II . $5,3 \times 10^7 \pm 2,2 \times 10^7 M^{-1}$ e III . $4,3 \times 10^7 \pm 4,3 \times 10^7 M^{-1}$. Os dados foram ajustados para a equação 12, descrita em Materiais e Métodos.

Os mutantes funcionam como ferramentas de estudo que podem viabilizar a obtenção de dados experimentais para todos os equilíbrios de ligação de Tm à actina e Tn.

Qualitativamente, os mutantes AS263(5OHW) e AS261(5OHW) demonstraram-se bastante úteis para investigar as interações de

tropomiosina com troponina e actina, respectivamente. Como é mostrado na Figura 18, 3A/B e na Tabela 7, a menor variação de fluorescência observada nas condições analisadas (tampão de fluorescência, concentrações de Tm e Tn iguais a 1 μM), considerada por nós significativa, consiste no decréscimo de 12% no sinal de fluorescência de AS263(5OHW) como consequência da ligação de Tn. Esta variação não correspondia à associação estequiométrica entre Tm e Tn. Pode-se observar na Figura 28A que, quando aproximadamente 100% do mutante encontra-se ligado à Tn (1 μM de Tm: 2 μM de Tn: 7 μM de actina) (Figura 28C II), a ligação promove um decréscimo de ~30% na intensidade do sinal de fluorescência (ΔF_{max}).

As constantes de afinidade da interação Tm-Tn (+/- actina, +/- cálcio) foram calculadas utilizando a equação 12, descrita em Materiais e Métodos. Foi obtido o valor de $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 4,7 \times 10^5$) para a afinidade AS263(5OH)W por troponina, em ausência de cálcio (Figura 28CIII). Em presença de actina, foi obtido um valor para a constante de afinidade da ligação Tm-Tn de $5,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 2,2 \times 10^7$), em ausência de cálcio (Figura 28CII), e de $4,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 1,4 \times 10^7$), em presença de cálcio (Figura 28C). Esses valores são comparados com os da literatura na Discussão. A afinidade da ligação de Tn à Tm.actina não havia sido obtida experimentalmente até então mas foram calculados valores similares para essa afinidade, em presença e em ausência de cálcio, utilizando o ciclo termodinâmico demonstrado na Figura 35 (Fisher *et al.*, 1995). A sobreposição das curvas de titulação de Tm.actina (+/- Ca^{2+}) com Tn Figura 28B demonstra que a presença de cálcio não interfere na afinidade da ligação.

3.7. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO Tm-Tm NA AFINIDADE DE Tm POR OUTRAS PROTEÍNAS DO FILAMENTO FINO

3.7.1. O quanto a formação de polímeros de Tm contribui para sua interação com outras proteínas?

É amplamente conhecido na literatura que mutações que comprometem a capacidade de polimerização da Tm acarretam um decréscimo na afinidade de Tm por actina (Johnson & Smillie, 1977, Mak *et al.*, 1983, Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Monteiro *et al.*, 1994). Em ausência de actina, o mutante não polimerizável nf269(5OHw) não teve seu espectro de emissão alterado pela adição de Tn (Figura 29, 3A e 3B). Uma vez que fragmentos de Tm ligam-se a TnT (Pato *et al.*, 1981b), seria esperado que nf269(5OHw) tivesse seu espectro de fluorescência perturbado pela ligação de Tn de forma análoga ao observado para AS269(5OHw) (Figura 18, 5A/B). A hipótese de que o mutante pudesse estar respondendo a mudanças na interação cabeça-cauda promovidas pela Tn - e não à interação Tm-Tn propriamente dita - foi levantada pelo Dr. Larry S. Tobacman (University of Iowa), durante a apresentação desse resultado sob a forma de poster, no Biophysical Society Meeting 2001 (Boston, EUA).

Para testar essa hipótese, construímos os mutantes nf261(5OHw) e nf263(5OHw), que são versões não polimerizáveis dos mutantes cujas fluorescências são especificamente sensíveis à ligação de actina ou troponina T, respectivamente.

Figura 29: Perturbações nos espectros de emissão de fluorescência de nf261(5OHW), nf263(5OHW) e nf269(5OHW) promovidas pela adição de outras proteínas do filamento fino (A) e (B). O desenho(C) esquematiza a seqüência de adição de proteínas correspondente aos espectros e a tabela compara as alterações nas intensidades de fluorescência dos mutantes polimerizáveis (valores em vermelho baseados na Figura 18 e não polimerizáveis, observadas após a adição de cada proteína do filamento fino. Condições: vide Figura 18.

Como mostrado na Figura 18, quando a actina (7 μM) é misturada à Tm com 5-hidroxitriptofano na posição 261 (1 μM), a intensidade da fluorescência da proteína polimerizável (AS261(5OHW)) diminui para 81% do seu valor inicial (Figura 18, 1B). Contudo, a intensidade de fluorescência do mutante não polimerizável (nf261(5OHW)) diminui apenas para 94% (Figura 29, 1B). A adição de Tn (1 μM) ao sistema (actina.Tm) diminuiu ainda mais, para 77% e 87% do valor inicial da intensidade de fluorescência de, respectivamente, AS261(5OHW) (Figura 18, 1B) e nf261(5OHW) (Figura 29, 1A e 1B). Uma vez que a fluorescência da sonda na posição 261 da Tm não é sensível à ligação de Tn (Figura 18, 1A), essa perturbação de fluorescência deve ser interpretada como um aumento da afinidade da interação Tm.actina, induzida pela ligação de Tn.

Nossos resultados corroboram o fato de que a ligação de Tn aumenta a afinidade de Tm por actina, sendo um maior efeito observado no caso da proteína não polimerizável (Mak *et al.*, 1983; Heeley *et al.*, 1987, Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Willadsen *et al.*, 1992). Os dados são consistentes com os experimentos de co-sedimentação, onde a presença de Tn promoveu a ligação de nfTm à actina e, conseqüentemente sua co-sedimentação (Figura 15, painel 29). Na Figura 16B são apresentados os resultados de experimentos de co-sedimentação realizados a 150 mM de NaCl. Conforme esperado para nfTm (Figura 15B, painel 28), nenhum dos mutantes não polimerizáveis foi capaz de ligar-se a actina em ausência de Tn (Figura 16B), porém a ligação de Tn (+/- Ca^{2+}) promoveu a ligação dos mutantes não polimerizáveis de Tm (Figura 16B) como ocorre com nfTm (Figura 15B, 29 e 30). Esses resultados demonstram que a inserção das sondas não comprometeu grandemente a capacidade dos mutantes de nfTm de ligarem-se à actina e Tm.

A ligação de Tn promove um decréscimo equiparável nas intensidades de fluorescência dos mutantes AS263(5OHW) e nf263(5OHW) (para 89% e 87%, respectivamente, a 1 μM de Tn e 1 μM de Tm) (Figura 18, 3A e Figura 29, 2A). Tal observação indica que o mutante não polimerizável

mantém habilidade de ligar-se à troponina, mesmo em ausência de actina. Essa idéia é consistente com estudos de ligação de fragmentos de Tm à Tn, que demonstram que a região C-terminal da Tm liga-se à Tn (Pato & Smillie, 1978, Pato *et al.*, 1981a, 1981b). Uma questão ainda em aberto refere-se à contribuição da interação cabeça-cauda para a ligação Tm-Tn.

A informação descritas nos parágrafos acima, apresentada na Figura 29, podem ser resumidas em: (i) a região C-terminal dos mutantes não polimerizáveis mantém sua habilidade de ligar-se à Tn, ainda em ausência de actina (Figura 29, 2A); (ii) apesar de menor afinidade, a Tm não polimerizável ainda tem seu espectro perturbado pela ligação de actina em ausência de Tn (Figura 29, 1B), o que indica que há uma pequena ligação e que, talvez, essa pequena variação de fluorescência viabilize o estudo quantitativo dessa interação em condições propícias ; e (iii) o decréscimo da intensidade de fluorescência do mutante AS269(5OHW), promovido pela ligação de Tn (Figura 18, 5A/B), pode estar relatando mudanças na interação cabeça-cauda da Tm induzidas por Tn e não a ligação de Tn propriamente dita, uma vez que o mutante não polimerizável nf269(5OHW) liga-se à Tn (Figura 16B), mas não tem espectro perturbado por essa ligação (Figura 29, 3A).

Essa última constatação (iii) demonstrou-se interessante, uma vez que a proteína não polimerizável, nf269(5OHW) não tem seu espectro perturbado pela presença de Tn (Figura 29, 3A), mas a proteína polimerizável tem sua fluorescência *diminuída* pela Tn, na ausência e na presença de actina (Figura 18, 5A/B). Vale lembrar que o 5-hidroxitriptofano na posição 269 da proteína polimerizável (AS269(5OHW)) tem sua fluorescência *aumentada* quando a proteína é submetida a condições que favorecem a polimerização (Figura 22A). Considerando-se que, pelo menos em ausência de actina, Tn induz a polimerização de Tm, seria esperado que a ligação de Tn a AS269(5OHW) aumentasse intensidade de fluorescência da sonda. O fato sugere que a fluorescência intrínseca de AS269(5OHW) na

interação cabeça-cauda seja maior em ausência de Tn, indicando que essa interação é estruturalmente diferente em presença e em ausência de Tn.

A possibilidade de termos encontrado uma sonda capaz de relatar mudanças na interação cabeça-cauda da Tm mesmo no filamento fino abre a perspectiva de investigações inéditas referentes ao reposicionamento da Tm sobre o filamento fino durante a regulação da contração muscular. Esses resultados são analisados em detalhe na Discussão.

3.7.2. O quanto apenas a região de sobreposição Tm-Tm contribui para a afinidade da Tm por outras proteínas?

Sabemos que nfTm é incapaz de ligar-se à actina e que ASTm liga-se cooperativamente à actina (Monteiro *et al.*, 1994, Landis *et al.*, 1997). Entretanto, não se conhece detalhes das regiões da Tm que se ligam à actina. *Será que essa ligação de Tm à actina requer a forma polimerizada da Tm ao longo do filamento de actina ou será que a região de sobreposição Tm-Tm gera um sítio de alta afinidade para actina?*

Para responder a essa pergunta a aluna de iniciação científica Ângela Mika Katsuyama, sob nossa orientação, construiu e purificou dois novos mutantes de tropomiosina com deleção da região C-terminal: ASTm₁₋₂₆₀ e ASTm₁₋₁₄₂ (Figura 30A). Com base em estudos anteriores, seria esperado que esses fragmentos não se polimerizassem (devido a ausência de um C-terminal funcional) e mantivessem sua capacidade de formar heterodímeros devido à fusão N-terminal Ala-Ser (Figura 30B). A idéia inicial seria a de utilizar as tropomiosinas truncadas para estudar a contribuição do complexo cabeça-cauda da tropomiosina para as interações de Tm com actina - usando nf261(5OHW) -, com troponina - usando nf263(5OHW) -, e a dimerização de Tm - usando nf269(5OHW).

Figura 30: A, Esquema ilustrando as tropomiosinas polimerizável (AS269(5OHw) e contendo o N-terminal não polimerizável(nf269(5OHw), marcadas na posição 269, e os fragmentos construídos por Ângela M. Katsuyama, truncados no C-terminal. B, esquema das interações que prevíamos observar entre os fragmentos e os mutantes fluorescentes.

A Figura 30B apresenta um esquema dos fragmentos truncados no C-terminal de Tm e das interações que esperávamos que ocorresse entre eles e nf269(5OHw). Como será discutido adiante, o fragmento ASTm₁₋₂₆₀, diferentemente do esperado, manteve sua capacidade de polimerização.

3.7.3. A região de interação cabeça-cauda gera um sítio de alta afinidade para actina?

Analisamos o mutante truncado na região C-Terminal, ASTm₁₋₁₄₂. Ensaio de co-sedimentação sugeriram que a presença do fragmento ASTm₁₋₁₄₂ não é capaz de induzir a ligação de nfTm à actina, como mostrado na Figura 31.

Figura 31: Ensaios de co-sedimentação mostram que ASTm₁₋₁₄₂ é incapaz de ligar-se à actina em ausência de Tn, e que sua presença não é capaz de induzir a ligação de nfTm. Amostras analisadas por SDS-PAGE 17%. Condições: nfTm 2 μ M, ASTm₁₋₁₄₂ 4 μ M, Tn 2 μ M e actina 14 μ M em solução de MOPS pH7,0 25 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e NaCl 50 mM.

Figura 32: Influência da dimerização da Tm nos espectros de emissão das nfTms promovidas pela adição de outras proteínas do filamento fino (A). O desenho ao lado (B) esquematiza a sequência de adição de proteínas correspondente aos espectros e a tabela compara as alterações nas intensidades de fluorescência dos mutantes dimerizados (valores em preto) com os mutantes polimerizáveis e não polimerizáveis (valores em vermelho baseados nos dados apresentados nas figuras 13 e 24), observadas após a adição de cada proteína do filamento fino. Condições: 25 mM de MOPS pH7,0, 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 5 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de EGTA (+/- 0,6 mM de CaCl₂). Concentração das proteínas: 1 μ M de nfTm (+/- 1 μ M ASTm₁₋₁₄₂/ 1 μ M de troponina/ 7 μ M de actina. Agitação suave, tempo de equilíbrio: 3 min.

O resultado é consistente com os dados obtidos pelo monitoramento das mudanças da fluorescência dos mutante nf261(5OHW) (Figura 32, painel 1), nf263(5OHW) (Figura 32, painel 2) e nf269(5OHW) (Figura 32, painéis 3 e 4) promovidas pela ligação do fragmento ASTm₁₋₁₄₂, durante a investigação da dimerização da Tm. A Figura 32 mostra que as intensidades de fluorescência de nf261(5OHW) (painel 1) e nf263(5OHW) (painel 2) em presença de actina e Tn, respectivamente, não são alteradas pela ligação do fragmento ASTm₁₋₁₄₂.

O mutante polimerizável marcado na posição 269 (AS269(5OHW)) tem sua fluorescência aumentada quando submetido a condições que favorecem polimerização (Figura 22A), enquanto que sua versão não polimerizável (nf269(5OHW)) não tem sua fluorescência aumentada (Figura 22B). A ligação de ASTm₁₋₁₄₂ à nf269(5OHW) promove um aumento na intensidade da fluorescência de nf269(5OHW) (Figura 32, painéis 3 e 4). Essa observação pode ser interpretada como um indicativo de que ocorre a formação de dímeros (nf269(5OHW) + ASTm₁₋₁₄₂) através de interação cabeça-cauda.

Embora saibamos que a polimerização da Tm influencia fortemente sua ligação com actina e que a ligação de Tn aumenta a polimerização de Tm, nossos dados indicam que a dimerização não altera grandemente a afinidade da nfTm por actina ou Tn (Figura 31). Apesar do SDS-PAGE 17% não fornecer resolução suficiente para distinguir as bandas de ASTm₁₋₁₄₂ e TnC, os ensaios de ligação à actina em ausência de Tn (Figura 31) sugerem fortemente que a simples dimerização não induz a ligação de nfTm à actina.

Esses resultados indicam que, nas condições utilizadas nos experimentos representados nas figuras 31 e 32, a mistura nfTm+ASTm₁₋₁₄₂ contém uma fração de dímeros. Os resultados sugerem que a *simples interação cabeça-cauda não gera um sítio de alta afinidade pela actina*.

Os dados apresentados na Figura 32 (painéis 3 e 4) aparentemente contradizem os dados apresentados na Figura 18 (painel 5). Observamos uma *diminuição* (-14%) na intensidade de fluorescência do mutante sob a

forma de polímero -AS269(5OH)W – (Figura 18.5). Por outro lado, a ligação de Tn ao dímero, nf269(5OH)W + ASTm₁₋₁₄₂, promoveu um *aumento* (+13%) na intensidade de fluorescência do mutante marcado (Figura 32, 3 e 4). Os painéis 3 e 4 da Figura 32 demonstram um pequeno, mas repetitivo, aumento na intensidade de fluorescência (7%) de nf269(5OH)W em presença do fragmento ASTm₁₋₁₄₂, que foi interpretado como uma resposta da sonda à dimerização da Tm. O painel 4 mostra que esse *aumento é intensificado* em presença de Tn, enquanto havíamos observado uma *diminuição* na fluorescência de AS269(5OH)W causada pela ligação de Tn (Figura 18.5). Esse aparente duplo-efeito da ligação de Tn sobre o espectro do 5-hidroxitriptofano, localizado na posição 269 da Tm, quando sob a forma de dímero ou de polímero, é analisado na Discussão (seção 4.5) e pode ser resolvido se assumirmos que a fluorescência intrínseca do complexo cabeça-cauda-Tn é intermediária entre a sonda no ambiente livre e polimerizada.

3.7.4. Um novo C-terminal que mimetiza o sítio de interação cabeça-cauda de maior afinidade que o da ASTm?

Surpreendentemente, o mutante ASTm₁₋₂₆₀, cujo truncamento na região C-terminal supostamente tornaria a proteína incapaz de polimerizar-se, apresentou uma viscosidade muito maior que ASTm, como é mostrado na Figura 33. Inicialmente, tentamos analisar a viscosidade do mutante nas mesmas concentrações utilizadas na Figura 25 (8 µM). Entretanto, a alta viscosidade do mutante inviabilizou as medidas (dados não mostrados), consequentemente, as medidas foram realizadas em menores concentrações de proteína (4 µM) (Figura 33).

A interação cabeça-cauda, que é responsável pela polimerização da Tm, é regida predominantemente por interações eletrostáticas. Já em 1975, McLachlan e Stewart atentaram para o fato de que o N- e o C-terminais da Tm apresentam uma alta concentração de aminoácidos positivos e negativos, respectivamente, e propuseram algumas interações para

estabilizar essa ligação (ver Discussão). Ao analisarmos a nova extremidade C-terminal criada pela mutação, observamos uma concentração de cargas negativas maior que o observado para Tm. Sugerimos que a mutação estaria gerando um novo sítio de interação cabeça-cauda, com maior afinidade que o tipo selvagem. Esses resultados são analisados em detalhe na Discussão deste trabalho e novos experimentos de caracterização desse mutante estão sendo realizados pela aluna Ângela Mika Katsuyama.

Figura 33: Ensaios de viscosidade do mutante truncado $ASTm_{1-260}$ em comparação com a proteína inteira polimerizável $ASTm$. Condições: Tm 4 μM em solução de imidazol pH 7,0 10 mM e DTT 2 mM. Todas as amostras foram pre-equilibradas por 7 h a 25°C.

Ensaios de ligação à actina demonstraram que $ASTm_{1-260}$, apesar de polimerizável é incapaz de ligar-se à actina. A Figura 34 apresenta o resultado de ensaios de ligação de $ASTm_{1-260}$ à actina. Esse resultado é consistente com a idéia vigente na literatura de que Tm apresenta sete sítios de ligação à actina, que corresponderiam às sete repetições de ~39,5 aminoácidos propostas por McLachlan e Stewart (1976). É esperado que a deleção dos últimos 24 aminoácidos em uma tropomiosina polimerizável promova o deslocamento dos sítios de ligação à actina ao longo do filamento fino.

O SDS-PAGE 17% não fornece resolução suficiente para que possamos investigar o pequeno aumento observado na intensidade da banda de $ASTm_{1-260}$ no pellet, em presença de Tn e na ausência de cálcio (Figura 34), que pode estar indicando que Tn induz a ligação desse fragmento de Tm à actina. A ligação poderia ser melhor observada caso utilizássemos excessos estequiométricos de $ASTm_{1-260}$ e Tn.

Figura 34: SDS-PAGE 17% dos ensaios de co-sedimentação mostram que ASTm₁₋₂₆₀ é incapaz de ligar-se à actina em ausência de Tn, e que a ligação de Tn não promove a ligação de ASTm₁₋₂₆₀ à actina como ocorre com nfTm. Uma vez que ASTm₁₋₂₆₀ sedimenta sozinha em 50 mM de NaCl, os experimentos foram realizados em 150 mM NaCl. Condições: Tm 2 μ M, Tn 2 μ M e actina 14 μ M em solução de MOPS pH7,0 25 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e NaCl 150 mM.

4. DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES

Análogos de triptofano incorporados em uma proteína podem ser seletivamente excitados em sistemas contendo outras proteínas que possuam triptofano. Uma dificuldade encontrada nesse tipo de análise reside no fato de que a resposta da sonda limita-se ao microambiente no qual esta encontra-se inserida. Existe, todavia, o risco de não serem obtidas sondas sensíveis à uma determinada ligação, mesmo quando posicionadas na região de ligação. Essa dificuldade é convertida em vantagem quando localizamos regiões na proteína que se ligam a várias proteínas, mas cuja sonda é seletivamente sensível à ligação de apenas um dos ligantes.

Analizamos a sequência da Tm visando encontrar uma região na qual o 5-hidroxitriptofano (incorporado na proteína) tivesse sua fluorescência sensível a interações entre Tm e outras proteínas do filamento fino. O objetivo seria investigar essas interações utilizando condições nas quais Tm encontra-se polimerizada e a atividade ATPásica pudesse ser medida. Pelo menos três razões direcionaram nossa escolha para a marcação da região C-terminal da Tm (261-269): (1) o fato de que esta liga-se com alta afinidade à Tn, mas não se encontra na região de regulação do sistema muscular por cálcio. Estudos publicados anteriormente geralmente utilizaram sondas de fluorescência covalentemente ligadas a Cys na posição 190, que é a região onde se liga o domínio regulatório da Tn (para revisão vide Zot & Potter, 1987; Farah & Reinach, 1995; Tobacman, 1996; Gordon *et al.*, 2000). (2) Estudos anteriores sugeriram que essa região é especializada para a ligação de Tn, baseados no fato de que essa região é codificada por exons alternativos específicos para músculos estriados e na alta identidade entre o exon 9a de genes α e β (Hammel & Hitchcock-DeGregori, 1996). (3) Os resultados de nossas análises de várias sequências de Tm mostraram que a sequência (altamente conservada) nessa região apresenta um padrão de

polaridade/hidrofobicidade atípico para estruturas *coiled-coil* (vide Resultados).

Demonstramos que a intensidade de fluorescência de AS263(5OH)W é seletivamente sensível à ligação de troponina e a de AS261(5OH)W é seletivamente sensível à ligação de actina. AS262(5OH)W é sensível à ligação de actina e troponina, porém apresenta problemas de solubilidade (Figura 14). AS269(5OH)W é sensível à interação cabeça-cauda entre moléculas de Tm, mesmo em presença de Tn, e à ligação de actina e, finalmente, AS267 (5OH)W mostrou ser insensível à ligação de ambas as proteínas.

4.2. ESTUDO QUANTITATIVO DA INTERAÇÃO DE Tm E Tm.ACTINA À TN

Encontramos, em uma mesma região da Tm, posições nas quais a fluorescência da sonda é sensível à ligação de troponina (AS263(5OH)W) - mas não à ligação de actina - ou é sensível à ligação de actina (AS261(5OH)W) - mas não à ligação de troponina. Esse fato abre a perspectiva de obtermos dados experimentais para todos os equilíbrios de ligação de tropomiosina à actina e troponina, conforme mostrado no esquema da Figura 35 - baseado na figura 6 da publicação de Fisher e colaboradores (1995).

Figura 35: : Esquema dos equilíbrios das interações na montagem do filamento fino. Titulações dos mutantes AS263(5OH)W e AS261(5OH)W com troponina e actina, respectivamente, em presença e ausência de actina e troponina, respectivamente, e cálcio, poderão fornecer dados experimentais para a obtenção de todas as constantes de afinidade desse esquema.

Esse tipo de estudo já foi realizado com tropomiosina cardíaca extraída de boi (Fisher *et al.*, 1995), que corresponderia a aproximadamente 90% da isoforma α / 10% da isoforma β , marcada na região Cys-190 com N-(1-pireno)iodoacetoamida. Nesse trabalho, os autores fizeram uma análise da ligação de pireno-Tm com troponina e actina purificadas de músculo esquelético de coelho e alguns fragmentos de TnT de rato, através de ensaios de fluorescência. Em 1996, Hammel e Hitchcock-DeGregori estudaram as interações de mutantes de α -Tm de músculo liso - com inserção e substituição do exon 9a e/ou do exon 6b (específicos para isoformas esqueléticas) - com actina e/ou com troponina. Esse estudo utilizou experimentos de ultracentrifugação para investigar as interações Tm-actina e sensor BIAcore para medir ligação da tropomiosina em solução à TnT imobilizada. Nenhum dos trabalhos acima citados conseguiu estudar diretamente todos os equilíbrios da Figura 35.

Titulações fluorimétricas de mutantes contendo um resíduo de 5-hidroxitriptofano possuem a vantagem de fornecer medidas diretas de uma sonda intrínseca à proteína. Outra vantagem do nosso sistema de estudo é a utilização de proteínas recombinantes, inclusive a α -tropomiosina esquelética funcional – ASTm (Monteiro *et al.*, 1994), que nos permite estudar apenas uma isoforma (α). Antes de propor experimentos de titulação para a obtenção das constantes que compõem esse ciclo termodinâmico, testamos a viabilidade do método através da titulação de AS263(5OHW) com Tn. Optamos por investigar primeiramente a interação AS263(5OHW).Tn, que foi a que promoveu a menor variação de fluorescência, nas condições utilizadas nos experimentos de caracterização da fluorescência dos mutantes (vide Figura 28).

Foi obtido o valor de $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 4,7 \times 10^5$) para a afinidade AS263(5OH)W por troponina, em ausência de cálcio, em 50 mM de NaCl. Fisher e colaboradores (1995) obtiveram um valor de $2,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ($\pm 4,7 \times 10^6$) para a afinidade direta de troponina de coelho por Tm bovina, marcada com N-(1-pireno)iodocetamida na posição 190 (condições: 3 mM de MgCl_2 ,

60 mM de KCl, 5 mM de Tris-Cl pH 7,0, 0,1 mM de DTT e 500 μ M de EGTA). Em estudos anteriores, Dahiya e colaboradores (1994) obtiveram um valor de $1,0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ (condições: 3 mM de MgCl_2 , 60 mM de KCl, 5 mM de Tris-Cl pH 7,5, 0,1 mM de DTT e 500 μ M de EGTA) utilizando Tm cardíaca bovina marcada com N-(1-pireno)iodocetamida na posição 190.

Esses valores são quase 10 vezes maiores do que o valor obtido por nós. Essa discrepância pode ser devida à diferença entre os sistemas utilizados e às modificações introduzidas nas proteínas em ambos os casos. Nossas sondas são intrínsecas à proteína e estão inseridas na região C-terminal da Tm. Vale enfatizar que o pireno, utilizado nos estudos de Fisher *et al.* e de Dahiya *et al.*, é uma sonda mais volumosa que o 5-hidroxitriptofano. A posição 190, ocupada pela cisteína a qual o pireno encontra-se covalentemente ligado, localiza-se no centro hidrofóbico da estrutura *coiled-coil* da Tm (posição *a* da repetição heptapeptídica), em uma região de interações Ca^{2+} específicas com troponina (Pearlstone & Smillie, 1983). Não podemos ainda descartar a hipótese de que a sonda na posição 263 da Tm diminua a afinidade da interação Tm-Tn. De fato, os experimentos de co-sedimentação apresentados na Figura 21 evidenciam que sonda nessa posição interfere na ligação do fragmento TnT₇₇₋₁₅₇ à AS263(5OHW). Por outro lado, essa interferência se dá na região cuja interação com Tn é independente das concentrações de cálcio. Podemos, então considerar relevantes as diferenças observadas (ou a ausência das mesmas) entre as constantes de afinidade da ligação AS263(5OHW)-Tn, em presença e em ausência de cálcio (Figura 28).

Em presença de actina, foi obtido um valor para a constante de afinidade da ligação Tm-Tn de $5,3 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ($\pm 2,2 \times 10^7$), em ausência de cálcio, e de $4,3 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ($\pm 1,4 \times 10^7$), em presença de cálcio. Esse valor não foi ainda obtido diretamente por outros autores, mas ambos os grupos citados anteriormente calcularam $K > 10^8 \text{M}^{-1}$ para a ligação de Tn à Tm-actina independente das concentrações de cálcio.

A obtenção de valores experimentais para o ciclo termodinâmico esquematizado na Figura 35 pode auxiliar grandemente na compreensão dos mecanismos que regem a montagem e os processos cooperativos envolvendo o filamento fino (para revisão ler Tobacman, 1996). Sabe-se que o complexo Tm.Tn liga-se à actina com maior afinidade que Tm ou Tn isoladas. Entretanto, estudos de equilíbrio da montagem do filamento fino sugerem que, apesar de induzir a polimerização da tropomiosina, a Tn não promove aumento na cooperatividade da ligação da tropomiosina ao filamento fino (Hill *et al.*, 1992, Fisher *et al.* 1995). Esses estudos utilizaram Tm marcada radioativamente com complexo Tn reconstituído com o fragmento T2 (Hill *et al.*, 1992) e Tm marcada com pireno na posição 190 (Fisher *et al.*, 1995).

A investigação seletiva de uma interação no contexto do filamento fino regulado nos permitirá buscar uma condição na qual todas essas interações possam ser analisadas utilizando uma mesma técnica. Essa normalização de condições provavelmente viabilizará uma análise quantitativa da influência de cada ligação nas interações com as outras proteínas.

4.3. MAPEAMENTO DA INTERAÇÃO TROPOMIOSINA (RESÍDUO 263)/TROPONINA

Já se sabia que a região C-terminal da Tm interage com a região T1 da TnT (aminoácidos 1-157) (Flicker *et al.*, 1982). Estudos anteriores demonstraram que a região da Tm envolvida nessa interação é delimitada pelos aminoácidos 190-284 (Pato *et al.*, 1981b) e Hammell e Hitchcock-DeGregori (Hammell & Hitchcock-DeGregori, 1996) mostraram que os resíduos 258-275 de Tm de músculo esquelético são críticos para a ligação de Tm-Tn à actina.

De acordo com estudos anteriores (Jackson *et al.*, 1975, Pearlstone & Smillie, 1981, Flicker *et al.*, 1982), nossos resultados demonstraram que a região entre os resíduos 77-157 (CB2) da TnT é um sítio de ligação à ASTm, porém essa interação é afetada pela presença do 5-hidroxitriptofano na

posição 263 (Figura 21). Entretanto, os ensaios de fluorescência de AS263(5OHW), utilizando fragmentos de TnT, sugerem que a interação do mutante com essa região da TnT é estabilizada pelos aminoácidos vizinhos à CB2, ao longo da sequência primária da TnT (Figura 20). A hipótese de que CB2 (resíduos 77-157) interage com Tm de uma maneira inespecífica e que a especificidade da ligação de TnT (resíduos 1-157) à Tm é conferida pela região CB3 (resíduos 1-76) foi sugerida por Brisson e colaboradores em 1986. No referido trabalho, os autores observaram que CB2 interage fraca e inespecificamente com Tm, enquanto a interação de T1 com Tm é mais forte e mais específica. Nossos resultados demonstraram que os resíduos 158-191 tiveram um efeito similar a CB3 na estabilização da interação de CB2 com Tm, no que se refere ao aumento da afinidade da interação. Entretanto, o fato da mutação na posição 263 abolir a interação de CB2 com ASTm, enquanto os outros fragmentos maiores mantém a habilidade de ligar-se ao mutante, indica que a interação é altamente específica.

4.4. ESTUDO QUANTITATIVO DA POLIMERIZAÇÃO DA TROPOMIOSINA

Existem poucos trabalhos na literatura nos quais foram obtidos dados quantitativos referentes à interação cabeça-cauda entre moléculas de Tm. Medidas quantitativas da dependência entre essa interação e a força iônica do meio não haviam sido realizadas, provavelmente devido a dificuldades em distinguir a interação cabeça-cauda de outras possíveis agregações entre moléculas de Tm. A especificidade da fluorescência de um de nossos mutantes de tropomiosina à interação cabeça-cauda foi demonstrada nesse trabalho e foi utilizada como ferramenta para a investigação quantitativa da interação cabeça-cauda.

Medidas quantitativas da termodinâmica da interação cabeça-cauda da Tm são importantes para a interpretação de curvas de ligação de Tm e outras proteínas do filamento fino, especialmente porque mutações ou modificações que influenciam na habilidade de polimerização da Tm também afetam sua ligação a Tn e actina (Mak *et al.*, 1983; Johnson & Smillie, 1977;

Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987; Monteiro *et al.*, 1994). As interações da Tm com essas proteínas são altamente dependentes da força iônica. Logo, uma investigação do quanto a termodinâmica da polimerização da Tm depende da força iônica é também importante.

Nesse trabalho desenvolvemos uma nova abordagem que permitiu estudar quantitativamente a polimerização cabeça-cauda da Tm. Inicialmente, identificamos um mutante de α -tropomiosina esquelética, com 5-hidroxitriptofano na posição 269, cuja fluorescência relata se a extremidade C-terminal da proteína encontra-se ou não envolvida em interação cabeça-cauda com outra molécula de Tm. Chegamos a essa conclusão a partir de linhas de evidência independentes: i) a fluorescência da sonda (normalizada para a concentração de Tm) é sensível à concentração total da proteína, conforme esperado para o fenômeno de polimerização linear. ii) a fluorescência da sonda é sensível a variações na força iônica, de maneira paralela à dependência da viscosidade da Tm em relação à força iônica. iii) a sensibilidade da sonda, localizada na extremidade C-terminal da Tm, depende da presença de uma fusão dipeptídica Ala-Ser na extremidade N-terminal da molécula, a cerca de 40 nm da sonda. Essa fusão dipeptídica é necessária para a polimerização da Tm esquelética recombinante expressa em *E. coli* (Figura 25A e Monteiro *et al.*, 1994)

O 5-hidroxitriptofano na posição 269 localiza-se a 15 resíduos da extremidade C-terminal da molécula, o que corresponde a uma distância de aproximadamente 2,3 nm. Várias linhas de evidência indicaram que a interação cabeça-cauda envolve aproximadamente 9 resíduos da região N-terminal e 9 resíduos da região C-terminal (McLachlan & Stewart, 1975, Phillips *et al.*, 1979). Uma vez que utilizamos uma Tm com dois aminoácidos extras na extremidade N-terminal, é esperado que a sobreposição em ASTm e ASTm269(5OHW) envolva os onze primeiros e últimos resíduos das cadeias do polipeptídeo. Conseqüentemente, no estado polimerizado, a

sonda na posição 269 encontra-se a apenas a uma volta α -helicoidal do α -amino-terminal da segunda molécula de Tm.

Existem vários possíveis mecanismos pelos quais essa proximidade pode modificar diretamente o micro-ambiente no qual a sonda está inserida e por meio disso modificar seu sinal de fluorescência, incluindo efeitos diretos no campo eletromagnético, a formação e/ou o rompimento de pontes de hidrogênio envolvendo a sonda, mudanças conformacionais na estrutura *coiled-coil* local e mudanças na flexibilidade conformacional. É interessante observar que a fluorescência de outros mutantes com o 5-hidroxitriptofano localizado a poucos aminoácidos da posição 269 (posições 267, 263 e 261), apresenta-se insensíveis à polimerização da Tm (Sousa & Farah, 2001). Isso sugere que qualquer mudança estrutural na *coiled-coil* induzida pela polimerização da Tm deve ser limitada às extremidades N- e C-terminais da molécula. Certamente, uma vez que apenas um pequeno número de sondas foi testado, o comportamento das sondas em outras posições da molécula pode obrigar-nos a, futuramente, reformular essa sugestão.

A sensibilidade da sonda ao estado polimerizado da extremidade C-terminal da molécula, na qual esta encontra-se ligada, nos permitiu determinar quantitativamente a fração de moléculas de Tm envolvidas na interação cabeça-cauda, sob condições nas quais a concentração total de Tm e a força iônica são modificadas. Conforme descrito em Materiais e Métodos, esses dados foram analisados de acordo com a teoria da polimerização linear (Oosawa & Kasai, 1962, Cantor & Schimmel, 1980) para calcular as constantes de associação intrínsecas da interação cabeça-cauda em função da força iônica, assim como o tamanho médio do polímero e a distribuição dos tamanhos do polímero. Uma questão válida, referente aos nossos dados, seria em que extensão as modificações introduzidas covalentemente na estrutura da Tm (fusão dipeptídica N-terminal e 5-hidroxitriptofano na posição 269) afetam a termodinâmica da interação cabeça-cauda, quando comparadas com a proteína do tipo selvagem. Acreditamos que esses efeitos devam ser relativamente pequenos, uma vez

que o 5-hidroxitriptofano não afeta o comportamento da ASTm em ensaios de viscosidade (Figura 25 A), e que ASTm é essencialmente indistinguível da Tm de músculo esquelético de galinha em ensaios de viscosidade, de ligação à actina e de Mg^{2+} -ATPase da actomiosina (Monteiro *et al.*, 1994).

Existem poucos relatos na literatura com os quais pudemos comparar nossos resultados. Asai (1961), medindo a birefringência elétrica em função da concentração de Tm de coelho, obteve um valor para K de aproximadamente $0,5-1 \times 10^5 M^{-1}$ em forças iônicas menores que 0,02. A extrapolação linear dos nossos resultados na Figura 27 para essas condições prediz uma constante de associação maior que $10^8 M^{-1}$, um valor consistente com a observação de que Tm 8 μM encontra-se significativamente polimerizada sob essas condições (veja pontos a 0 e 20 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, pH 7,0, na Figura 25A). Ooi e colaboradores (1962) mediram o espalhamento de luz de soluções de Tm para calcular um valor de aproximadamente $1,2 \times 10^5 M^{-1}$ a $I = 0.1$, que é consistente com o valor de $2,5 \times 10^5 M^{-1}$ calculado por nós para essa força iônica. Ooi e colaboradores (1962) também determinaram um K de $2 \times 10^4 M^{-1}$ a 1 M de sal. Apesar de não termos realizado experimentos a essa força iônica, o exame da dependência entre valores de K e a força iônica, apresentada na Figura 27, sugere um K com valor bem inferior a esse, a $I=1,0$.

Sano e colaboradores (2000) estudaram as propriedades de polimerização de tropomiosinas com Ser ou Glu na posição 283. Essas tropomiosinas não truncadas apresentaram diferentes viscosidades em baixa força iônica. Por outro lado, análise de sedimentação em equilíbrio de proteínas recombinantes correspondentes aos seus fragmentos N- e C-terminais forneceram essencialmente os mesmos valores para K, a $I = 0.043$ (Fosfato de potássio a 20 mM, pH 7,0): $2-4 \times 10^4 M^{-1}$. Esse valor é significativamente menor que o obtido em nossos estudos ($K = 2,5 \times 10^7 M^{-1}$ a $I = 0,043$, Figura 27). Além do mais, enquanto todas as tentativas anteriores de calcular K para a interação cabeça-cauda forneceram valores

muito similares ($2 \times 10^4 - 1.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) sob uma ampla faixa de força iônica (0.01 to 1.0), nossos resultados indicaram uma sensibilidade extremante alta para a força iônica: por exemplo, observamos entre $I = 0.045$ e 0.095 um decaimento do valor de K de quase de duas ordens de grandeza (Figura 27A).

Esse é o primeiro trabalho no qual a constante de associação para a interação cabeça-cauda da Tm foi explicitamente calculada em um grande número de forças iônicas. A teoria limitante de Debye-Huckel prediz uma forte dependência da força iônica para interações dominadas por forças eletrostáticas e é consistente com a relação linear entre $\log K$ e $I^{0.5}$, em uma menor faixa de força iônica observada na Figura 27B. Essa relação ($\log K = 11.1 - 18.0[I]^{0.5}$) nos permite estimar K em qualquer força iônica dentro dessa faixa. Finalmente, esse resultado pode ser combinado com a equação 7 e $f_o = \langle i \rangle^{-1}$ para descrever explicitamente a interdependência de $\langle i \rangle$, K e a concentração total de Tm (λ_{tot}). A Figura 36 apresenta essa relação como uma superfície tridimensional.

Figura 36: A e B: Dependência do tamanho médio do polímero $\langle i \rangle$ como uma função da força iônica do meio e da concentração total de Tm. A superfície é descrita pela combinação da equação 7, $f_o = \langle i \rangle^{-1}$, e a relação linear entre $\log K$ e $I^{0.5}$ obtida experimentalmente e demonstrada na Figura 27. O código de cores na legenda refere-se as diferenças no valor de $\langle i \rangle$. Os valores de $\langle i \rangle$ são mais precisos para força iônica na faixa de 0.05 - 0.1, mostrados no gráfico B (veja discussão no texto). A cor roxa indica que $\langle i \rangle = 1$.

Essa figura mostra claramente o como a força iônica e a concentração de Tm se combinam para influenciar no tamanho médio do

polímero. A extrapolação extensiva das condições observadas na Figura 27 deve ser empregada com cautela, uma vez que mudanças conformacionais na T_m induzidas pela força iônica podem resultar em significantes desvios da curva. Acrescente-se a isso o fato que a relação entre $\log K$ e $I^{0.5}$ provavelmente não seja linear em uma larga faixa de força iônica (Pitzer & Mayorga, 1973, Highsmith, 1997, Song & Pedersen, 2000), especialmente para interfaces irregulares e heterogêneas, como no caso de superfícies protéicas.

A relação entre a termodinâmica da ligação da proteína e a força iônica pode ser interpretada em termos de lei de Debye-Hückel estendida para o ganho de informações sobre a carga efetiva na interface da interação (Song & Pedersen, 2000). Nesse caso, $\log K = \log K_0 + 2Az_Nz_C I^{0.5}/(1+rBI^{0.5})$, onde K_0 é a constante de associação a $I=0$, z_N e z_C são a rede efetiva de cargas na interface N- e C-terminal que estão envolvidas na interação, r é a distância efetiva entre interfaces carregadas, e A e B são constantes termodinâmicas ($A = 0.509$, $B = 3.291 \text{ nm}^{-1} \text{ M}^{-0.5}$ a 298 K) (Nolte *et al.*, 1980, Song & Pedersen, 2000). Os dados da Figura 27 foram ajustados para essa equação para obter valores para K_0 e o produto z_Nz_C sob a faixa de valores para r entre 0 e 10 Å (Figura 37).

Figura 37: Relação entre a distância e a quantidade de cargas efetivas envolvidas na interação cabeça-cauda da Tm. O gráfico foi obtido substituindo os valores de r para calcular os valores de z_Nz_C , confrontando a equação obtida experimentalmente $\log K = 11.1 - 18.0[I]^{0.5}$ com a equação teórica baseada na equação de Debye-Hückel $\log K = \log K_0 + 2Az_Nz_C I^{0.5}/(1+rBI^{0.5})$

Se assumirmos que r é zero, o valor absoluto do produto da carga efetiva na interface corresponde a 18 esu^2 e $\log K_0$ é 11,1. Esses valores

aumentam para aproximadamente 36 esu^2 e 13, respectivamente, quando assumimos que r é um valor mais verossímil de 5 Å e 61 esu^2 e 15 quando assumimos que r é 10 Å.

Os 15 primeiros e últimos resíduos de ASTm são ASMDAIKKKMQMLKL... e ...ISEELDHALNDMTSI-COO⁻, respectivamente. É esperado que a sobreposição cabeça-cauda da tropomiosina envolva aproximadamente 9 aminoácidos tanto do N- quanto do C-terminal das cadeias polipeptídicas da Tm (McLachlan & Stewart, 1975). Contudo, pontes salinas intermoleculares poderiam envolver resíduos de uma volta helicoidal anterior e posterior à região de sobreposição das moléculas. Conforme mencionado acima, no caso da ASTm, pode-se esperar que a fusão Ala-Ser estenda essa sobreposição para 11 resíduos (sublinhados acima). Um dímero dos primeiros 11 resíduos N-terminais tem 8 cargas positivas e 2 negativas (incluindo o grupamento α -amino) enquanto o C-terminal do dímero tem 6 cargas negativas (incluindo o grupamento carboxiterminal). Além disso, resíduos de lisina e glutamato podem ser encontrados nas regiões imediatamente anterior e posterior à região de sobreposição propriamente dita. Por essa razão, os N- e C- terminais têm várias cargas potencialmente disponíveis para a formação de pontes salinas entre o N-terminal altamente carregado (positivamente) e o segmento C-terminal altamente carregado (negativamente). O número de cargas é mais que o necessário para resultar no valor de $|z_N z_C|$ de pelo menos 18 esu^2 , como nós observamos.

2

N-terminal

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d
M	D	A	I	K	K	K	M	Q	M	L

C-terminal

274	275	276	277	278	279	280	281	283	284
a	b	c	d	e	f	g	a	b	c
L	D	H	A	L	N	D	M	T	S

3

Figura 38: (1). Diagrama esquemático das interações cabeça-cauda propostas por McLachlan e Stewart (1975). A figura acima esquematiza a sobreposição das duas cadeias N- e C-terminais da Tm. Os planos A e B facilitam a interpretação da figura original (i) e (ii). O plano lateral (A) permite a visualização da interface entre as cadeias N- e C-terminais na figura (i). Na parte (i), a parte superior (O) apresenta os aminoácidos C-terminais da Tm e a inferior (◇) apresenta os aminoácidos N-terminais. As duas cadeias de cada terminal são diferenciadas pela fonte (negrito ou não). As pontes salinas são representadas por linhas pontilhadas (Observe as pontes salinas propostas entre His276-Asp2, Asp280-Lys6 e Ile284(COO⁻)-Lys7). Contatos de van der Waals são representadas pelas linhas contínuas. A parte (ii) apresenta as mesmas interações observadas pelo plano horizontal (B).

(2) Sequências N- e C- terminais da Tm com as posições estruturais da coiled coil indicadas.

(3) O painel A apresenta o modelo proposto por nós para a interação cabeça-cauda, adicionando ao modelo de McLachlan e Stewart a possibilidade de uma rede de interações iônicas interdependentes (Asp2, Lys5,Lys6)/ (His276,Asp280) e da formação de uma ponte salina entre Lys-12 e Ile284(COO⁻) da outra cadeia C-terminal. As cadeias N- e C-terminais são representadas em rosa e azul claro, respectivamente. Os resíduos que participam das pontes salinas são apresentados no modelo de traço e bolas, sendo indicados em branco os resíduos propostos em nosso modelo, cuja participação em pontes salinas não havia sido sugerida por McLachlan e Stewart. Os grupos positivamente e negativamente carregados, que seriam responsáveis pela formação de pontes salinas, são coloridos em azul escuro e vermelho escuro, respectivamente. O triptofano na posição 269 é indicado em amarelo. Os painéis B e C apresentam a superfície da interação no plano lateral e transversal da coiled-coil. O modelo foi construído utilizando o programa Insight II, utilizando como moldes as estruturas da Tm recentemente resolvidas por RMN e difração de raio-X (Greenfield et al, 1998, Brown et al., 2001).

Na realidade, McLachlan e Stewart (1975) apresentaram um modelo para a sobreposição cabeça-cauda da Tm envolvendo 9 aminoácidos de cada terminal polipeptídico, que interagiriam através das faces da estrutura coiled-coil. Nesse modelo, os autores propuseram três pontes salinas intramoleculares específicas envolvendo os seguintes pares de resíduos: His276-Asp2, Asp280-Lys6 e Ile284(COO⁻)-Lys7 (Figura 38, painel 1). Essas pontes salinas forneceriam um valor máximo de 9 esu² para $|z_N z_C|$, menor que o valor mínimo de 18 esu², obtido e calculado a partir de nossos resultados. Construímos este modelo molecular da interação cabeça-cauda da Tm, com base na estrutura recentemente resolvida da Tm (Whitby & Phillips, 2000, Brown et al., 2001). Observamos a possibilidade de algumas interações em adição às pontes salinas propostas por McLachlan e Stewart (1975). A cadeia lateral positivamente carregada da Lys12 pode apontar em direção ao N-terminal de sua cadeia polipeptídica para formar uma ponte salina com ao segundo carboxilato C-terminal da molécula adjacente. Nosso

modelo também prediz que a cadeia lateral dos resíduos His276, Asp 280 de uma cadeia polipeptídica e Asp 2, Lys5, and Lys6 da outra podem formar uma rede de interações iônicas interdependentes intramolecular e intermoleculares, que existiriam apenas no contexto do complexo cabeça-cauda (Figura 38, painél 2). A possibilidade de que os resíduos Lys6 e Lys12 formassem pontes salinas importantes na estabilização da interação cabeça-cauda já havia sido suscitada por Mak e colaboradores, em 1978. Nenhuma das possíveis interações iônicas sugeridas nesse trabalho (todas elas admitindo distâncias interiônicas menores que 5 Å) depende da presença da fusão dipeptídica N-terminal. Essas possibilidades aumentariam o número total de íons interagindo para 4 íons negativamente carregados mais 5 íons positivamente carregados, aumentando o valor de $|z_N z_C|$ para 20 esu^2 . As interações iônicas sobre a faixa de 10 Å aumentariam o número de íons, cujas interações seriam responsáveis pela sensibilidade da T_m à força iônica. Porém, uma compreensão definitiva dessa alta sensibilidade aguarda a determinação da estrutura do complexo cabeça-cauda através de espectroscopias de NMR de alta resolução ou cristalografia de raio X.

Finalmente, nesse trabalho identificamos um mutante de Tm cuja fluorescência relata se o C-terminal da molécula está ou não envolvido na interação com o N-terminal de outra molécula de Tm. Utilizamos essa propriedade para medir a constante de afinidade (K) dessa interação em várias forças iônicas e constatamos que K diminui em quase de duas ordens de grandeza sob uma variação de 50 mM nas concentração de sal (entre $I=0,045$ e $I=0,095$). Essa alta dependência da força iônica significa o envolvimento de um grande número de resíduos carregados em interações iônicas na interface cabeça-cauda. Nossa análise permitiu a estimativa do tamanho médio do polímero sob uma condição específica. Como Tm interage com actina, troponina e talvez miosina, esse parâmetro pode ser muito importante para a análise de curvas de ligação de Tm e ajudar na interpretação da termodinâmica e cooperatividade da montagem do filamento fino e de transições estruturais induzidas pela ligação de cálcio e miosina.

4.5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO Tm-Tm NA AFINIDADE ENTRE Tm E OUTRAS PROTEÍNAS DO FILAMENTO FINO

Produzimos versões não polimerizáveis de Tm marcadas (posições 261, 263 e 269) com 5-hidroxitriptofano. Comparando a perturbação dos espectros dos mutantes de ASTm e nfTm, em presença das proteínas do filamento fino, pudemos analisar qualitativamente a influência da polimerização da Tm nas interações da região C-terminal da Tm com essas proteínas.

A partir dos espectros de nf263(5OHW) (Figura 29) demonstramos que, mesmo não polimerizada, a região próxima ao resíduo 263 da Tm ainda interage especificamente com TnT, em presença e ausência de actina e cálcio (Figura 29, painel 2). Esse resultado é consistente com a observação de Pato e colaboradores (1981) de que o fragmento proteolítico (DTNB/KCN) correspondendo à metade C-terminal da Tm (190-284), liga-se ao fragmento CB1 da TnT. Em contraste, em ausência de actina, o 5-hidroxitriptofano na posição 269 da Tm não polimerizável (nf269(5OHW)) não teve seu espectro perturbado pela ligação de Tn (Figura 29, painel 3), como ocorreu com a Tm polimerizável (AS269(5OHW)) (Figura 18, painel 5A). Os resultados sugeriram que as perturbações observadas no espectro de AS269(5OHW), após a ligação de Tn, refletem modificações no estado de polimerização da proteína. Essa sugestão baseia-se nos seguintes fatos: i) experimentos de fluorescência com nf263(5OHW) demonstraram que, nas condições utilizadas nos ensaios, a proteína não acetilada liga-se à Tn (Figura 29, painel 2); em contraste ii) nf269(5OHW) tem sua fluorescência insensível à ligação de Tn (Figura 29, painel 3). Acreditamos que nf269(5OHW) liga-se à Tn, porém essa ligação não induz a polimerização da proteína. Essa hipótese é consistente com resultados de estudos que demonstraram que a ligação de Tn não promove a polimerização de tropomiosinas não polimerizáveis, produzidas por tratamento enzimático (Ueno *et al.*, 1976) ou por técnicas recombinantes (Cho & Hitchcock-DeGregori, 1991).

É interessante o fato de que a fluorescência intrínseca da sonda no ambiente polimerizado é diferente em presença e em ausência de Tn. Isso é evidenciado pelo fato de que AS269(5OHW) apresenta intensidade de fluorescência menor em presença de Tn. Sabe-se que a ligação de Tn promove a polimerização de Tm e que a sonda na posição 269 tem sua fluorescência intrínseca aumentada (55%) quando envolvida em interação cabeça-cauda, em ausência de Tn. Essa evidência sugere que a sonda encontra-se em ambientes diferentes, quando polimerizada em presença e em ausência de Tn. Pode-se somar o fato de que, na posição 269, a sonda é somente sensível à ligação de Tn quando envolvida na interação cabeça-cauda para fundamentar algumas sugestões. Os dados nos sugerem que a polimerização da Tm, induzida pela ligação de Tn, dá-se por uma interação estruturalmente diferente da polimerização de Tm, em ausência de Tn.

Quando misturamos nf269(5OHW) ao fragmento N-terminal Tm₁₋₁₄₂, observamos um aumento de 7% na fluorescência do mutante a 1 μ M (Figura 32A, painéis 3 e 4). Como foi discutido anteriormente, a sonda na mesma posição do mutante polimerizável (AS269(5OHW)) a 1 μ M tem sua fluorescência aumentada em ~30%. Em ambos os experimentos a concentração de N- e C- terminais que podem formar interação cabeça-cauda é de 1 μ M). Em tampão de fluorescência a 50 mM de NaCl, cerca de 50% de AS269(5OHW) encontra-se no estado polimerizado, quando presente na concentração de 1 μ M (Figura 26). Se considerarmos que a ausência da fusão Ala-Ser a 40 nm do C-terminal de nf269(5OHW) não afeta a sensibilidade da fluorescência da sonda à interação com o N-terminal de Tm₁₋₁₄₂, podemos tentar interpretar o aumento de fluorescência de nf269(5OHW) em termos de dimerização nf269(5OHW) e ASTm₁₋₁₄₂. Dessa forma, um aumento de 7% na fluorescência da proteína promovido pela ligação de ASTm₁₋₁₄₂ indicaria que cerca de ~13% das sondas encontram-se envolvidas em interação cabeça-cauda (assumindo $\Delta F_{\text{max}} = 55\%$). Esse valor de ~13% de sondas em ambiente polimerizado é muito inferior ao valor de ~50% calculado para AS269(5OHW). Essas observações podem estar

sugerindo que o fragmento N-terminal não interage com o C-terminal da nfTm com a mesma afinidade da interação cabeça-cauda observada para a proteína intacta. Não sabemos a razão dessa diferença, mas pode ser devida a uma redução na estabilidade de ASTm₁₋₁₄₂ quando comparada à proteína do tipo selvagem.

Na seção 3.7.3 dos Resultados, referimo-nos a uma aparente contradição em nossos resultados de fluorescência envolvendo a resposta da sonda na posição 269 à ligação de Tn. Na ausência de actina, a ligação de Tn à Tm marcada na posição 269 pareceu perturbar a fluorescência da sonda de maneira diferente quando a interação cabeça-cauda ocorria no dímero nf269(5OHW)+ASTm₁₋₁₄₂ (+13%) ou no polímero AS269(5OHW) (-14%) (1μM de cada polipeptídeo, I=0,090). Esse duplo efeito (*aumento* ou *diminuição* da fluorescência) promovido pela ligação de Tn pode ser racionalizado se reconhecermos que no caso de AS269(5OHW), a Tn está sendo adicionada a uma mistura onde aproximadamente metade das sondas já se encontram na forma polimerizada, com uma fluorescência intrínseca relativamente alta (55% maior que a da sonda livre). Por outro lado, a mistura de nf269(5OHW) + ASTm₁₋₁₄₂ está com 87% das sondas na forma despolimerizada, com fluorescência intrínseca relativamente baixa. Logo, i) se a interação da Tn induz a formação de complexos cabeça-cauda em ambos os sistemas, e ii) se a fluorescência intrínseca da sonda no complexo Tn-cabeça-cauda tem um valor intermediário entre a fluorescência intrínseca da sonda livre e da sonda no ambiente polimerizado, seria esperado exatamente o que observamos: uma diminuição na intensidade de fluorescência no sistema AS269(5OHW) e um aumento na intensidade de fluorescência no sistema nf269(5OHW) + ASTm₁₋₁₄₂. Em outras palavras, uma análise comparativa da interferência da ligação de Tn na fluorescência de nf269(5OHW) e AS269(5OHW) deve ter como referência a fluorescência intrínseca da sonda no estado *despolimerizado*.

Figura 39: Esquemática da perturbação da intensidade de fluorescência do 5-hidroxitriptofano incorporado na posição 269 de versões polimerizáveis e não polimerizáveis de Tm. A, Mutantes de tropomiosina investigados. Os valores de variação de fluorescência foram considerados com relação à fluorescência da proteína despolimerizada (300 mM de NaCl), sendo que os valores entre parênteses consideram 100% o valor da fluorescência da proteína no estado de polimerização inicial. Condições: 1 μ M de C- e N- terminais funcionais, 5 mM de NaCl (em tampão de fluorescência), vide resultados.

Ilustramos essas interpretações na Figura 39. O painel A apresenta um esquema dos mutantes, onde a fusão dipeptídica Ala-Ser é representada por um retângulo preto, a sonda na posição 269 é representada por um retângulo azul, quando no ambiente livre, e verde, quando envolvida em interação cabeça-cauda. A legenda apresenta as variações de fluorescência (relativas ao estado despolimerizado) observadas em tampão de fluorescência, em concentrações de 1 μ M de cada polipeptídeo (ou seja, 1 μ M de N- e C-terminais funcionais). O painel B ilustra as mudanças de fluorescência promovidas pela interação cabeça-cauda, na ausência de Tn. Quando comparados com a intensidade de fluorescência da sonda livre (medida a 300mM de NaCl), é observado um aumento de 30% e 7% na fluorescência de AS269(5OHW) e da mistura nf269(5OHW)+ASTm₁₋₁₄₂, respectivamente. No painel C esquematizamos as variações na fluorescência da sonda promovidas pela ligação de Tn. nf269(5OHW)

sozinha não tem sua fluorescência significativamente perturbada pela ligação de Tn (102%). Entretanto, na presença de ASTm₁₋₁₄₂, sua fluorescência aumenta para 113% da fluorescência da sonda livre, o que corresponde a 106% do valor de fluorescência do sistema nf269(5OHW)+Tm₁₋₁₄₂ (113% = 106% x 107%). Por outro lado, a ligação de Tn induz um aumento de 112% na fluorescência de AS269(5OHW) quando comparado com a fluorescência da sonda livre, o que corresponde a uma diminuição de 87% na fluorescência do sistema AS269(5OHW) (112% = 130% x 87%). Analisados dessa forma (utilizando valores com referência à fluorescência intrínseca da sonda no estado despolimerizado), concluímos que a Tn promove, de forma indistinguível, a polimerização de AS269(5OHW) e a dimerização de nf269(5OHW)+ASTm₁₋₁₄₂ (112% vs 113%).

Os resultados de Sano e colaboradores (2000) demonstraram que várias tropomiosinas acetiladas expressas em células de inseto, com diferentes mutações na posição 283 (originalmente uma serina que pode ser fosforilada), apresentam viscosidades iguais (substituição por Ala), maiores (substituição por Glu) ou menores (substituição por Lys) do que a α -Tm do tipo selvagem (16 μ M). Em contraste, ensaios de ligação dos fragmentos acetilados Tm₁₋₂₇₃ (4 μ M) e Tm₁₄₁₋₂₈₄ (20 μ M) contendo essas mesmas mutações, realizados em baixa força iônica (fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0), forneceram uma constante de afinidade muito baixa ($4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), quando comparada com os nossos resultados utilizando AS269(5OHW) na mesma força iônica ($2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Os fragmentos de Sano e colaboradores também se associaram com afinidades independentes da natureza do aminoácido 283, em desacordo com os ensaios de viscosidade realizados com as proteínas inteiras.

A estabilidade térmica e o conteúdo de α -hélice de vários fragmentos N-terminais de Tm, inclusive um muito similar à Tm₁₋₁₄₂ (Tm₁₋₁₃₇), demonstraram que esses fragmentos mantêm sua estrutura e tendem ser mais estáveis que os fragmentos C-terminais da Tm (Pato & Smillie, 1978, Pato *et al.*, 1981a). Apesar de alguns experimentos de CD da Tm₁₋₁₄₂

realizados por Ângela Mika Katsuyama, em nosso laboratório, indicarem que ela adota uma estrutura α -hélice em quase 100% de sua sequência (dados não mostrados, condições: NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,0, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM e KCl 100 mM), esse fragmento ainda não teve sua estabilidade caracterizada nas condições utilizadas em nossos ensaios. Apenas após essa caracterização detalhada poderemos especular sobre uma afinidade para a interação cabeça-cauda diferencial entre fragmentos de Tm (dimerização) e a proteína inteira (polimerização). É válido enfatizar que todos os estudos da interação cabeça-cauda da Tm (na ausência de actina ou Tn), inclusive o nosso, consideram que a ligação não é cooperativa (ou seja, a afinidade independe do tamanho do polímero).

A tropomiosina liga-se cooperativamente à actina (para revisão ler Tobacman, 1996). Tropomiosinas não polimerizáveis produzidas por tratamento com peptidase (Mak *et al.*, 1983), modificações químicas (Johnson & Smillie, 1977) ou técnicas de proteínas recombinantes (Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Monteiro *et al.*, 1994) apresentaram um decréscimo significativo na afinidade por actina. Esse fato sugere, inicialmente, uma relação entre os dois fenômenos, ou seja, que a polimerização da Tm promoveria a sua ligação à actina. Essa idéia é consistente com a observação de que a ligação de Tm à Tn aumenta a viscosidade da Tm (Ebashi & Kodama, 1965, Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987) e reestabelece a habilidade da Tm não polimerizável de ligar-se à actina (Mak *et al.*, 1983, Heeley *et al.*, 1987; Hitchcock-DeGregori & Heald, 1987, Monteiro *et al.*, 1994). Baseados na indução da ligação de Tm à actina promovida tanto por Tn quanto por S1, vários estudos concluíram que a interação cabeça-cauda entre as moléculas de Tm contribui mais para a afinidade do que para a cooperatividade da sua ligação à actina (Heald & Hitchcock-DeGregori, 1988, Cho & Hitchcock-DeGregori, 1990; Hill *et al.*, 1992, Willadsen *et al.*, 1992; Butters *et al.* 1993; Moraczewska *et al.*, 1999). Por exemplo, Hill e colaboradores (1992) mostraram que Tn aumenta a ligação da Tm à actina, através do aumento da afinidade intrínseca da Tm

por actina, mas não altera significativamente a cooperatividade dessa ligação. Se a polimerização da Tm fosse realmente a base para a cooperatividade da ligação de Tm à actina, dever-se-ia esperar um aumento na cooperatividade dessa ligação em presença de Tn. Apesar desses argumentos, a ligação de tropomiosinas não polimerizáveis à actina, em ausência de outras proteínas (Tn ou S1) não foi medida para que pudéssemos comparar com a Tm polimerizável. Portanto, ainda não está claro se a interação cabeça-cauda contribui ou não para ligação da Tm à actina.

Apesar do complexo cabeça-cauda ser aparentemente de alta importância para a ligação à actina, é esperado que o restante da tropomiosina também contribua para a ligação. As medidas dessa afinidade residual são escassas apesar de Moraczewska e colaboradores (Moraczewska & Hitchcock-DeGregori, 2000) relatarem uma constante de afinidade para nfTm recombinante de rato de $\sim 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ a 100 mM de NaCl, sendo que essa afinidade a 150 mM de NaCl cai para valores menores que 10^5 M^{-1} . Nossos resultados mostram que, em condições nas quais $I = 90 \text{ mM}$ ou $I = 190 \text{ mM}$, o mutante ASTm269(5OHW) ($2 \mu\text{M}$) ainda é capaz de ligar-se à actina. O mesmo não ocorre em relação a nfTm269(5OHW) (condições correspondendo a 50 mM e 150 mM de NaCl na Figura 18 e dados não mostrados). Nessas condições nossos dados prevêem que mais de 40% ou 99% , respectivamente, das moléculas de ASTm269(5OHW) encontram-se no estado monomérico (Figura 37).

Surge a seguinte questão: se ASTm é capaz de ligar-se à actina, mesmo em condições nas quais encontra-se essencialmente no estado monomérico, por que a nfTm não liga-se à actina sob as mesmas condições? Uma vez que modificações tanto no N- quanto no C-terminal da Tm podem alterar sua capacidade de ligação à actina, parece que é a real estrutura do complexo cabeça-cauda entre as moléculas o que confere a propriedade de ligação à actina e não somente as porções N- ou C-terminais da molécula. Talvez o sítio através do qual o complexo cabeça-

cauda esteja ligado na actina auxilie à estabilização desse complexo e o proteja das interações iônicas de desestabilização promovidas pelo aumento da força iônica da solução. Nesse caso, complexo cabeça-cauda poderia ser formado antes ou após a ligação à actina, dependendo das condições da solução. Qualquer modificação que afete a estrutura tanto da extremidade N-quanto da C-terminal afetaria, portanto, tanto a estrutura do complexo quanto a ligação à actina. Recentes estruturas do fragmento N-terminal da Tm, sob a forma acetilada ou não, obtidas em alta resolução, sugerem fortemente a forma como a acetilação α -amino é capaz de afetar a polimerização de Tm e sua ligação à actina (Greenfield *et al.* 1998, Brown *et al.* 2001). Na ausência da extensão dipeptídica N-terminal, repulsões entre o grupamento α -amino positivamente carregado (na posição *a* na interface hidrofóbica do dímero) possivelmente desestabilizam a estrutura coiled-coil, que deve ser importante para a estabilização do complexo cabeça-cauda responsável pela polimerização.

4.6. SIMULAÇÃO DE UM NOVO SÍTIO DE INTERAÇÃO CABEÇA-CAUDA ENTRE MOLÉCULAS DE Tm

O mutante truncado de tropomiosina, Tm₁₋₂₆₀, forneceu resultados que foram, seguramente, os mais inesperados dessa tese. A tabela abaixo compara as viscosidades de Tm₁₋₂₆₀ com de diversos fragmentos de α -Tm, especificando as seqüências C-terminais geradas pela modificação.

Proteína	Viscosidade	Sequência C-terminal	Referência
α -Tm ₁₋₂₆₀	A	<u>defgabcdefga</u> <u>leksiddledel</u>	Sousa <i>et al.</i> , <i>in press</i>
α -Tm ₁₋₂₈₄	A	<u>gabcdefgabcd</u> <u>eldhalndmtsi</u>	Johnson & Smillie, 1977
α -Tm ₁₋₂₈₃	A	<u>fgabcdefgabc</u> <u>eeldhalndmts</u>	
α -Tm ₁₋₂₈₂	A	<u>efgabcdefgab</u> <u>seeldhalndmt</u>	
α -Tm ₁₋₂₈₁	B	<u>defgabcdefga</u> <u>iseeldhalndm</u>	
α -Tm ₁₋₂₈₀	B	<u>cdefgabcdefg</u> <u>aiseeldhalnd</u>	
α -Tm ₁₋₂₇₉	B	<u>bcdefgabcdef</u> <u>kaiseeldhaln</u>	
α -Tm ₁₋₂₇₈	B	<u>abcdefgabcde</u> <u>ykaiseeldhal</u>	
α -Tm ₁₋₂₇₇	B	<u>gabcdefgabcd</u> <u>kykaiseeldha</u>	
α -Tm ₁₋₂₇₆	B	<u>fgabcdefgabc</u> <u>lkykaiseeldh</u>	
β -Tm ₁₋₂₅₃	B	<u>defgabcdefga</u> <u>aersvaklekti</u>	Bategi <i>et al.</i> , 1990 Sequência: Widada <i>et al.</i> , 1988

Tabela 10: Comparação das variações nas viscosidade do mutante Tm₁₋₂₆₀ e outras tropomiosinas truncadas na região C-terminal. A ou B significam que a proteína apresentou alta ou baixa viscosidade, respectivamente.

Uma possível, apesar de simplificada, explicação para alta viscosidade do mutante Tm₁₋₂₆₀ poderia basear-se na alteração da densidade de cargas no novo C-terminal gerado na proteína. No decorrer desse trabalho, discutimos em detalhe a importância das interações eletrostáticas na interação cabeça-cauda, responsável pela polimerização da Tm e, conseqüentemente por sua alta viscosidade. Foi discutido ainda o quanto essa interação, do N-terminal positivamente carregado com o C-terminal negativamente carregado, é afetada por condições que interferem nessas interações, isto é, pela força iônica do meio. O fato dos onze aminoácidos C-terminais serem muito mais negativamente carregados na ASTm₁₋₂₆₀ (16esu/ dímero) do que na ASTm (6esu/ dímero) pode determinar sua interação mais forte com o N-terminal positivamente carregado. A

Tabela 10 sumariza as diferenças nas seqüências C-terminais de várias tropomiosinas truncadas.

Outro fator que poderia estar induzindo a perda da afinidade da interação cabeça-cauda, observada nas proteínas truncadas estudadas por Johnson e colaboradores (1977), seria o deslocamento da His-276 em direção ao C-terminal do polipeptídeo. Possivelmente, o deslocamento de uma carga positiva no sítio de interação promove repulsões das cargas positivas do N-terminal, auxiliando na desestabilização da interação cabeça-cauda. Em adição, nosso modelo para a interação cabeça-cauda (Figura 38, painél 2) prediz que esse resíduo esteja participando de uma rede de interações iônicas interdependentes, inter e intramoleculares, que estabilizariam o complexo cabeça-cauda da Tm. O deslocamento desse resíduo e, conseqüentemente, o rompimento dessa rede de interações pode estar contribuindo para a perda da afinidade do C-terminal dos fragmento para a interação com o N-terminal.

Essas hipóteses poderiam ser testadas através da construção e análise de novos mutantes, nos quais os resíduos da Tm₁₋₂₆₀ negativamente carregados (Glu-250, Asp-253, Asp-254, Glu-257, Asp-258 e Glu-259) fossem substituídos por resíduos polares sem carga ou positivamente carregados.

4.7. ANÁLISE DA VARIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA TROPOMIOSINA PROMOVIDA POR ALTERAÇÕES ATÔMICAS NO ANEL INDÓLICO DO TRIPTOFANO QUE SUBSTITUI ALA NA POSIÇÃO 262 DA TM

Uma observação intrigante nos resultados obtidos consiste na solubilidade diferencial observada no mutante de tropomiosina quando triptofano ou seus análogos 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano são incorporados na posição 262 da Tm, originalmente ocupada por uma alanina. Não devemos ignorar que esse aminoácido ocupa a posição c da estrutura coiled-coil (Figura 1), uma posição que se encontra na interface

proteína-solvente e é tipicamente ocupada por aminoácidos polares, podendo estar gerando uma interface hidrofóbica na superfície da proteína.

O interessante no comportamento desse conjunto de proteínas é que: a diferença entre as estruturas das sondas (triptofano, 5-hidroxitriptofano e 7-azatriptofano - Figura 7) é bastante pequena quando comparada, por exemplo, à diferença entre a estrutura do aminoácido substituído (alanina) e o 7-azatriptofano - que na posição 262 gera a proteína solúvel. Isso significa que a mudança de substituintes no anel indol do triptofano provavelmente promove diferenças significativas nas interações da sonda com os aminoácidos próximos à posição 262 (de cada cadeia de Tm) e/ou gera mudanças conformacionais e/ou superfícies hidrofóbicas significativas o suficiente para alterar a solubilidade da proteína.

Se a solubilidade da proteína com essas sondas na posição 262 é afetada por algumas interações promovidas pela simples alteração de substituintes no anel indol do triptofano, acreditamos ser interessante investigar que interações sejam essas. Talvez possamos utilizar essa proteína para investigar as diferenças nas interações intra e inter-moleculares destes análogos inseridos na posição 262 da Tm. Ainda não caracterizamos bem essa variação na solubilidade do mutante contendo triptofano, 5-hidroxitriptofano ou 7-azatriptofano. Apesar disso, alguns experimentos preliminares realizados por nós, em diversas condições de pH e força iônica, indicaram que essa diferença é acentuada em pH 7,0 e baixa força iônica ($I=0,12$), sendo atenuada em maiores ou menores valores de pH (pH 6,0 ou 8,0) e força iônica. ($I=0,07$, $0,17$ ou $0,22$) (dados não mostrados). Essa análise é dificultada pela limitação da metodologia utilizada (ultracentrifugação).

5. CONCLUSÕES

Nesse trabalho demonstramos que o 5-hidroxitriptofano inserido na região C-terminal da Tm permite o monitoramento específico da ligação de Tm a outra molécula de Tm, à Tn ou à actina, mesmo quando outras proteínas encontram-se ligadas na mesma região. Demonstramos ainda a utilidade desse tipo de investigação ao caracterizar quantitativamente duas interações de Tm que ainda não haviam sido explicitamente caracterizadas na literatura, são elas: a ligação de Tn à Tm-actina (Sousa & Farah, 2001, abstract) e a polimerização de Tm (Sousa & Farah, 2002).

Utilizando o mutante AS263(5OHW) e fragmentos de TnT, demonstramos que a ligação do fragmento TnT77-157 (CB2) ao mutante é estabilizada pelos aminoácidos vizinhos a essa região, ao longo da sequência primária da TnT (Oliveira *et al.*, 2000). Em adição, demonstramos que o fragmento TnT77-157 liga-se especificamente à região do resíduo 263, e que a substituição da glutamina inicial por 5-hidroxitriptofano acarreta a perda de afinidade do mutante por TnT77-157. Essa última observação contradiz a idéia de que a interação de Tm com CB2 seria inespecífica, sugerida por Brisson e colaboradores (1986).

A interação cabeça-cauda da Tm foi quantitativamente investigada nesse trabalho, utilizando a sensibilidade da fluorescência do 5-hidroxitriptofano na posição 269 da Tm. Analisamos detalhadamente a variação da constante de afinidade dessa interação, promovida por aumentos na força iônica do meio. Confrontando os dados dessa análise com previsões teóricas, baseadas na lei limitante de Debye-Hückel, estimamos um número mínimo de cargas que estariam envolvidas na interação cabeça-cauda da Tm. Sugerimos algumas interações que poderiam estar estabilizando a polimerização da Tm. Ainda nesse trabalho

demonstramos que, em forças iônicas nas quais a proteína polimerizável AS269(5OHW) encontra-se essencialmente sob a forma monomérica, a proteína ainda é capaz de ligar-se à actina, enquanto que a proteína não polimerizável não o é. Sugerimos que a própria ligação de Tm à actina estaria protegendo a interação cabeça-cauda da Tm da desestabilização promovida pela alta força iônica da solução (Sousa & Farah, 2002).

Sugerimos que a polimerização de Tm induzida pela ligação de Tn é estruturalmente diferente da interação cabeça-cauda responsável pela polimerização de Tm em solução, em ausência de Tn. As evidências basearam-se em estudos de fluorescência utilizando versões polimerizáveis e não polimerizáveis do mutante com 5-hidroxitriptofano incorporado na posição 269. Apesar de estudos anteriores mostrarem que a ligação de Tn não promove a polimerização de nfTm (Cho & Hitchcock-DeGregori, 1990), demonstramos que ainda assim Tn liga-se à região C-terminal da nf263(5OHW), mesmo que essa não esteja envolvida na interação cabeça-cauda (Sousa *et al.*, 2002, abstract).

Apresentamos um mutante de Tm truncado na região C-terminal (ASTm₁₋₂₆₀) que não só manteve sua habilidade de polimerizar-se, como apresentou uma viscosidade muito maior que a Tm do tipo selvagem. Sugerimos que a maior concentração de cargas negativas no C-terminal gerado pela mutação proporcionaria uma interação mais forte com o N-terminal positivamente carregado, aumentando a afinidade da interação cabeça-cauda nesse mutante.

Finalmente, utilizando o mutante de Tm truncado (ASTm₁₋₁₄₂), sugerimos que a formação de heterodímeros nf269(5OHW) + ASTm₁₋₁₄₂ ocorre com menor afinidade que a formação de polímeros de AS269(5OHW). Demonstramos que, em condições nas quais aproximadamente 15% dos C-terminais encontram-se envolvidos em uma

interação cabeça-cauda no heterodímero, a presença da interação cabeça-cauda não afeta a ligação de nfTm à actina ou Tn. Em condições nas quais menos de 13% dos C-terminais de AS269(5OHW) encontram-se envolvidos em interação cabeça-cauda (i.e., NaCl 150 mM), a proteína intacta liga-se a actina. Concluimos que interação cabeça-cauda, apesar de ser necessária para a interação Tm-actina, não gera, por si só, um sítio de alta afinidade para actina.

Bibliografia

- Asai, H. (1961) Electric birefringence of rabbit tropomyosin. *J.Biochem.* **50**, 183-189
- Bailey, K: (1948) Tropomyosin: A new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem.J.* **43**, 271-279.
- Beechem, J.M. e Brand, L. (1986). Global analysis of fluorescence decay: applications to some unusual experimental and theoretical studies. *Photochem Photobiol.* **44**, 323-329.
- Betcher-Lange, S.L., e Lehrer, S.S. (1978). Pyrene excimer fluorescence in rabbit skeletal alpha-tropomyosin labeled with N-(1-pyrene)maleimide. A probe of sulfhydryl proximity and local chain separation. *J Biol Chem.* **253**, 3757-3760.
- Bradac, J.A., Gruber, C.E., Forry-Schaudies, S. & Hughes, S.H. (1989). Isolation and characterization of related cDNA clones encoding skeletal muscle β -tropomyosina low-molecular-weight non-muscle tropomyosin isoform. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 185-192.
- Brawerman, G. e Ycas, M. (1957). Incorporation of the amino acid analog tryptazan into the protein of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **68**, 112-117.
- Brisson, J.R., Golosinska, K., Smillie, L.B. e Sykes, B.D. (1986). Interaction of tropomyosin and troponin T: a proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **25**, 4548-4555.
- Bronson, D.D. e Schachat, F.H. (1982). Heterogeneity of contractile proteins. *J. Biol. Chem.* **257**, 3937-3944.
- Brown, J.H., Kim, K.H., Jun, G., Greenfield, N.J., Dominguez, R., Volkmann, N., Hitchcock-DeGregori, S.E., e Cohen, C. (2001). Deciphering the design of the tropomyosin molecule *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8496-8501.
- Butters, C.A., Willadsen, K.A., e Tobacman, L.S. (1993). Cooperative interactions between adjacent troponin-tropomyosin complexes may be transmitted through the actin filament. *J.Biol.Chem.* **268**:15565-15570.
- Callis, P.R. (1997). The 1La and 1Lb transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to the fluorescence of proteins. *Methods Enzymol.* **278**:113-150.
- Cantor, C.R. e Schimmel, P.R. (1980). Biophysical Chemistry. *W.H. Freedman and Company*, N.Y. **Vol. I**, 145-147
- Caspar, D.L., Cohen, C., e Longley, W. (1969). Tropomyosin: crystal structure, polymorphism and molecular interactions *J.Mol.Biol.* **41**, 87-107.

- Cassell, M. e Tobacman, L.S. (1996). Opposite effects of myosin subfragment 1 on binding of cardiac troponin and tropomyosin to the thin filament. *J. Biol. Chem.* **271**, 12867-12872.
- Chalovich, J.M. e Eisenberg, E. (1982). Inhibition of actomyosin ATPase activity by troponin-tropomyosin without blocking the binding of myosin to actin. *J. Biol. Chem.* **257**, 2432-2437.
- Chen, Y.-d., Yan, B., Chalovich, J.M. e Brenner, B. (2001). Theoretical kinetic studies of models for binding myosin subfragment-1 to regulated actin: Hill model versus Geeves model. *Biophys. J.* **80**, 2338-2349.
- Cho, Y.-J., Liu, J. e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1990) The amino terminus of muscle tropomyosin as major determinant for function. *J. Biol. Chem.* **265**, 538-545.
- Cho, Y.-J. e Hitchcock-DeGregori, S. (1991). Relationship between alternatively spliced exons and functional domains in tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10153-10157
- Clayton, L., Reinach, F.C., Chumbley, G.M., e MacLeod, A.R. (1988). Organization of the hTMnm gene. implications for the evolution of muscle and non-muscle tropomyosins. *J. Mol. Biol.* **201**, 507-515.
- Cohen, C., Caspar, D.L., Parry, D.A., e Lucas, R.M. (1972). Tropomyosin crystal dynamics. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **36**, 205-216.
- Cummins, P e Perry, S.V. (1973). The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.* **133**, 765-777.
- Das, K., Ashby, K.D., Smirnov, A.V., Reinach, F.R., Jacob, W.P. e Farah, C.S. (1999) Fluorescence properties of recombinant tropomyosin containing tryptophan, 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan, *Photochem. and Photobiol.* **70**, 719-730
- Drapeau, G.R., Brammar, W.J., e Yanofsky, C. (1968). Amino acid replacement of the glutamic acid residue at position 48 in the tryptophan syntetase. A protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **35**, 357-367.
- Eaton, B.L., Kominz, D.R. e Eisenberg, E. (1975). Correlation between the inhibition of the acto-heavy meromyosin ATPase and the binding of tropomyosin to F-actin: effects of Mg²⁺, KCl, troponin I, and troponin C. *Biochemistry.* **14**, 2718-2725.
- Eaton, B.L. (1976). Tropomyosin binding to F-actin induced by myosin heads. *Science.* **192**, 1337-1339.
- Ebashi, S. e Kodama, A. (1965) A new factor promoting aggregation of tropomyosin. *J. Biochem.* **58**, 107-108.

- Eftink, M.R. e Ghiron, C.A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*. **15**, 672-680.
- Eftink, M.R. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.* **66**, 482-501.
- English, D.S., Rich, R.L., e Petrich, J.W. (1998) Non-exponential fluorescence Decay of 7-azatryptophan induced in a peptide environment. *Unpublished*.
- 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). Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J. Biol. Chem.* **269**, 5230-5240.
- Farah, C.S., e Reinach, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* **9**, 755-767.
- Farah, C.S., e Reinach, F.C. (1999). Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5-hydroxytryptophan: Ca²⁺-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. *Biochemistry* **38**, 10543-10551.
- Fleenor, D.E., Hickman, K.H., Lindquester, G.J., and Devlin, R.B. (1992). Avian cardiac tropomyosin gene produces tissue-specific isoforms through alternative RNA splicing. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 55-63.
- Fisher, D., Wang, G., Tobacman, L.S. (1995). NH₂-terminal truncation of skeletal muscle troponin T does not alter the Ca²⁺ sensitivity of thin filament assembly, *J. Biol. Chem* **270**, 25455-25456.
- Flicker, P.F., Phillips, G.N. Jr., e Cohen, C. (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J. Mol. Biol.* **162**, 495-501.
- Fujimori, K., Sorenson, M., Herzberg, O., Moulton, J., and Reinach, F.C. (1990). Probing the Ca⁺⁺ induced conformational transition of troponin C with site directed mutants. *Nature* **345**, 182-184.
- Geeves, M.A. e Halsall, D.J. (1986). The dynamics of the interaction between myosin subfragment 1 and pyrene-labelled thin filaments, from rabbit skeletal muscle. *Proc. Royal Soc. B.* **229**, 85-95.
- Geeves, M.A. e Halsall, D.J. (1987). Two-step ligand binding and cooperativity. A model to describe the cooperative binding of myosin subfragment 1 to regulated actin. *Biophys. J.* **52**, 215-220.
- Geeves, M.A. e Lehrer, S.S. (1994). Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch: the size of the cooperative unit. *Biophys. J.* **67**, 273-282.

- Gooding, C., Reinach, F.C., and MacLeod, A.R. (1987). Complete nucleotide sequence of the fast-switch isoform of chicken skeletal muscle α -tropomyosin. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8105.
- Gordon, A.M., Homsher, E. e Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**, 853-924.
- Gordon, A.M., Regnier, M. e Homsher, E. (2001). Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls". *New Physiol. Sci.* **16**, 49-55.
- Greene, L.E. e Eisenberg, E. (1980). Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2616-2620.
- Greenfield, N.J., Montelione, G.T., Farid, R.S., e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1998). The structure of the N-terminus of striated muscle alpha-tropomyosin in a chimeric peptide: nuclear magnetic resonance structure and circular dichroism studies. *Biochemistry* **37**, 7834-7843.
- Hammell, R.L. e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1996). Mapping the functional domains within the carboxyl terminus of α -tropomyosin encoded by the alternatively spliced ninth exon. *J. Biol. Chem.* **271**, 4236-4242.
- Hanson, J. e Huxley, H.E. (1955). The structural basis of contraction in striated muscle. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **9**, 228-273.
- Hanson, J. e Lowy, J. (1963) The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.* **6**, 46-60.
- Hardy, Y., Fiszman, M.Y., Osborne, H.B. e Thielbaud, P. (1991). Characterization of muscle and non-muscle *Xenopus laevis* tropomyosin mRNAs transcribed from the same gene. *Biochem. J.* **202**, 431-440.
- Haselgroove, J.C. (1972). X-ray evidence for a conformational change in actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 341-352.
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- Haselgrove, J.C. (1972). X-ray evidence for a conformational change in actin-containing filaments of vertebrates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 341-352.
- He, M., Wilde, A., e Kaderbhai, M.A.. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids.. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1660.

- Heald R.W. e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1988). The structure of the amino terminus of tropomyosin is critical for binding to actin in the absence and presence of troponin. *J.Biol.Chem.* **263**, 5254-5259
- Heeley, D.H., Golosinska, K., e Smillie, L.B. (1987). The effects of troponin T fragments T1 and T2 on the binding of nonpolymerizable tropomyosin to F-actin in the presence and absence of troponin I and Troponin C. *J.Biol.Chem.* **262**, 9971-9978.
- Heeley, D.H., Watson, W.H., Mak, A.S., Dubord, P. e Smillie, L.B. (1989). Effect of phosphorylation on the interaction and functional properties of rabbit striated muscle alpha alpha-tropomyosin. *J.Biol.Chem.* **264**, 2424-2430.
- Heeley, D.H., Bieger, T., Waddleton, D.M., Hong,C., Jackman, D.M., McGowan, C., Davidson, W.S. e Beavis, R.C. (1995). Characterization of fast, slow and cardiac muscle tropomyosins from salmonid fish. *Eur. J. Biochem.* **232**, 226-234.
- Helfman, D.M., Cheley, S., Kuismanen, E., Finn, L.A. e Yamuwaki-Kataoka, Y. (1986). Nonmuscle and muscle tropomyosin isoforms are expressed from a single gene by alternative RNA splicing and polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3582-3595.
- Helfman, D.M. e Ricci, W.M. (1989). Branch point selection in alternative splicing of tropomyosin pre-RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5633-5650.
- Highsmith, S. (1997). Myosin regulatory light chain and nucleotide modulation of actin binding site electric charge. *Biochemistry* **36**, 2010-2016.
- Hill, T.L., Eisenberg, E. e Greene,L. (1980). Theoretical model for the cooperative equilibrium binding of myosin subfragment 1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3186-9031.
- Hill, L.E., Mehegan, J.P., Butters, C.A. e Tobacman, L.S. Analysis of troponin-tropomyosin binding to actin (1992). Troponin does not promote interactions between tropomyosin molecules. *J.Biol.Chem.* **267**, 16106-16113.
- Hitchcock-DeGregori, S.E. e Heald, R.W. (1987). Altered actin and troponin binding of amino-terminal variants of chicken striated muscle alpha-tropomyosin expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **262**, 9730-9735.
- Hitchcock-DeGregori, S.E e Varnell, T.A. (1990). Tropomyosin has discrete actin-binding sites with sevenfold and fourteenfold periodicities. *J Mol Biol.* **214**, 885-896.
- Hitchcock-DeGregori, S.E e An, Y. (1996). Integral repeats and a continuous coiled coil are required for binding of striated muscle tropomyosin to the regulated actin filament. *J. Biol. Chem.* **271**, 3600-3603.

- Hogue, C.W.V., Rasquinha, I., Szabo, A.G. e MacManus, J.P. (1992). A new intrinsic fluorescence probe for proteins. Biosynthetic incorporation of 5-hydroxytryptophan into oncomodulin. *FEBS Lett.* **310**, 269-272.
- Holmes, K.C. (1995). The actomyosin interaction and its control by tropomyosin. *Biophys. J.* **68**, 2s-7s.
- Huxley, H.E. e Hanson, J. (1954). Changes in cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973-976.
- Huxley, H.E. (1957). The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 631-348.
- Huxley, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356-1366.
- Huxley, H.E. (1972). Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 361-376.
- Jackson, P., Amphlett, G.W. e Perry, S.V. (1975). The primary structure of troponin T and the interaction with tropomyosin. *Biochem J.* **151**, 85-97.
- Johnson, P. e Smillie, L.B. (1977). Polymerizability of rabbit skeletal tropomyosin: effects of enzymatic and chemical modifications. *Biochemistry* **16**, 2264-2269.
- Johnson, K.A. e Taylor, E.W. (1978). Intermediate states of subfragment 1 and actosubfragment 1 ATPase: Reevaluation of the mechanism. *Biochemistry* **17**, 3432-3442.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F. e Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Kay, C.M. e Bailey, K. (1960) Light scattering in solutions of native and guanidylated rabbit tropomyosin. *Biochim. Biophys. Acta.* **40**, 149-156.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landis, C.A., Bobkova, A., Homsher, E. e Tobacman, L.S. (1997). The active state of the thin filament is destabilized by an internal deletion in tropomyosin. *J. Biol. Chem.* **272**, 14051-14056.
- Lehrer, S.S. e Leavis, P.C. (1978). Solute quenching of protein fluorescence. *Methods Enzymol.* **49**, 222-236.

- Less-Miller, J.P., Yan, A. e Helfman, D.M. (1990). Structure and complete nucleotide sequence of the gene coding rat fibroblast tropomyosin 4. *J. Mol. Biol.* **213**, 399-405.
- Less-Miller, J.P. e Helfman, D.M. (1991). The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *Bioessays* **13**, 1-9.
- Libri, D., Lemmonier, M., Meinel, T. e Fiszman, M. (1989). A single gene codes for the b subunits of smooth and skeletal muscle tropomyosin in the chicken. *J. Mol. Biol.* **264**, 2935-2944.
- Lymn, R.W. e Taylor, E.W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis of actomyosin. *Biochemistry* **10**, 4617-4624.
- Lin, J.J.-C., Hegmann, T.E., e Lin, J.L.-C. (1988). Differential localization of tropomyosin isoforms in cultured nonmuscle cells. *J. Cell. Biol.* **107**, 563-572.
- Lin, T.I. (1982). Excimer fluorescence of pyrene-tropomyosin adducts. *Biophys. Chem.* **15(4)**, 277-288.
- Lupas, A. (1996). Coiled-coils: new structures and new functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 375-382.
- Lupas, A. (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 388-393.
- Luque, E.A., Lemanski, L.F. e Dube, D. (1994). Molecular cloning, sequencing and expression of an isoform of cardiac alpha-tropomyosin from the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **203**, 319-325.
- MacLeod, A.R. (1982). Distinct α -tropomyosin mRNA sequences in chicken skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **126**, 293-297.
- MacLeod, A.R., Houlker, C., Reinach, F.C., Smillie, L.B., Talbot, K., e Modi, G. (1985). A muscle-type tropomyosin in human fibroblasts: evidence for expression by an alternative RNA splicing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7835-7839.
- Mak, A., Smillie, L.B. e Barany, M. (1978). Specific phosphorylation at serine-283 of alpha tropomyosin from frog skeletal and rabbit skeletal and cardiac muscle. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3588-3592.
- Mak, A.S., Golosinska, K., e Smillie, L.B. (1983). Induction of nonpolymerizable tropomyosin binding to F-actin by troponin and its components. *J. Biol. Chem.* **258**, 14330-4.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA Infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.

- Malnic, B., Reinach, F.C., e Farah, C.S. (1998) Regulatory properties of the NH₂- and COOH-terminal domains of troponin T. *J.Biol.Chem.* **273**, 10594-10601.
- Mandel , M e Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA Infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S. H. e Barbacid, M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**, 743-748.
- Matsubara, I., Yagi, N., Miura, H., Ozeki, M. e Izumi, T. (1984). Intensification of the 5.9-nm actin layer line in contracting muscle. *Nature* **312**, 471-473.
- McKillop, D.F. e Geeves, M.A. (1991). Regulation of the acto.myosin subfragment 1 interaction by troponin/tropomyosin. Evidence for control of a specific isomerization between two acto.myosin subfragment 1 states. *Biochem. J.* **279**, 711-718.
- McKillop, D.F. e Geeves, M.A. (1993). Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament. *Biophys. J.* **65**, 693-701.
- McCubbin, W.D. e Kay, C.M. (1969). Physicochemical studies on the aggregation of bovine cardiac tropomyosin with ionic strength. *Can. J. Biochem.* **47**, 411-414.
- McLachlan, A.D. e Stewart, M. (1975). Tropomyosin coiled-coil interactions: evidence for an unstaggered structure *J. Mol. Biol.* **98**, 293-304.
- McLachlan, A.D. e Stewart, M. (1976). The 14-fold periodicity in alpha-tropomyosin and the interaction with actin *J. Mol. Biol.* **103**, 271-298.
- Miegel, A., Lee, L., Dauter, Z. e Maeda, Y. (1993). A new crystal form of tropomyosin. *Adv. Exp. Med. Biol.* **332**, 25-32.
- Milligan, R.A. e Ficker, P.F. (1987). Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* **105**, 29-39.
- Monteiro, P.B., Lataro, R.C., Ferro, J.A. e Reinach, F.C. (1994). Functional α -tropomyosin produced in *E.coli*. A di-peptide extension can substitute the N-terminal acetyl group. *J. Biol. Chem.* **269**, 10461-10466.
- Moraczewska, J., Hitchcock-DeGregori, S.E. (2000). Independent functions for the N- and C-termini in the overlap region of tropomyosin. *Biochemistry* **39**, 6891-6897.
- Moraczewska, J., Nicholson-Flynn, K. e Hitchcock-DeGregori, S.E. (1999). The ends of tropomyosin are major determinants of actin affinity and myosin

- subfragment 1-induced binding to F-actin in the open state. *Biochemistry* **38**, 15885-15892.
- Nolte, H.J., Rosenberry, T.L., e Neuman, E. (1980). Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochemistry* **19**, 3705-3711
- Oliveira, D.M., Nakaie, C.R., Sousa, A.D., Farah, C.S., e Reinach, F.C. (2000). Mapping the domain of troponin T responsible for the activation of actomyosin ATPase activity. Identification of residues involved in binding to actin. *J. Biol. Chem.* **275**, 27513-27519.
- Ooi, T., Mihashi, K. e Kobayashi, H. (1962) On the polymerization of tropomyosin. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 1-11.
- Oosawa, F. e Kasai, M. (1962) A theory of linear and helical aggregation of macromolecules, *J. Mol. Biol.* **4**, 10-12.
- Ohtsuki, I. (1979). Molecular arrangement of troponin-T in the thin filament. *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 491-497.
- Pato, M.D. e Smillie, L.B. (1978). Stability and troponin-T binding properties of rabbit skeletal alpha-tropomyosin fragments. *FEBS Lett.* **87**, 95-98.
- Pato, M.D., Mak, A.S. e Smillie, L.B. (1981a). Fragments of rabbit striated muscle alpha-tropomyosin. I. Preparation and characterization. *J Biol Chem.* **256**, 593-601.
- Pato, M.D., Mak, A.S. e Smillie, L.B. (1981b). Fragments of rabbit striated α -tropomyosin. II. Binding to troponin-T. *J Biol Chem*, **256**, 602-607.
- Pardee, J.D. e Spudich, J.A. (1982). Purification of muscle actin. *Methods Enzymol.* **85**, 164-182.
- Parry, D.A.D. e Squire, J.M. (1973). Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J. Mol. Biol.* **75**, 33-55.
- Pearlstone, J.R., Carpenter, M.R. e Smillie, L.B. (1977). Primary structure of rabbit skeletal muscle troponin-T. Purification of cyanogen bromide fragments and the amino acid sequence of fragment CB2. *J. Biol. Chem.* **252**, 971-977.
- Pearlstone, J.R., e Smillie, L.B. (1978). Troponin T fragments: physical properties and binding to troponin C. *Can J Biochem.* **56(6)**, 521-7.
- Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1981). Identification of a second binding region on rabbit skeletal troponin-T for α -tropomyosin. *FEBS Lett.* **128**, 119-122.

- Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1982). Binding of troponin-T fragments to several types of tropomyosin. Sensitivity to Ca^{2+} in the presence of troponin-C. *J. Biol. Chem.* **257**, 10587-91052.
- Pearlstone, J.R. e Smillie, L.B. (1983). Effects of troponin-I plus-C on the binding of troponin-T and its fragments to alpha-tropomyosin. Ca^{2+} sensitivity and cooperativity. *J. Biol. Chem.* **258**, 2534-2542.
- Phillips, G.N.Jr., Lattman, E.E., Cummins, P., Lee, K.Y. e Cohen, C. (1979). Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin. *Nature* **278**, 413-417.
- Phillips, G.N. Jr. (1986). Construction of an atomic model for tropomyosin and implications for interactions with actin. *J. Mol. Biol.* **192**, 128-131.
- Pitzer, K.S. e Mayorga, G. (1973) Thermodynamics of electrolytes II: activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. *J. Phys. Chem.* **77**, 2300-230.
- Potter, J.D. (1974). The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 436-441.
- Potter, J.D e Gergely, J. (1974). Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. *Biochemistry* **13**, 2697-2703.
- Quaggio, R.B., Ferro, J.A., Monteiro, P.B. e Reinach, F.C. (1993). Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: The role of rare codons on the expression level. *Prot.Sci.* **2**, 1053-1056.
- Rayment, I., Rypniewski, W.R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D.R., Benning, M.M., Winkelmann, D.A., Wesenberg, G. e Holden, H.M. (1993a). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.
- Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C. e Milligan, R.A (1993b). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.
- Ruiz-Opazo, N., Weinberger, J. e Nadal-Ginard, B. (1985). Comparision of α -tropomyosin sequences from smooth and striated muscle. *Nature* **315**, 67-70.
- Ruiz-Opazo, N. e Nadal-Ginard, (1987). α -tropomyosin gene organization. *J. Biol. Chem.* **262**, 4755-4765.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). Molecular Clonning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor Symp.*, NY.
- Sanger, F. Nickelsen, S. e Coulson, R.A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5437.

- Sano, K., Maeda, K., Oda, T. e Maeda, Y. (2000). The effect of single residue substitutions of serine-283 on the strength of head-to-tail interaction and actin binding properties of rabbit skeletal muscle alpha-tropomyosin. *J. Biochem.(Tokyo)* **127**, 1095-1102.
- Schlesinger S. (1968). The effect of amino acid analogues on alkaline phosphatase. formation in *Escherichia coli* K-12. II. Replacement of tryptophan by azatryptophan and by tryptazan. *J. Biol .Chem.* **243**, 3877-3883.
- Smillie, L.B. (1979). Structure and functions of tropomyosins from muscle and non-muscle sources. *Trends Biochem. Sci.* **4**, 151-155.
- Smillie, L.B., Golosinska, K., e Reinach, F.C. (1988). Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. *J.Biol.Chem.* **263**, 18816-18820.
- Sodek, J., Hodges, R.S., Smillie, L.B. e Jurasek, L. (1972). Amino-acid sequence of rabbit skeletal tropomyosin and its coiled-coil structure. *Proc. Natl. Acad. Sci .USA* **69**, 3800-3804.
- Song, X.Z. e Pedersen, S.E. (2000). Electrostatic interactions regulate desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor *Biophys. J.* **78**, 1324-1334.
- Soumilion, P., Jespers, L., Vervoort, J. e Fastrez, J. (1995). Biosynthetic incorporation of 7-azatryptophan into the phage lambda lysozyme: estimation of tryptophan accessibility, effect on enzymatic activity and protein stability. *Protein Eng.* **8**, 451-456.
- Sousa, A.D. e Farah, C.S. Tropomyosin containing tryptophan analogs: Probes of specific thin filament protein interaction (2001). *Biophys.J.* **80**, 91a (Abstract)
- Sousa, A.D. e Farah, C.S. (2002). Quantitative analysis of tropomyosin linear polymerization equilibrium as a function of ionic strength. *J Biol Chem.* **277(3)**, 2081-2088.
- Sousa, A.D., Katsuyama, A.M; Paulucci, A.A., Vidsiunas, E.K. and Farah, C.S. (2002). Investigating the tropomomyosin head-to-tail interaction using intrinsic fluorescent probes. Submetido como abstract para o *Biophysical J.*
- Squire, J.M. e Morris, E.P. (1998). A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *FASEB J.* **12**, 761-771.
- Stone, D. e Smillie, L.B. (1978). The amino acid sequence of rabbit skeletal alpha-tropomyosin. The NH₂-terminal half and complete sequence *J. Biol. Chem.* **253**, 1137-1148.

- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. e Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Szilagyi, L. e Lu, R.C. (1982). Changes of lysine reactivities of actin in complex with myosin subfragment-1, tropomyosin and troponin. *Biochim. Biophys. Acta.* **709**, 204-211.
- Tobacman, L.S. (1988). Structure-function studies of the amino-terminal region of bovine cardiac troponin T. *J. Biol. Chem.* **263**, 2668-2672.
- Tobacman, L.S. (1996). Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 447-481.
- Tobacman, L.S. e Butters, C.A. (2000). A new model of cooperative myosin-thin filament binding. *J. Mol. Biol.* **275**, 27587-27593.
- Trybus, K.M. (1994). Role of myosin light chains. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **15**, 587-594.
- Trybus, K.M. e Taylor, E.W. (1980). Kinetic studies of the cooperative binding of subfragment 1 to regulated actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7209-7213.
- Tsao, T.C., Bailey, K. e Adair, G.S. (1951). The size, shape and aggregation of tropomyosin particles. *Biochem. J.* **49**, 27-36.
- Ueno, H., Tawada, Y. e Ooi, T. (1976). Properties of non-polymerizable tropomyosin obtained by carboxypeptidase A digestion. *J. Biochem. (Tokyo)* **80**, 283-290.
- Vibert, P., Craig, R. e Lehman, W. (1997). Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* **266**, 8-14.
- Xu, C., Craig, R., Tobacman, L., Horowitz, R. e Lehman, W. (1999). Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Biophys. J.* **77**, 985-992.
- Wakabayashi, K., Tanaka, H., Amemiya, Y., Fujishima, A., Kobayashi, T., Hamanaka, T., Sugi, H., e Mitsui, T.. (1985) Time-resolved x-ray diffraction studies on the intensity changes of the 5.9 and 5.1 nm actin layer lines from frog skeletal muscle during an isometric tetanus using synchrotron radiation. *Biophys. J.* **47**, 847-850.
- Wakabayashi, K., Ueno, Y., Amemiya, Y., e Tanaka, H. (1988). Intensity changes of actin-based layer lines from frog skeletal muscles during an isometric contraction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**, 353-367.
- White, S.P., Cohen, C. e Phillips, G.N.Jr. (1987). Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* **325**, 826-828.

- Whitby, F.G. e Phillips, G.N.Jr. (2000). Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution. *Proteins* **38**, 49-59.
- Widada, J.S., Ferraz, C., Capony, J.P. e Liautard, J.P. (1988). Complete nucleotide sequence of the adult skeletal isoform of human skeletal muscle beta-tropomyosin. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3109.
- Willadsen, K.A., Butters, C.A., Hill, L.E., e Tobacman, L.S. (1992). Effects of the amino-terminal regions of tropomyosin and troponin T on thin filament assembly. *J. Biol. Chem.* **267**, 23746-23752.
- Yagi, N. (1991). Intensification of the first actin layer-line during contraction of frog skeletal muscle. *Adv. Biophys.* **27**, 35-43.
- Yagi, N. e Matsubara, I. (1988). Changes in the 5.9 nm actin layer-line on activation of frog skeletal muscles. *Adv. Exp. Med. Biol.* **226**, 369-380.
- Yagi, N. e Matsubara, I. (1989). Structural changes in the thin filament during activation studied by X-ray diffraction of highly stretched skeletal muscle. *J. Mol. Biol.* **208**, 359-363.
- Zot, A.S. e Potter, J.D. (1987) Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* **16**, 535-559.