UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO DA LIGAÇÃO DE CÁTIONS DIVALENTES EM SÍTIOS EF-HAND UTILIZANDO A CADEIA LEVE REGULATÓRIA DE MIOSINA DE MÚSCULO LISO

THARIN MARIA BLUMENSCHEIN DE ALMEIDA

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

São Paulo
2000

AGRADECIMENTOS

Ao Fernando Reinach, pela orientação.

À Ana Claudia Rasera da Silva, pela co-orientação de fato, ainda que não oficial.

À Profa. Shirley Schreier, pelo uso do equipamento de dicroísmo circular.

À Wladia Viviani, pela amizade e ajuda com a modelagem molecular.

Ao Chuck e ao Ronaldo, pela ajuda e sugestões sempre que precisei.

Ao Prof. Hernan Chaimovich, pelo incentivo constante desde o Curso de Ciências Moleculares.

Aos demais laboratórios do Departamento de Bioquímica, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos quando foi necessário.

A todas as pessoas que passaram pelo laboratório nestes anos, pela convivência e companheirismo: Bettina, Ana, Carlos, Ronaldo, Kumie, Catarina, Martin, Chuck, Patrícia, Ricardo, Daniela Oliveira, Daniela Costa, Fernando DF, Dorinho, Ivan, Eric, Michael, Áurea, Vadim, Guilherme, Gabriel, Vitória, Sr. José Lino, Reinaldo, pessoal do Genoma e aos alunos da Ana e do Ronaldo.

A meus pais e irmãos, pelo apoio e incentivo constante.

À Lua, Profa. Shirley Schreier e amigos daquele laboratório, pelos almoços agradáveis e pela amizade.

Ao CNPq e à FAPESP pelas bolsas concedidas.

À FAPESP, CNPq, Rockefeller Foundation e Howard Hughes Medical Institute pelo suporte financeiro.

E a todos os meus amigos, por estarem por perto quando eu precisei.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS 7
ABREVIATURAS 10
RESUMO 12
SUMMARY 13
1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Cálcio em sistemas biológicos 14
1.2 Proteínas ligantes de cálcio 16
1.2.1 Troponina e a regulação da contração em músculo estriado 20
1.3 Características dos sítios EF-hand 21
1.4 A cadeia leve regulatória da miosina (RLC) 28
1.5 Técnicas utilizadas 31
1.5.1 Diálise em fluxo 31
1.5.2 Ciclos de duplos mutantes 33
2 OBJETIVOS 36
3 MATERIAIS E MÉTODOS 37
3.1 Obtenção dos mutantes de RLC 37
3.1.1 Mutação sítio-dirigida 37
3.1.2 Seleção dos mutantes 37
3.2 Expressão e purificação das cadeias leves 38
3.2.1 Vetor de expressão pT7Smo 38
3.2.2 Subclonagem dos mutantes no vetor de expressão 38
3.2.3 Expressão de RLC em larga escala 41
3.2.4 Purificação de RLC 41
3.3 Análise dos mutantes 42
3.3.1 Tratamento para a retirada de Ca^{2+} e Mg^{2+} de RLC 42
3.3.2 Medida das constantes de dissociação de cálcio e magnésio nas RLCs . 43
3.3.3 Cálculo das energias livres de ligação e de acoplamento 47
3.3.4 Propagação de erros 47

3.4 Visualização do sítio da RLC 47
4 RESULTADOS 49
4.1 Obtenção dos mutantes de RLC 49
4.2 Expressão de RLC 49
4.3 Purificação das proteínas 50
4.4 Medidas de ligação de cálcio 51
4.5 Medidas de ligação de magnésio 56
4.6 Mudanças na energia de ligação 59
4.7 Energias de acoplamento 60
5 DISCUSSÃO 62
5.1 Afinidades por cálcio e magnésio 62
5.2 Energias de ligação e acoplamento 65
5.3 Homólogos naturais 69
5.4 Conclusões 70
6 Publicação: "Analysis of Affinity and Specificity in an EF-hand Site Using Double Mutant Cycles"; Biochemistry, no prelo 72
7 RESULTADOS PRELIMINARES 81
7.1 Modelagem molecular de RLC 81
7.1.1 Materiais e métodos 81
7.1.2 Resultados 82
7.2 Mutante contendo o N-terminal da RLC 90
7.2.1 Materiais e métodos 91
7.2.1.1 Mutagênese e expressão do mutante 91
7.2.1.2 Purificação de N-RLC 93
7.2.1.3 Dicroísmo circular 96
7.2.2 Resultados 96
7.2.2.1 Mutagênese e seleção do N-terminal de RLC 96
7.2.2.2 Expressão e tentativas de purificação de N-RLC 98
7.2.2.3 Protocolo para purificação de N-RLC 103
7.2.2.4 Dicroísmo circular 104

8 BIBLIOGRAFIA 106
CURRICULUM VITAE 121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de um sítio EF-hand e sua semelhança com uma mão. 23

Figura 2: Esquema mostrando as posições responsáveis pela ligação do íon em um sítio EF-hand 23

Figura 3: Estereoimagem de dois sítios de ligação de Ca^{2+} e Mg^{2+}: sítio IV da troponina C (Strynadka e James, 1989) e sítio I da parvalbumina (McPhalen e col., 1991). 25

Figura 4: Esquema mostrando o vetor pT7Smo. 39

Figura 5: Diagrama do aparato para diálise em fluxo. 44

Figura 6: Auto-radiografia de géis de seqüenciamento de DNA fita simples dos clones mutantes de RLC. 49

Figura 7: SDS-PAGE (15%) do extrato bacteriano total, mostrando a expressão de RLC... 50

Figura 8: SDS-PAGE da purificação de RLC, mostrando as várias etapas. 51

Figura 9: SDS-PAGE das RLCs purificadas e dialisadas para utilização em ensaios de diálise em fluxo. 51

Figura 10: Gráfico dos dados brutos de um ensaio de diálise em fluxo. 52

Figura 11: Ensaios de ligação de Ca^{2+} sem proteína e com RLC tipo selvagem 53

Figura 12: Gráfico das curvas médias de ligação de cálcio à RLC. 56

Figura 13: Gráfico das curvas médias de competição entre a ligação de cálcio e magnésio à RLC 57

Figura 14: Mudanças na energia de ligação aparente ($\Delta\Delta G^{o}_{app}$) para os mutantes, em kcal/mol.. 58

Figura 15: Estrutura das alças do sítio EF-hand de RLC (laranja) e do sítio III da troponina C (azul), mostrando que a alça da RLC é mais fechada que a da troponina C 64

Figura 16: Modelos da coordenação de magnésio no sítio EF-hand da RLC. 67

Figura 17: Estrutura cristalográfica da cadeia leve regulatória de miosina de vieira (Houdusse e Cohen, 1996). 83

Figura 18: Estrutura do sítio EF-hand da cadeia leve regulatória da miosina de vieira, ocupado por um íon de magnésio (Houdusse e Cohen, 1996)..... 83

Figura 19: Modelo do sítio EF-hand da RLC tipo selvagem, ligando magnésio..... 84

Figura 20: Modelo da estrutura do sítio EF-hand dos mutantes D5S e D12E..... 85

Figura 21: Modelo da estrutura do sítio EF-hand da RLC tipo selvagem, ocupado por cálcio.. 86

Figura 22: Estruturas cristalográficas do sítio II da parvalbumina, ocupado por cálcio e por magnésio (Declercq e col., 1991)..... 87

Figura 23: Estrutura minimizada do sítio II da parvalbumina ocupado por cálcio..... 88

Figura 24: Estrutura minimizada do sítio II da parvalbumina ocupado por magnésio..... 89

Figura 25: Modelo da estrutura de RLC mostrando o planejamento do mutante N-terminal90

Figura 26: Produto de PCR contendo o DNA mutado. 96

Figura 27: Resultado das digestões com *Bam*HI/*Eco*RI e *Nco*I/*Pst*I para verificação dos mutantes. 97

Figura 28: SDS-PAGE da mini-indução dos clones em *E. coli* BL21 (DE3)..... 98

Figura 29: Cromatograma de seqüenciamento do mutante N-RLC.. 98

Figura 30: SDS-PAGE da expressão em larga escala de N-RLC em *E. coli* Bl21 (DE3). 99

Figura 31: SDS-PAGE da expressão de N-RLC a diferentes temperaturas (30º C e 37º C) 99

Figura 32: SDS-PAGE da precipitação com sulfato de amônio. 100

Figura 33: SDS-PAGE do teste das resinas cromatográficas. 101

Figura 34: SDS-PAGE do teste de concentrações de íons metálicos. 102

Figura 35: SDS-PAGE da purificação de N-RLC..... 103

Figura 36: Espectro de dicroísmo circular da N-RLC. 105

ABREVIATURAS

AMP – monofosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

BSA – albumina sérica bovina

cAMP – monofosfato de adenosina cíclico

cDNA – DNA complementar

CDPK – proteína quinase dependente de cálcio

cGMP – monofosfato de guanosina cíclico

CICR – "calcium-induced calcium release" (liberação de cálcio induzida por cálcio)

dATP – trifosfato de desoxiadenosina

dCTP – trifosfato de desoxicitidina

dGTP – trifosfato de desoxiguanosina

DO_{600} – densidade ótica a 600 nm

dTTP – trifosfato de desoxitimidina

E. coli – Escherichia coli

EDTA – ácido etileno-diamino-tetracético

EGTA – ácido etileno-glicol-bis(β-aminoetil-éter)-n, n, n', n'-tetracético

ELC – cadeia leve essencial da miosina

GBP – proteína ligante de galactose

ICBP – proteína intestinal ligante de cálcio (calbindina de 9 kDa)

IP_3 – trifosfato de inositol

K_d – constante de dissociação

MLCK – quinase da cadeia leve de miosina

NMR – ressonância magnética nuclear

N-RLC – domínio N-terminal da RLC

NTnC – domínio N-terminal da troponina C

PCR – reação de polimerase em cadeia

PDB – Protein Data Bank

PPTS – proteína fosfatase de treonina e serina

RF – forma replicativa

RLC – cadeia leve regulatória da miosina

SARC – proteína ligante de cálcio sarcoplasmática

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS

TnC – troponina C

TPNV – troponina de não-vertebrados

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano

UV – ultravioleta

RESUMO

O objetivo deste trabalho é estudar a afinidade e especificidade de sítios EF-hand, e correlacionar estas propriedades com a estrutura primária do sítio, com as interações entre aminoácidos nas posições de coordenação, e com prováveis características da estrutura terciária da proteína.

Os efeitos de três mutações no sítio EF-hand da cadeia leve regulatória de miosina (RLC) foram estudados: D5S, em que o aspartato presente na posição 5 do sítio foi substituído por uma serina; D9E, substituindo o aspartato da posição 9 por um glutamato, e D12E, substituindo o aspartato da posição 12 por um glutamato. Todas as combinações destas três mutações foram produzidas. Os mutantes simples D5S e D9E e o duplo mutante D5S/D9E têm baixa afinidade por cálcio. Todos os mutantes contendo a mutação D12E são específicos para cálcio, com afinidades maiores que RLC tipo selvagem. Todos os mutantes estudados possuem menor afinidade por magnésio que RLC tipo selvagem.

As mudanças na energia livre de ligação e as energias de acoplamento sugerem que há interações inespecíficas entre todas as posições, e uma interação específica entre uma serina na posição 5 e um glutamato na posição 9. Esta interação ocorre somente na presença de magnésio, e quando há um aspartato na posição 12. O glutamato na posição 9 pode ser capaz de coordenar a ligação de magnésio diretamente no duplo mutante D5S/D9E.

Embora um aminoácido ou um certo arranjo deles possa determinar características específicas do sítio EF-hand, o conjunto de propriedades depende da estrutura terciária, uma vez que sítios homólogos podem possuir afinidades e especificidades bastante diferentes.

SUMMARY

The aim of this thesis was to study affinity and specificity in EF-hand sites, and how these properties are related to the site primary structure, interactions between amino acids in coordinating positions, and probable tertiary structure properties.

The effects of three mutations on the EF-hand Ca^{2+}/Mg^{2+} binding site of smooth muscle myosin regulatory light chain (RLC) were studied: D5S, in which an aspartate is replaced by a serine in position 5 of the loop; D9E, in which an aspartate is replaced by a glutamate in position 9, and D12E, in which the aspartate in position 12 is replaced by a glutamate. All possible combinations of the three mutations were produced. The single mutants D5S and D9E and the double mutant D5S/D9E have low affinity for Ca^{2+}. All the mutants containing mutation D12E are Ca^{2+}-specific and have higher affinities than wild type, even when containing mutations D5S or D9E. All the mutants studied have lower affinity for Mg^{2+} than wild type RLC.

Coupling energies and changes in binding free energy suggest that all positions interact in a non-specific way, and a specific interaction occurs between a serine in position 5 and a glutamate in position 9. This interaction can be seen only in the presence of magnesium, and with an apartate in position 12. Glutamate in position 9 may be able to coordinate Mg^{2+} directly in the double mutant D5S/D9E.

Even though an amino acid or a few amino acids in certain positions can determine specific characteristics for an EF-hand site, the site properties depend on the tertiary structure, since homologue sites can have very different affinities and specificities.

1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho estudamos a ligação de cálcio e magnésio a proteínas EF-hand, utilizando a cadeia leve regulatória de miosina (RLC) como modelo. Para isso, foram utilizados ciclos de duplos mutantes e medidas de ligação de íons por diálise em fluxo.

1.1 Cálcio em sistemas biológicos

Além da função amplamente reconhecida do cálcio na formação de ossos e dentes de vertebrados, uma vasta gama de funções intracelulares estende sua importância a virtualmente todas as células eucarióticas. Desde o século passado já se conhece a necessidade de cálcio para a contratibilidade do coração (Seamon e Kretsinger, 1983), e gradualmente mais e mais funções foram sendo descobertas.

Íons de cálcio são, ao lado do AMP cíclico, os mais importantes segundos mensageiros intracelulares. Variações na concentração de cálcio intracelular estão envolvidas na contração muscular (Ebashi e Endo, 1968), transmissão de impulsos nervosos (através da liberação de neurotransmissores) (Seamon e Kretsinger, 1983), formação de microtúbulos, respostas hormonais, exocitose, fertilização e adesão celular (Martin, 1993), por exemplo. Processos extracelulares também têm a participação de cálcio, como a coagulação (Kendrick e col., 1992).

É possível que, no início da evolução dos organismos, a concentração intracelular de cálcio tenha sido mantida baixa devido à insolubilidade de fosfatos de cálcio e à abundância de ésteres de fosfato no interior da célula (Kretsinger, 1987). No entanto, fosfatos de cálcio são apenas 10 vezes mais insolúveis que fosfatos de magnésio, o que não explica a grande diferença de concentração entre eles. Enquanto o magnésio está presente no interior das células em uma concentração de cerca de $10^{-2,5}$ M, a concentração intracelular de cálcio é de cerca de 10^{-7} M, contra uma concentração extracelular de aproximadamente 10^{-3} M (Kretsinger, 1987). Este gradiente é mantido com gasto de energia, através de uma bomba de cálcio (Ca^{2+}-ATPase) e um trocador de íons Na^{+}/Ca^{2+}, dependente do gradiente de íons de sódio normalmente existente entre o interior e o exterior da célula (Cormier, 1983). Além de serem exportados, os íons de

cálcio são também bombeados para compartimentos celulares, onde são armazenados de forma a regular a concentração citoplasmática. Na maioria das células, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático desempenham esta função. Nas células musculares, o retículo sarcoplasmático tem este papel, podendo ser considerado uma especialização do retículo endoplasmático para o armazenamento de cálcio. A concentração de cálcio livre citoplasmático, e conseqüentemente a magnitude e duração da reação a um estímulo, é portanto regulada através de sistemas de tamponamento (Cormier, 1983). Nos compartimentos intracelulares, o cálcio permanece ligado a proteínas de baixa afinidade (Cormier, 1983), como a calsequestrina e a calreticulina (Berridge, 1993).

Aumentos nos níveis citossólicos de cálcio, de 10^{-7} M para cerca de 10^{-5} M (Kretsinger, 1987), desencadeiam uma série de respostas celulares. Estes aumentos na concentração de cálcio podem decorrer de estímulos mecânicos, elétricos ou químicos (Seamon e Kretsinger, 1983), que podem ativar receptores ligados à proteína G ou a tirosina quinases, ativando a cascata do fosfoinositol, ou abrir diretamente canais de cálcio na membrana.

Quando um receptor acoplado à proteína G (proteína quinase dependente de cGMP) ou um receptor ligado a uma tirosina quinase são ativados, ambos levam à ativação da fosfolipase C, ainda que com latências e intensidades de resposta diferentes (Berridge, 1993). A fosfolipase C cliva o fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, originando diacil glicerol e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). IP_3 liga-se a seu receptor – canais de cálcio intracelulares normalmente localizados na membrana de regiões modificadas do retículo endoplasmático – abrindo os canais e permitindo a passagem de cálcio dos estoques intracelulares para o citosol (Berridge, 1993).

Os canais de cálcio da membrana plasmática podem ser ativados pela despolarização da membrana (canais sensíveis à voltagem) ou por estímulos mecânicos. A abertura destes canais causa a entrada de uma pequena quantidade inicial de cálcio, que desencadeia a liberação de cálcio dos estoques intracelulares, através do mecanismo conhecido como CICR ("calcium induced calcium release") (Endo e col., 1970; Ford e Podolski, 1970). Nesse caso, os íons de cálcio induzem a abertura de canais conhecidos como receptores de rianodina (Inui e col., 1987; Imagawa e col., 1987), igualmente localizados na membrana de regiões modificadas do retículo endoplasmático, causando assim a liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

Diferentes tipos celulares podem possuir um, outro ou ambos tipos de canais de cálcio intracelulares (receptores de IP_3 ou receptores de rianodina), e as diferentes formas de ativação combinadas dão origem a um complexo padrão espaço-temporal de sinalização de cálcio, em cada célula (Berridge, 1993).

Em músculo esquelético, há também um sistema de liberação de cálcio ligeiramente diferente. Um receptor na membrana plasmática dos túbulos T (o receptor de diidropiridina), é ativado pela despolarização da membrana, sofrendo uma mudança conformacional que é transmitida pelo seu domínio citoplasmático ao receptor de rianodina, causando a sua abertura e liberando cálcio do retículo sarcoplasmático para o citoplasma (Lai e col., 1988). Este aumento na concentração de cálcio desencadeia a contração muscular.

O sinal responsável pelo aumento da concentração de cálcio é então propagado e até amplificado pela ligação de cálcio a proteínas regulatórias, que com a ligação do íon sofrem mudanças conformacionais e desencadeiam as respostas celulares. Alguns processos, como a contração muscular, teminam quando a concentração de cálcio intracelular retorna aos níveis de repouso; outros devem prosseguir, iniciando eventos que chegam a se prolongar por toda a vida, como os desencadeados pela fertilização (Seamon e Kretsinger, 1983). Dependendo do alvo da proteína regulatória, efeitos entre estes dois extremos podem ser obtidos.

1.2 Proteínas ligantes de cálcio

Embora a principal função do cálcio ligado a proteínas seja como segundo mensageiro, não é a única. Há dois grupos de proteínas ligantes de cálcio: i) enzimas estabilizadas por íons de cálcio, algumas das quais utilizando os íons na catálise, e ii) proteínas que ligam cálcio reversivelmente, e, em conseqüência, podem modular a ação de enzimas ou tamponar a concentração de cálcio (Glusker, 1991). Em ambos os casos, as coordenações são realizadas por átomos de oxigênio (Kretsinger, 1976), uma vez que cálcio tem alto caráter iônico, e é melhor coordenado por grupos com a mesma característica (Glusker, 1991).

Há uma diferença conceitual entre as enzimas extracelulares ativadas por cálcio e as proteínas intracelulares moduladas por cálcio. Enquanto as primeiras ligam Ca^{2+} desde o

momento em que são secretadas, por toda a duração de sua vida funcional, as proteínas moduladas por cálcio ligam e desligam Ca^{2+} muitas vezes, em resposta às variações intracelulares na concentração desse segundo mensageiro. Por esse motivo, a maioria das enzimas extracelulares possui sítios de baixa afinidade (pK_d~3), compatíveis com a concentração de cálcio no ambiente extracelular (Kretsinger, 1976), e em geral os ligantes de cálcio são provenientes de várias regiões da cadeia polipeptídica. Proteínas extracelulares ligantes de cálcio incluem tripsina (e tripsinogênio), subtilisina, fosfolipase A_2, termolisina, protrombina e fibrina (Glusker, 1991; Kretsinger, 1976).

A maior parte das proteínas moduladas por cálcio, ou regulatórias, não são por si enzimas, mas interagem com e ativam enzimas (Seamon e Kretsinger, 1983). Entre estas proteínas, diferentemente das enzimas acima mencionadas, o sítio de ligação de cálcio geralmente é formado por uma alça de 12 resíduos, ladeada por duas α-hélices, em uma região contínua da proteína (Moncrief e col., 1990). Este tipo de sítio é conhecido como EF-hand, e foi primeiramente identificado entre as hélices E e F da parvalbumina (Kretsinger e Nockolds, 1973). Mais de 500 sítios EF-hand já foram identificados, o que faz deste motivo um dos mais comuns para a ligação de efetores (Falke e col., 1994). No entanto, nem todas as proteínas desta família são regulatórias. Nas diferentes proteínas, sítios EF-hand podem ser Ca^{2+}-específicos ou ligar Ca^{2+} e Mg^{2+}. Dependendo de sua afinidade, especificidade, cooperatividade e cinética, as proteínas podem ser responsáveis pela ativação de uma proteína sinalizadora, tamponamento da concentração de Ca^{2+} em um compartimento celular, ou participar da estabilização da estrutura da proteína (Falke e col., 1994). Assim, sítios Ca^{2+}-específicos são regulatórios, enquanto os sítios estruturais e de tamponamento ligam tanto Ca^{2+} quanto Mg^{2+} (Falke e col., 1994; Linse e Forsén, 1995; Hapak e col., 1989). Os mecanismos que determinam estas propriedades ainda não são completamentente conhecidos.

Os sítos EF-hand usualmente ocorrem em pares intimamente associados em domínios, com as alças dos dois sítios interagindo em uma folha β antiparalela (Strynadka e James, 1989). Peptídeos contendo sítios isolados são capazes de interagir, quando da ligação de cálcio, formando um dímero semelhante ao domínio encontrado na proteína intacta (Shaw e col., 1990). São encontradas proteínas contendo de dois a oito sítios potenciais (Nakayama e col.,

1992), embora nem todos os sítios sejam funcionais (Kawasaki e Kretsinger, 1994). Na realidade, cerca de um terço dos sítios conhecidos não liga cálcio.

A família das proteínas EF-hand pode ser dividida em 45 subfamílias, de acordo com a sua homologia (Kawasaki e col., 1998), indicando evolução a partir de um ancestral comum. Treze destas subfamílias são congruentes entre si, e parecem ter evoluído de um único sítio EF-hand ancestral através de dois ciclos de duplicação e fusão gênica, resultando em dois domínios com dois sítios EF-hand cada. Entre estas subfamílias incluem-se calmodulina, troponina C e as cadeias leves essencial e regulatória da miosina (Kawasaki e col., 1998). Estas proteínas são compostas por 4 sítios EF-hand, nem sempre funcionais, que se organizam em dois domínios unidos por uma α-hélice, dando à proteína a forma de um haltere (Herzberg e James, 1988).

As demais subfamílias de EF-hands incluem: SARC (proteína ligante de cálcio sarcoplasmática), calpaína, aquorina, calbindina, parvalbumina, α-actinina, S100, calcineurina B, proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), proteína fosfatase de treonina e serina (PPTS), diacilglicerol quinase e recoverina, entre outras (Kawasaki e Kretsinger, 1994).

Apesar de sua alta homologia, as proteínas EF-hand diversificaram-se, de forma a exercer várias funções, em vários contextos. Algumas famílias de proteínas possuem, além dos sítios EF-hand, domínios de outras origens, como sítios catalíticos (Kawasaki e col., 1998). Exemplos de algumas famílias são dados a seguir.

Calmodulina é amplamente distribuída entre os organismos eucarióticos e acredita-se que exista na maior parte dos tecidos. Tem um papel relevante na transdução da informação contida em um pulso de íons Ca^{2+} em uma mudança conformacional e de atividade em um grande número de enzimas e proteínas estruturais (Herzberg e James, 1985). É considerada a proteína EF-hand mais característica.

Troponina C é o receptor de cálcio nos músculos esquelético e cardíaco, desencadeando a contração muscular. Também possui quatro sítios, sendo na isoforma esquelética dois específicos para cálcio (no domínio N-terminal) e dois capazes de ligar tanto cálcio quanto magnésio (no domínio C-terminal), em concentrações fisiológicas (Strynadka e James, 1989). Na isoforma cardíaca, o sítio I é inativo, e a proteína possui um total de três sítios funcionais

(Johnson e col., 1980). O papel destas proteínas na regulação da contração muscular será discutido posteriormente (item 1.2.1).

As cadeia leves essencial e regulatória da miosina são classificadas como duas famílias separadas. A cadeia leve essencial da miosina (ELC) possui quatro sítios EF-hand, nenhum dos quais funcional na proteína isolada (Weeds e McLachlan, 1974). Já na cadeia leve regulatória, que será discutida mais detalhadamente no item 1.4, um dos quatro sítios é funcional, ligando Ca^{2+} e Mg^{2+} (Bagshaw e Kendrick-Jones, 1979).

A provável função da parvalbumina no músculo é tamponar a concentração de cálcio, facilitando o relaxamento após a contração. A esta família pertencem as parvalbuminas α e β, a oncomodulina, e o hormônio tímico de aves. Todos os membros desta família possuem três sítios EF-hand em sua seqüência, dos quais o segundo e o terceiro ligam cálcio e magnésio. Acredita-se que estes sítios correspondam ao terceiro e quarto sítio da calmodulina, troponina C e cadeias leves da miosina, e o primeiro sítio tenha sido perdido em uma proteína ancestral (Kretsinger, 1987). Os sítios de parvalbumina têm cinética caracteristicamente lenta (Falke e col., 1994).

Calbindina de 28 kDa, assim como a calretinina, são proteínas com seis sítios EF-hand, capazes de ligar quatro íons de cálcio por molécula (Cheung e col., 1993). A calbindina de 9kDa, apesar da semelhança no nome, pertence a outra subfamília, e é também conhecida como ICBP ("intestinal calcium binding protein"). Ambas as calbindinas estão relacionadas à absorção intestinal de cálcio.

Há ainda famílias de enzimas ativadas diretamente por Ca^{2+}, como proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), diacilglicerol quinase e calpaína (uma cisteína-protease), e fotoproteínas, como a aquorina, que oxida celenterazina a celenterazida, emitindo luz (Shimomura e col., 1999; Shimomura e Johnson, 1978).

Embora a grande maioria das proteínas EF-hand seja intracelular e possua um número par de sítios, há exceções. As proteínas da família da calpaína possuem 5 sítios EF-hand (embora um não seja funcional), e o sítio desemparelhado interage com outro sítio desemparelhado em outra subunidade, formando homo ou heterodímeros (Blanchard e col., 1997; Lin e col., 1997). Por outro lado, BM-40 (osteonectina) é uma proteína EF-hand extracelular (Hohenester e col., 1996).

A ligação de cálcio a proteínas EF-hand regulatórias causa mudanças conformacionais no domínio, que passa de uma conformação "fechada" para uma conformação "aberta", expondo resíduos hidrofóbicos que vão interagir com a proteína-alvo (Falke e col., 1994; Ikura, 1996). É desta forma que proteínas como a calmodulina e a troponina C realizam suas funções (Campbell e Sykes, 1991; Wang e col., 1992).

1.2.1 Troponina e a regulação da contração em músculo estriado

A musculatura estriada (esquelética e cardíaca) é assim conhecida devido ao arranjo característico de sua proteínas em estruturas periódicas, os sarcômeros. Dentro dos sarcômeros, filamentos finos e grossos estão organizados de forma a interagirem entre si. O deslocamento dos filamentos finos com relação aos grossos em direção ao centro do sarcômero causa o encurtamento do sarcômero, observado na contração muscular (Huxley, 1972).

O filamento grosso é composto majoritariamente por miosina, responsável pela força que causa o deslizamento entre os filamentos. O filamento fino é composto principalmente de actina, com a qual a miosina interage, e de tropomiosina e troponina, responsáveis pela regulação da contração muscular em músculo estriado. As cabeças globulares de miosina se projetam para fora do filamento grosso e interagem com o filamento fino. A cabeça da miosina possui atividade Mg^{2+}-ATPásica ativada por actina acoplada a uma mudança conformacional, gerando a força para a contração muscular (Adelstein e Eisenberg, 1980).

A troponina é composta de três subunidades, troponinas T, C e I. Troponina I liga-se à actina e tropomiosina e é a responsável pela inibição da atividade ATPásica da acto-miosina. Troponina C é uma proteína EF-hand, muito similar à calmodulina, que quando da ligação de cálcio suprime a inibição da atividade ATPásica causada pela troponina I (Adelstein e Eisenberg, 1980). A isoforma de troponina C de músculo esquelético possui quatro sítios para ligação de cálcio, sendo dois de alta afinidade (que em condições fisiológicas devem estar sempre ocupados por magnésio) e dois de baixa afinidade, que ligam cálcio quando a concentração intracelular aumenta e geram as alterações conformacionais que levam à supressão da inibição (Wang e col., 1992).

Troponina T liga-se fortemente à tropomiosina (Zot e Potter, 1987) e interage também com as troponinas C e I, ancorando-as ao filamento fino (Mak e Smillie, 1981). É necessária

para a regulação por Ca^{2+} da atividade ATPásica da acto-miosina (Hitchcock e col., 1973), transmitindo ao conjunto do filamento fino as mudanças conformacionais ocorridas quando da ligação de cálcio à troponina C.

Segundo o modelo do impedimento estérico (Huxley, 1972; Haselgrove, 1972), a tropomiosina, na ausência de cálcio, posiciona-se no filamento fino de forma a bloquear a interação estéreo-específica da cabeça da miosina com a actina. Quando a concentração de cálcio na célula aumenta, a mudança conformacional sofrida pela troponina C ao ligar cálcio em seus sítios de baixa afinidade é transmitida através das troponinas I e T para a tropomiosina, que se desloca de sua posição inicial, permitindo a interação "forte" entre a cabeça da miosina e a actina. Esta interação ativa a atividade Mg^{2+}-ATPásica da miosina, que leva à contração muscular.

1.3 Características dos sítios EF-hand

Os sítios EF-hand caracterizam-se por uma região contínua de 29 aminoácidos (Kretsinger, 1987; Kawasaki e Kretsinger, 1994), que contém duas α-hélices ladeando uma alça, na qual se localizam os aminoácidos responsáveis pela coordenação do íon (Marsden e col., 1990). Várias posições, tanto nas hélices quanto na alça, são altamente conservadas entre as mais de 250 proteínas já identificadas que compõem esta família (Kawasaki e Kretsinger, 1994).

A primeira hélice contém 9 resíduos, seguidos pelos 12 resíduos da alça e por mais 8 resíduos da segunda hélice (Kretsinger, 1987). A alça é definida como sendo a região responsável pela ligação do íon, embora seus três últimos resíduos já iniciem a segunda hélice (Falke e col., 1994). Os resíduos podem ser numerados de 1 a 29, dentro do sítio (Kawasaki e Kretsinger, 1994; Kretsinger, 1987), ou apenas de 1 a 12 na alça, sendo as posições nas hélices numeradas de -9 a -1 para a hélice anterior ao sítio, e de 13 a 20 para a hélice posterior ao sítio (Falke e col., 1994). Este segundo método de numeração será preferido aqui.

As α-hélices têm a função de ancorar a alça na conformação correta e comunicar às demais partes da molécula as mudanças conformacionais geradas pela ligação dos íons.

Peptídeos correspondendo à alça isolada possuem baixa afinidade por cálcio (Marsden e col., 1990; Reid e Hodges, 1980).

Cada α-hélice é anfifílica e possui 4 resíduos hidrofóbicos conservados, que participam na estabilização da estrutura da proteína ou interação com proteínas efetoras após a ligação de cálcio. Estes resíduos correspondem às posições -1, -4, -5 e -8 na primeira hélice e 13, 16, 17 e 20 na segunda hélice (Falke e col., 1994). Os aminoácidos hidrofóbicos conservados em cada sítio interagem com resíduos homólogos no segundo sítio EF-hand do domínio, formando um centro hidrofóbico (Kawasaki e Kretsinger, 1994).

Dentro da alça, são bem conservadas as cinco posições cujas cadeias laterais participam da coordenação do íon, ou seja, as posições 1, 3, 5, 9 e 12 do sítio (Kawasaki e Kretsinger, 1994; Falke e col., 1994). Todas estas posições coordenam, direta ou indiretamente, a ligação do íon através de um oxigênio da cadeia lateral (Marsden e col., 1990). Além destas, são bem conservados um aminoácido hidrofóbico na posição 8, que prende a alça ao centro hidrofóbico do domínio (Kawasaki e Kretsinger, 1994), e a glicina da posição 6. Embora não seja essencial para a ligação de cálcio (Drake e col., 1997), glicina nesta posição contribui para o correto dobramento da alça e participa de pontes de hidrogênio que contribuem para a estabilidade do sítio (Falke e col., 1994; Strynadka e James, 1989).

A organização espacial das hélices e da alça no sítio podem ser simuladas por uma mão direita com o indicador estendido, correspondendo à primeira hélice, o dedo médio dobrado, correspondendo à alça, e o polegar estendido, correspondendo à hélice de saída (Figura 1). Esta representação foi inicialmente sugerida quando da determinação da estrutura da parvalbumina (Kretsinger e Nockolds, 1973), para a região entre as hélices E e F, e deu origem ao nome EF-hand.

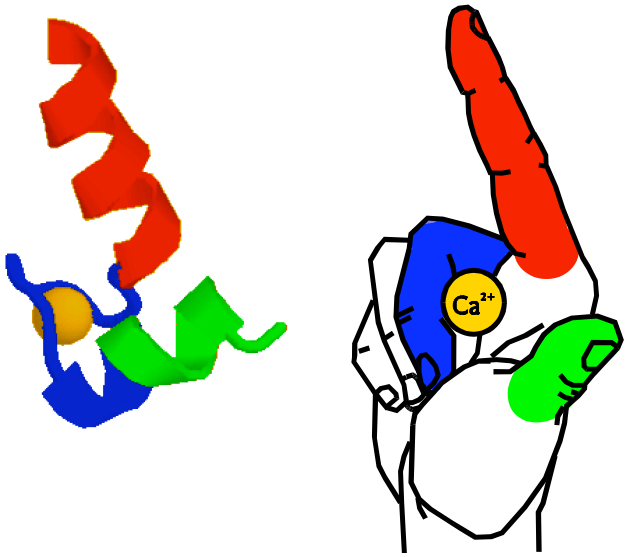


Figura 1: Representação de um sítio EF-hand e sua semelhança com uma mão. A hélice E, em vermelho, corresponde ao indicador, e a hélice F, em verde, ao polegar. A alça, em azul, corresponde ao dedo médio dobrado em torno do íon. Desenhado a partir da figura 13-44 de Stryer (Stryer, 1995), utilizando a estrutura do sítio I da parvalbumina de lúcio, disponível no banco de dados PDB como entrada 2pvb.

Os aminoácidos que participam da coordenação se organizam em torno do íon como em um sistema de coordenadas (Szebenyi e Moffat, 1986), em que o íon ocupa o centro do sistema de eixos, e os aminoácidos, posições positivas e negativas nos eixos X, Y e Z (Figura 2). A coordenação do íon pode ser pentagonal bipiramidal, com 7 coordenações (na ligação de Ca^{2+}) ou octaédrica, com 6 coordenações, quando o sítio liga magnésio (Strynadka e James, 1989). Quando há sete coordenações, um aminoácido (na posição –Z) fornece duas coordenações.

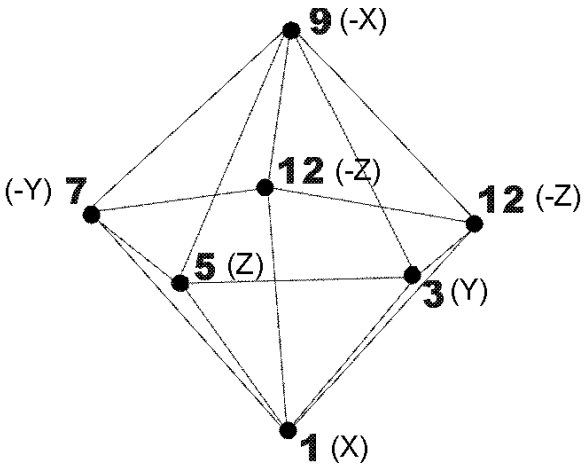


Figura 2: Posições em um sítio EF-hand. (O íon ligado fica no centro da figura.)

As principais características das posições responsáveis pela coordenação do íon são (figura 2):

a) **<u>Posição 1</u>**: Corresponde à posição X do sítio, e é ocupada por um aspartato em 98% dos casos (Da Silva e Reinach, 1991). Participa da coordenação da ligação do íon com um oxigênio da cadeia lateral. Além de coordenar o íon, a carboxila da cadeia lateral deste aminoácido forma um foco em torno do qual os primeiros seis resíduos da alça se dobram, para a formação do sítio (Strynadka e James, 1989). O resíduo nesta posição participa de pontes de hidrogênio que contribuem para estabilizar a conformação do sítio, tanto através da carboxila da cadeia lateral, que faz uma ponte de hidrogênio com a glicina conservada da posição 6, quanto através da carbonila na cadeia principal. A substituição do aspartato por uma alanina inativa o sítio (Negele e col., 1992; Putkey e col., 1989), mas mesmo mutações mais conservativas podem inativar ou diminuir muito a afinidade do sítio. Assim, a substituição do aspartato por uma asparagina pode diminuir muito a afinidade (Marsden e col., 1988) ou mesmo inativar o sítio (Babu e col., 1992). Um glutamato nesta posição também inativa o sítio (Babu e col., 1992).

b) **<u>Posição 3</u>**: Ocupada mais comumente por um aspartato ou asparagina (Marsden e col., 1990; Da Silva e Reinach, 1991), a posição 3 corresponde à posição Y. Nesta posição, a coordenação do íon é realizada por um oxigênio da cadeia lateral. Participa de pontes de hidrogênio com o aminoácido na posição 12 e, caso seja uma asparagina, com as posições 5 ou 9 (Strynadka e James, 1989). Estudos de mutagênese sítio-dirigida mostraram que a substituição de um aspartato nesta posição por uma alanina ou glutamato podem inativar o sítio (Babu e col., 1992), enquanto a substituição de aspartato por asparagina (Waltersson e col., 1993; Reid, 1990) ou asparagina por aspartato (Marsden e col., 1988) podem diminuir a afinidade do sítio.

c) **<u>Posição 5</u>**: Aspartato, serina e asparagina são os aminoácidos mais comuns nesta posição, que é a posição Z do sítio (Marsden e col., 1990; Da Silva e Reinach, 1991). Nos três casos, a coordenação do íon é feita através do oxigênio da cadeia lateral. Esta posição faz pontes de hidrogênio com a posição –X, seja como doador ou aceptor. Serina é particularmente comum no sítio I das parvalbuminas, onde faz uma ponte de hidrogênio com o glutamato na posição 9 (–X). Na maior parte dos demais casos, em que uma molécula de água coordena o íon na posição –X, a asparagina (como doadora) ou o aspartato (aceptor) fazem uma ponte de

hidrogênio com a molécula de água (Strynadka e James, 1989). Exemplos destes dois casos estão mostrados na figura 3.

Mutações nesta posição têm efeitos variados. A substituição de asparagina por aspartato aumenta significativamente a afinidade (Wu e Reid, 1997b; Procyshyn e Reid, 1994a; Reid e Procyshyn, 1995), enquanto a de asparagina por glutamato quase inativa o sítio (Reid e Procyshyn, 1995). A substituição de serina por aspartato aumenta a afinidade (Henzl e col., 1998; Henzl e col., 1996), enquanto a de aspartato por serina leva a uma diminuição na afinidade (Henzl e col., 1998). Já a substituição de aspartato por asparagina diminui muito a afinidade do sítio (Marsden e col., 1988). Vale notar, entretanto, que estes estudos de mutagênese foram realizados com proteínas que não possuem um glutamato na posição 9, mas serina, aspartato ou glicina.

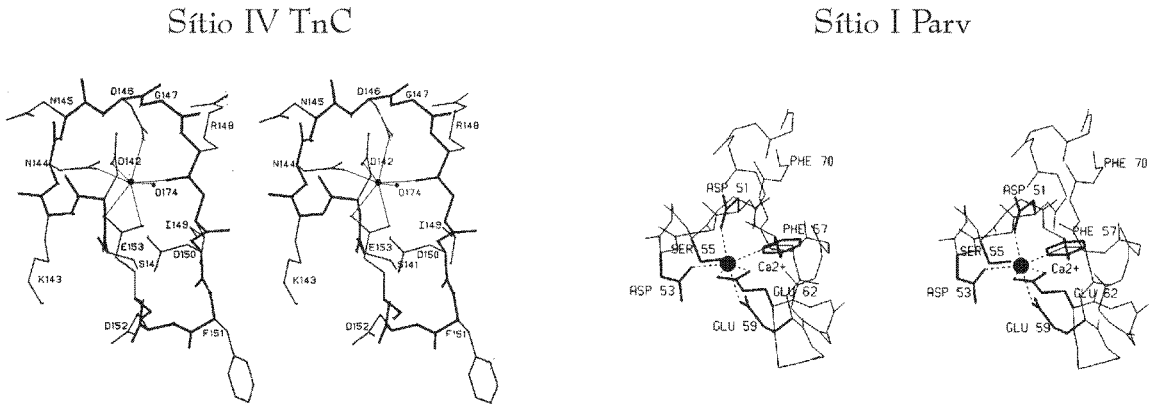


Figura 3: Estereoimagem de dois sítios de ligação de Ca^{2+} e Mg^{2+}: sítio IV da troponina C (Strynadka e James, 1989) e sítio I da parvalbumina (McPhalen e col., 1991). O sítio I da parvalbumina é um exemplo da interação entre serina e glutamato, e o sítio IV da troponina C, entre aspartato ou asparagina e água.

d) <u>Posição 7</u>: A posição 7, correspondente a –Y no sítio, coordena a ligação do íon através do oxigênio da cadeia principal. Por isso, é a posição mais variável de toda a alça, uma vez que a cadeia lateral fica exposta para o solvente. No entanto, parece ser comum uma interação entre entre um grupo aromático, na posição 7 no primeiro sítio de um domínio, e um resíduo básico,

nesta posição no segundo sítio (Strynadka e James, 1989). Este resíduo inicia a folha β entre os dois sítios de um domínio.

e) **<u>Posição 9</u>**: Nesta posição (–X) são encontrados aspartato, serina, glutamato, treonina ou glicina, em ordem de ocorrência (Da Silva e Reinach, 1991; Marsden e col., 1990). Acredita-se que esta posição possua várias funções com relação à estabilização da alça em uma conformação capaz de ligar íons (Strynadka e James, 1989). Pensou-se inicialmente que esta posição coordenaria diretamente a ligação do íon através do oxigênio da cadeia lateral, e é o que ocorre quando há um glutamato ou glutamina nesta posição – os únicos aminoácidos com cadeia lateral suficientemente longa para realizar esta coordenação direta. Exemplos desta coordenação são o sítio I das parvalbuminas (figura 3) e proteína ligante de galactose (GBP), que, embora não seja exatamente uma proteína EF-hand, possui um sítio de cálcio com conformação muito semelhante, que pode ser e tem sido usado como modelo para o estudo de EF-hands (Drake e col., 1996b; Renner e col., 1993; Falke e col., 1991; Drake e Falke, 1996a). Nos demais casos, como no sítio IV da troponina C (figura 3), a cadeia lateral é muito curta para isso, e a posição 9 coordena indiretamente a ligação do íon, através de uma ponte de hidrogênio com uma molécula de água, cujo oxigênio coordena a ligação do íon. Este é também o resíduo que inicia a hélice de saída do sítio, através da formação de pontes de hidrogênio com a posição 12 (Strynadka e James, 1989).

Estudos de mutagênese sugerem que o aminoácido nesta posição é mais importante para definir a cinética do sítio que sua afinidade (Drake e Falke, 1996a; Drake e col., 1996b), embora isto não signifique que as mutações não afetem a afinidade. Quando uma serina na posição 9 é substituída por uma prolina, o sítio é inativado (Haiech e col., 1991). Quando a serina é substituída por um aspartato, a afinidade aumenta muito (Wu e Reid, 1997b; Procyshyn e Reid, 1994a; Reid e Procyshyn, 1995; Procyshyn e Reid, 1994b), mas se esta é substituída por um glutamato, a afinidade diminui bastante (Reid e Procyshyn, 1995; Procyshyn e Reid, 1994b). Quando a glutamina do sítio da GBP é substituída por uma alanina, a afinidade não é alterada (Drake e col., 1996b; Drake e Falke, 1996a). Quando a substituição é por treonina, a afinidade diminui (Drake e col., 1996b; Drake e Falke, 1996a). Quando a glutamina é substituída por glicina, asparagina ou serina, a afinidade aumenta, mas quando a substituição é por um aminoácido negativo, como aspartato ou glutamato, a afinidade diminui

muito (Drake e col., 1996b; Renner e col., 1993; Falke e col., 1991; Drake e Falke, 1996a). Substituições de aspartato por glutamato podem levar a um pequeno aumento na afinidade, quando uma serina está presente na posição 5 (MacManus e col., 1989; Palmisano e col., 1990; Treviño e col., 1991; Hapak e col., 1989), ou uma diminuição quando há um aspartato na posição 5 (Da Silva e col., 1995). Uma redução na afinidade também é encontrada quando o aspartato é substituído por serina (Da Silva e col., 1995). A substituição do aspartato por uma glicina também leva a uma diminuição na afinidade (Henzl e col., 1998), enquanto a mutação inversa (glicina por aspartato) aumenta a afinidade (Henzl e col., 1998; Henzl e col., 1996).

f) <u>Posição 12</u>: A última posição da alça é também a terceira posição da hélice de saída, e ocupa a posição –Z. É ocupada por um glutamato na grande maioria dos casos, que em algumas proteínas é substituído por um aspartato (Marsden e col., 1990; Da Silva e Reinach, 1991). Acredita-se que esta posição seja responsável pela especificidade do sítio, coordenando de forma bidentada ou monodentada de acordo com o íon (Strynadka e James, 1989; Falke e col., 1994). A coordenação de cálcio é realizada de forma bidentada, com os dois oxigênios da carboxila da cadeia lateral, enqanto a coordenação de magnésio é feita com apenas um oxigênio, de forma monodentada. Isto já foi observado na estrutura cristalográfica da parvalbumina (Declercq e col., 1991) e por ressonância magnética nuclear (Blancuzzi e col., 1993). Assim, a ligação de cálcio pelo sítio é feita com 7 coordenações, o número ótimo para Ca^{2+}. Quando um sítio Ca^{2+}/ Mg^{2+} liga Mg^{2+}, cujo número de coordenação é seis, este resíduo sofre uma rotação da cadeia lateral, de forma a participar da coordenação com apenas um oxigênio, reduzindo o número total de coordenações do sítio de 7 para 6, e transformando o sítio de pentagonal bipiramidal em octaédrico. Acredita-se que um sítio Ca^{2+}-específico resulte do impedimento estérico desta rotação, dificultando a ligação de Mg^{2+} (Strynadka e James, 1989; Da Silva e col., 1995). Em sítios Ca^{2+}- específicos, ou seja, que não ligam magnésio em concentrações fisiológicas, observou-se que a posição 12 pode participar da coordenação de magnésio indiretamente, através de uma molécula de água (Andersson e col., 1997), sem alterar sua conformação pela ligação do íon (Malmendal e col., 1998).

A substituição do resíduo na posição 12 por outro aminoácido, não negativo, diminui muito a afinidade, levando até à inativação do sítio. Isso foi observado nas substituições de glutamato ou aspartato por alanina (Carlström e Chazin, 1993; Haiech e col., 1991; Da Silva e col.,

1995), e de glutamato por lisina ou glutamina (Maune e col., 1992b; Maune e col., 1992a). A substituição de um glutamato na posição 12 por um aspartato, no sítio II da parvalbumina, reduz em 100 vezes a afinidade por cálcio, enquanto aumenta a afinidade por magnésio em 10 vezes (Cates e col., 1999).

Além da seletividade por cálcio com relação ao magnésio, necessária nas proteínas regulatórias e baseada principalmente nas diferenças de tamanho e número de coordenação, os sítios EF-hand são seletivos com relação à carga, evitando a ligação de íons monovalentes como potássio, presente em grande quantidade dentro das células.

1.4 A cadeia leve regulatória da miosina (RLC)

Miosina II, a proteína responsável pela geração de força para a contração muscular, é composta por duas cadeias pesadas e quatro leves, sendo duas cadeias leves regulatórias e duas essenciais (Gazith e col., 1970; Gershman e col., 1969). A cadeia pesada é formada por uma cabeça e uma região em α-hélice, que interage com a hélice da outra cadeia pesada em um "coiled-coil". Duas cadeias leves, sendo uma regulatória e uma essencial, interagem com cada cadeia pesada, na região do "pescoço" da molécula, formando o chamado domínio regulatório (Kwon e col., 1990). As denominações das cadeias leves devem-se a razões históricas, uma vez que a cadeia leve essencial não é realmente necessária para a atividade ATPásica (Wagner e Giniger, 1981), embora seja importante para a regulação da contração muscular em músculo de invertebrados (Kwon e col., 1990). Enquanto na musculatura estriada a regulação ocorre no filamento fino, a cadeia leve regulatória participa da regulação em músculo liso e de invertebrados, além de miosinas não-musculares.

Em músculo de invertebrados, dos quais o exemplo mais bem estudado é o molusco vieira, a ativação da contração muscular ocorre através da ligação de cálcio ao domínio regulatório da miosina. Conforme a estrutura determinada para este domínio (Houdusse e Cohen, 1996), o íon se liga de forma não usual ao primeiro sítio EF-hand da cadeia leve essencial (ELC). A coordenação é pentagonal bipiramidal, mas apenas três coordenações são fornecidas por carboxilas da cadeia lateral de aspartatos; três coordenações provêm de

carbonilas da cadeia principal, e a sétima é fornecida por uma molécula de água. Nenhuma das coordenações é bidentada. Embora todos os ligantes pertençam a uma alça de 9 aminoácidos na ELC, a ligação não ocorre na proteína isolada. Para que a ligação ocorra, são necessárias interações cooperativas da ELC com a cadeia leve regulatória e a cadeia pesada da miosina (Jancso e Szent-Györgyi, 1994).

Em músculo liso, onde a regulação também ocorre no filamento grosso, a ativação da contração muscular é feita através da fosforilação de uma serina na região N-terminal da cadeia leve regulatória (RLC) da miosina. Com o aumento da concentração intracelular, íons de cálcio ligam-se à calmodulina, e o complexo cálcio-calmodulina liga-se à quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), ativando-a. A MLCK fosforila a RLC, levando à contração muscular. Para o relaxamento, a RLC é desfosforilada por uma fosfatase. Tanto a MLCK quanto a fosfatase estão sujeitas a uma regulação fina através de fosforilação (Somlyo e Somlyo, 1994; Adelstein e Eisenberg, 1980).

Em músculo esquelético, a fosforilação da RLC foi associada a um aumento na mobilidade das cabeças de miosina (Levine e col., 1995; Adhikari e col., 1999), levando a um aumento na taxa de interação com o filamento fino em concentrações intermediárias de cálcio (Metzger e col., 1989; Sweeney e Stull, 1990). Desta forma, a fosforilação da RLC esquelética leva a um aumento da sensibilidade para cálcio.

Em miosinas não convencionais, calmodulina é encontrada ligada a esta região, no lugar das cadeias leves (Knight e col., 1995).

Assim como a calmodulina, as cadeias leves são proteínas compostas por quatro sítios EF-hand, que no entanto sofreram mutações, de forma a perder a capacidade de ligação de íons. Na cadeia leve essencial, esta perda foi completa, e a proteína isolada não liga íons metálicos em nenhum de seus quatro sítios (Weeds e McLachlan, 1974). Na cadeia leve regulatória de miosina (RLC), o primeiro sítio é funcional, capaz de ligar cálcio e magnésio mesmo quando a proteína está dissociada das demais cadeias da miosina (Reinach e col., 1986; Goodwin e col., 1990; Da Silva e col., 1992).

Esta propriedade faz da RLC de músculo liso (moela) de galinha um bom modelo para estudar as relações entre a seqüência primária e a afinidade e seletividade para íons metálicos em sítios EF-hand. O sítio único facilita a análise de medidas de ligação de Ca^{2+} e Mg^{2+} quando

comparado com as demais proteínas EF-hand, que geralmente posuem dois ou quatro sítios. Além disso, esta proteína já foi clonada e seqüenciada (Messer e Kendrick-Jones, 1988; Zavodny e col., 1988) e pode ser expressa em bactéria e purificada em grande quantidade (Rowe e Kendrick-Jones, 1992) – até mais de 200 mg de proteína por litro de cultura.

A seqüência de aminoácidos do sítio de ligação de Ca^{2+}/Mg^{2+} da RLC é a seguinte (Messer e Kendrick-Jones, 1988):

```
                    X   Y   Z  -Y  -X    -Z
                    1   3   5   7   9    12
F K E A F N M I D Q N R D G F I D K E D L H D M L A S M
α-hélice                alça              α-hélice
```

A estrutura da RLC de músculo liso ainda não foi determinada, mas já estão disponíveis as estruturas cristalinas do domínio regulatório da miosina de vieira, com resolução de 2 Å (Houdusse e Cohen, 1996), e a posição dos carbonos α de S1 (domínio globular da miosina, incluindo a região regulatória) de miosina esquelética de galinha, com resolução de 2,8 Å (Rayment e col., 1993).

Em mutantes de RLC de músculo liso descritos anteriormente (Da Silva e col., 1995), a substituição do aspartato na nona posição da alça por um glutamato (mutação D9E) reduziu a afinidade do sítio, enquanto a mesma substituição na posição 12 (D12E) aumentou a afinidade e converteu o sítio de Ca^{2+}/Mg^{2+} em Ca^{2+}-específico.

Uma possível razão para a afinidade reduzida do mutante D9E é que esta mutação pode afetar as interações que ocorrem entre as posições 5 e 9, desestabilizando o sítio. A posição 9 interage com a cadeia lateral do aminoácido na posição 5 através de pontes de hidrogênio. Quando um glutamato está presente na posição 9, faz uma ponte de hidrogênio com uma serina na posição 5; quando o íon é coordenado por uma molécula de água nesta posição, a água faz uma ponte de hidrogênio com o resíduo na posição 5 (Strynadka e James, 1989). Um glutamato na posição 9 não poderia formar uma ponte de hidrogênio com um aspartato na posição 5, como é o caso do mutante D9E.

Os efeitos da mutação D12E, por sua vez, sustentam a idéia de que a especificidade depende da cadeia lateral do aminoácido na posição 12, coordenando magnésio com um

oxigênio (6 coordenações totais no sítio) e cálcio com 2 oxigênios (7 coordenações no sítio). Na RLC tipo selvagem, o aspartato na posição 12 poderia girar e acomodar tanto Mg^{2+} quanto Ca^{2+}. Quando uma cadeia lateral mais longa está presente, no sítio do mutante D12E, sua rotação seria impedida estericamente, tornando o sítio Ca^{2+}-específico (Da Silva e col., 1995).

1.5 Técnicas utilizadas

Para o estudo das propriedades do sítio EF-hand da RLC, foram feitos mutantes sítio-dirigidos, de forma a serem obtidos ciclos de duplos mutantes; e os mutantes foram analisados quanto à ligação de íons através de diálise em fluxo.

Os princípios da diálise em fluxo e dos ciclos de duplos mutantes serão discutidos aqui; os detalhes de procedimento utilizados em todas as técnicas aplicadas estão descritos em "Materiais e Métodos".

1.5.1 Diálise em fluxo

A ligação de íons a proteínas pode ser medida por métodos diretos ou indiretos. Entre os métodos diretos destacam-se a diálise de equilíbrio (Potter e Gergely, 1975) e a diálise em fluxo (Colowick e Womack, 1969; Womack e Colowick, 1973). Os métodos indiretos incluem fluorescência de sondas acopladas à proteínas (Dong e col., 1996; Johnson e col., 1978), de aminoácidos aromáticos (MacManus e col., 1989; Wu e Reid, 1997a; Wu e Reid, 1997b; Li e col., 1994; Pearlstone e col., 1992) e de lantanídeos (Drake e Falke, 1996a; Falke e col., 1991; Snyder e col., 1990); ressonância magnética nuclear (Malmendal e col., 1998),(Starovasnik e col., 1992; Marsden e col., 1988; Blancuzzi e col., 1993; Li e col., 1995; Biekofsky e col., 1998; Tsuda e col., 1990) e dicroísmo circular (Reid e Procyshyn, 1995; Reid e col., 1981; Reid e col., 1980; Reid, 1990; Procyshyn e Reid, 1994b; Procyshyn e Reid, 1994a). Enquanto os métodos diretos medem a concentração do íon livre, os métodos indiretos medem alterações conformacionais na proteína causadas pela ligação dos íons, e que podem ser influenciadas por outros fatores.

A diálise em fluxo representou um avanço em relação à diálise de equilíbrio, o método direto mais utilizado anteriormente (Colowick e Womack, 1969). Enquanto na diálise de equilíbrio são necessárias várias horas para que ocorra o equilíbrio osmótico entre os dois compartimentos, utilizando-se apenas uma concentração de ligante, na diálise em fluxo as medidas podem ser realizadas em alguns minutos, e podem ser utilizadas várias concentrações de ligante ao longo do ensaio.

Na diálise de equilíbrio, dois compartimentos são separados por uma membrana de diálise, um contendo a proteína e outro não. O ligante marcado é colocado no compartimento contendo a proteína, e difunde-se através da membrana para o outro compartimento, até o equilíbrio. A medida da concentração de ligante livre no compartimento sem a proteína leva ao cálculo do ligante associado à proteína, e à constante de ligação (Potter e Gergely, 1975). Na diálise em fluxo, a taxa de difusão de ligante livre de uma câmara a outra é medida, e assim a concentração de ligante livre na câmara contendo a proteína pode ser rapidamente calculada (Colowick e Womack, 1969). A câmara superior contém a proteína e o ligante marcado, sob agitação, e pela câmara inferior passa um fluxo constante do tampão de ensaio, permitindo a medida da taxa de difusão.

No início do ensaio, são colocados na câmara superior a solução de proteína e o ligante marcado radioativamente (usualmente em molaridade bastante inferior à da proteína). O equilíbrio de ligação entre eles é atingido em frações de segundo. O ligante livre começa a difundir-se através da membrana para a câmara inferior, onde a passagem de um fluxo constante de tampão não permite que ele se acumule. A taxa com que o ligante marcado entra na câmara inferior é proporcional à concentração de ligante livre na câmara superior, e pode ser medida a partir da concentração do radioisótopo no efluente da câmara inferior. Após a passagem de suficiente tampão na câmara inferior (cerca de 4 vezes seu volume), um equilíbrio dinâmico ("steady-state") é atingido: a quantidade de ligante radioativo que entra na câmara é a mesma que sai, e são coletadas amostras para determinação da concentração de ligante livre.

Uma vez que a medida da taxa de diálise envolve a perda de uma fração desprezível do ligante total, a mesma mistura pode ser usada para uma série de medidas de equilíbrio, em concentrações crescentes de ligante não marcado. A subseqüente adição de ligante não-marcado na câmara superior desloca o equilíbrio da ligação, e a concentração de ligante livre aumenta

para um novo valor de equilíbrio, aumentando a taxa de difusão. Após a passagem de suficiente tampão, novo equilíbrio dinâmico é atingido, e assim por diante. Na última adição, uma grande quantidade de ligante não-marcado é utilizada, de forma a deslocar praticamente todo o ligante marcado ligado à proteína, e a taxa de difusão refletir o ligante marcado total. A concentração de isótopo no efluente atinge então seu valor máximo, que será utilizado como referência para calcular o ligante livre nas demais concentrações. Assim, são realizadas medidas de equilíbrio da ligação em várias concentrações de ligante com a mesma amostra de proteína. Podem ser realizadas novas adições enquanto a quantidade de ligante marcado que se difunde para a câmara inferior for uma fração desprezível do total.

Um ensaio de competição, pelo método de diálise em fluxo, é realizado na presença de uma dada concentração de ligante não marcado no tampão (nas duas câmaras). O ligante marcado é adicionado no início do ensaio, e nas demais adições é acrescentado o competidor. Na última adição deve sempre ser utilizado ligante não marcado, uma vez que o objetivo é saturar os sítios de ligação para que a taxa máxima de difusão de ligante radioativo seja obtida.

Os valores obtidos para a concentração de ligante livre em cada ponto são utilizados para calcular a constante de dissociação dos sítios. No caso de proteínas com vários sítios de ligação, as constantes obtidas representam mais corretamente as constantes macroscópicas. No caso de proteínas com apenas um sítio, como a RLC, as constantes macroscópica e microscópica se equivalem, e a ligação ocorre como descrito pela equação 1:

$$y = \frac{[X]}{[X] + K_X} \qquad \text{(eq. 1)}$$

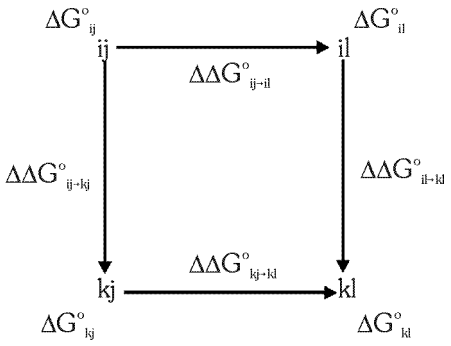
onde y é o número de sítios ocupados por mol de proteína, $[X]$ é a concentração do ligante e K_X é a constante de dissociação do ligante.

1.5.2 Ciclos de duplos mutantes

Ciclos de duplos mutantes, aplicados pela primeira vez por Carter e col. (Carter e col., 1984) têm sido utilizados para determinar se existe interação entre dois resíduos, e em alguns casos até quantificá-la. Em um sítio de interação proteína-ligante, permitem analisar cooperatividade intramolecular, estimar interações entre pares de posições e medir o quanto

cada posição interfere na interação de outras posições com o ligante (Faiman e Horovitz, 1996; Horovitz e Fersht, 1990; Horovitz, 1987).

Uma representação típica de um ciclo de duplos mutantes é a seguinte:



O ciclo inclui a proteína tipo selvagem (ij), dois mutantes simples (il e kj) e o mutante duplo correspondente (kl). A partir das constantes de dissociação do íon em cada proteína, é possível calcular a energia livre aparente de ligação (ΔG_{ij}), e as mudanças nesta energia causadas pelas mutações ($\Delta\Delta G_{ij\rightarrow il}$). A diferença energética entre o duplo mutante e as duas mutações consideradas separadamente é definida como a energia de acoplamento entre estas mutações, e calculada com a equação: $\Delta\Delta G_{i\leftrightarrow j}=\Delta\Delta G_{il\rightarrow kl} - \Delta\Delta G_{ij\rightarrow kj}=\Delta\Delta G_{kj\rightarrow kl} - \Delta\Delta G_{ij\rightarrow il}$ (Horovitz e Fersht, 1990; Horovitz, 1987; Faiman e Horovitz, 1996)

Se o efeito da dupla mutação não é igual à soma dos efeitos das duas mutações simples, isto significa que a interação da primeira posição com o íon foi afetada por uma mutação na segunda posição. Portanto, estas posições interagem de alguma forma, e não são independentes (Horovitz e Fersht, 1990). Esta interação pode ser direta (através de uma ponte de hidrogênio entre cadeias laterais que participam da coordenação, por exemplo), conformacional (uma das mutações afeta a conformação do esqueleto de carbono) ou através do íon ligado, e pode ser medida através da energia de acoplamento (Faiman e Horovitz, 1996).

Quando um mutante tem energias de acoplamento com os mesmos valores com todas as outras posições, a explicação mais provável é que esta mutação causa algum efeito inespecífico em todas as outras posições, por exemplo através de uma mudança conformacional que afeta todo o sítio (Hidalgo e MacKinnon, 1995), ou transmitindo as mudanças nas interações através do íon. Quando uma mutação possui energia de acoplamento

significativa com uma única outra, isso provavelmente reflete uma interação mais específica, como uma ponte de hidrogênio, diretamente entre as duas posições ou através de uma molécula de água.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estudar a afinidade e especificidade de sítios EF-hand, através de mutantes sítio-dirigidos, e correlacionar estas propriedades com a estrutura primária do sítio, com as interações entre aminoácidos nas posições de coordenação, e com prováveis características da estrutura terciária da proteína.

Para isso, foi utilizada a cadeia leve regulatória da miosina (RLC) de músculo liso (moela) de galinha. Foram construídos mutantes sítio-dirigidos, formando ciclos de duplos mutantes, que permitem o estudo de interações entre posições no sítio. As posições a serem mutadas foram escolhidas a partir de mutantes simples realizados anteriormente (Da Silva e col., 1995) e interações entre posições em sítios EF-hand já descritas em outras proteínas (Strynadka e James, 1989).

Foram mutadas as posições 5, 9 e 12 do sítio, que participam da coordenação do íon com a cadeia lateral. Além dos mutantes simples realizados previamente (D9E e D12E), foi produzido o mutante simples D5S, três mutantes duplos (D5S/D9E, D5S/D12E e D9E/D12E) e o mutante triplo, com as três posições modificadas (D5S/D9E/D12E).

Para correlacionar as propriedades encontradas com características estruturais, as mutações foram modeladas no sítio EF-hand da cadeia leve regulatória de miosina de vieira, uma vez que a estrutura cristalina do domínio regulatório da miosina de músculo de vieira foi determinada com resolução de 2,0 Å (Houdusse e Cohen, 1996). RLC isolada é muito flexível para ser cristalizada ou ter sua estrutura determinada por ressonância magnética nuclear.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos mutantes de RLC

3.1.1 Mutação sítio-dirigida

Os mutantes foram produzidos segundo o método de Kunkel, de mutagênese mediada por oligonucleotídeos através de seleção contra fitas molde que contêm uracila (Sambrook e col., 1989c).

O mutante D5S foi produzido a partir do cDNA de RLC tipo selvagem, os duplos mutantes D5S/D9E e D9E/D12E foram produzidos a partir do cDNA do mutante D9E, e o duplo mutante D5S/D12E foi produzido a partir do mutante D12E. O triplo mutante D5S/D9E/D12E foi produzido com um novo ciclo de mutagênese a partir do duplo mutante D5S/D9E. Em todos estes casos, os cDNAs estavam clonados em vírus M13mp19, sob a forma de uma proteína de fusão com a proteína CII de *Escherichia coli* (Da Silva e col., 1995).

Os oligonucleotídeos usados foram:

D5S: 5' CCAGAACCGT**TC**CGGGTTCATT 3'

D12E: 5' AGAAGGAGGA**G**CTGCATGACA 3'

As bases correspondentes às mutações estão sublinhadas e em negrito.

3.1.2 Seleção dos mutantes

Placas de lise resultantes de bactérias transfectadas com o produto da mutação (Sambrook e col., 1989c) foram utilizadas para preparação de DNA fita simples do bacteriófago M13, em pequena escala (Sambrook e col., 1989b). As placas de lise foram recuperadas com um palito estéril e inoculadas em 1,5 mL de meio de cultura 2xTY (16 g/L triptona; 10 g/L extrato de levedo; 5 g/L NaCl; pH 7,4), com 15 μL de uma cultura saturada de *E. coli* JM101. O restante do procedimento foi realizado conforme descrito (Sambrook e col., 1989b).

A região mutada do DNA fita simples dos clones mutantes foi seqüenciada pelo método de Sanger, de terminação de cadeia por didesoxinucleotídeo (Sambrook e col., 1989a). Foi utilizado como "primer" o oligonucleotídeo SMR2 (5' TTCGTATGTTCGACCAGTCA 3'). Um clone representante de cada mutação foi totalmente seqüenciado, utilizando os

oligonucleotídeos SMR2 e SMR3 (5' TTGGGGAGAAGCTCAATGGC 3'), para verificar que nenhuma mutação adicional indesejada tivesse ocorrido.

Os clones mutantes assim selecionados foram produzidos em larga escala na forma replicativa (RF) do vírus M13 (Sambrook e col., 1989b), e purificados por centrifugação de equilíbrio em gradiente de CsCl – brometo de etídio (Sambrook e col., 1999) para subclonagem no vetor de expressão.

3.2 Expressão e purificação das cadeias leves

3.2.1 Vetor de expressão pT7Smo

O vetor utilizado para expressão foi o pT7Smo (Rowe e Kendrick-Jones, 1992), derivado do pMW172 (Way e col., 1989) (figura 4), que por sua vez corresponde a cerca de metade do pET3c, incluindo a região do promotor e terminador de transcrição, e o gene que confere resistência à ampicilina.

Este vetor utiliza o promotor Φ10 do bacteriófago T7, e o terminador de transcrição t10. O cDNA da RLC foi clonado em sítios de restrição de *Bam*HI/*Eco*RI. A expressão da proteína pode ser feita em bactérias que possuem o gene da T7 RNA polimerase integrado, como as utilizadas no sistema pET de expressão (Studier e Moffatt, 1986).

3.2.2 Subclonagem dos mutantes no vetor de expressão

Os clones contendo as mutações desejadas foram utilizados para substituir o fragmento tipo selvagem entre os sítios das enzimas de restrição *Hin*dIII (na porção inicial do gene, interno à proteína) e *Eco*RI (após a extremidade 3' do gene) no plasmídeo pT7Smo (figura 4). Desta forma, os mutantes foram expressos sem a região da proteína CII de *E. coli*, embora a mutação tenha sido feita em um cDNA de proteína de fusão.

Os RFs contendo os clones mutantes e o vetor pT7Smo foram digeridos com as enzimas *Hin*dIII e *Eco*RI (New England Biolabs), utilizando-se o tampão NEB2, do mesmo fabricante, por 3 horas a 37° C.

O produto da digestão de M13mp19 contendo os clones mutantes foi analisado por eletroforese em gel 1% de agarose de baixo ponto de fusão, 1xTAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA), corado com brometo de etídio. As bandas correspondentes ao fragmento e ao

vetor sem o inserto foram excisadas, e o DNA foi purificado utilizando-se GeneCleanII (BIO 101) ou através do seguinte protocolo: adicionou-se às bandas excisadas e maceradas igual volume de fenol saturado em TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA), e cerca de 1/5 do volume de TE. A mistura, após "vortexar" por 1 minuto, foi congelada a – 80° C por 10 minutos, e descongelada em água corrente. Após "vortexar" novamente, as fases foram separadas por centrifugação a 14 krpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, e a extração foi repetida com adição à fase orgânica de cerca de 1/5 do volume de fenol saturado com TE e da mesma quantia de TE. A fase aquosa resultante foi adicionada à primeira e extraída duas vezes com clorofórmio. O DNA na fase aquosa resultante foi precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol, congelado a – 80° C por 2 horas, descongelado em água corrente, e centrifugado a 14 krpm por 10 minutos. Após aspirar o sobrenadante, 500 μL de etanol a 80% foram adicionados, e a preparação foi centrifugada novamente por 5 minutos. Após aspirar novamente o sobrenadante, o precipitado foi seco a vácuo por 10 minutos e ressuspendido em 10 μL de tampão TE.

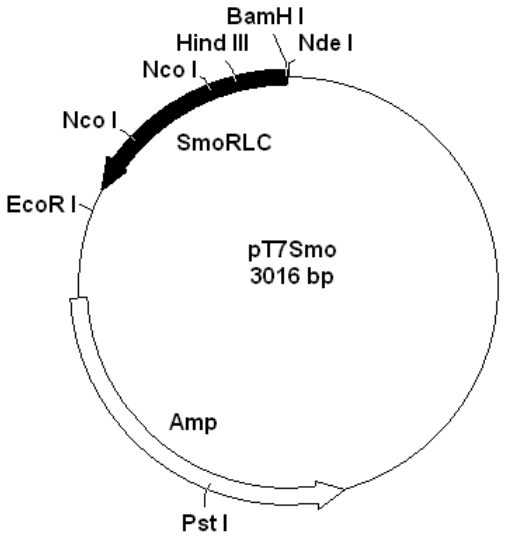


Figura 4: Vetor pT7Smo. SmoRLC: gene da cadeia leve regulatória de miosina de músculo liso; Amp: gene para resistência à ampicilina.

Os insertos e o vetor purificados foram misturados nas proporções 1:2 e 1:4 (vetor:inserto, mol:mol) e ligados com T4 DNA ligase (New England Biolabs), com o tampão fornecido pelo fabricante, a 16º C durante a noite. O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* HMS 174 por método modificado de Mandel e Higa (Mandel e Higa, 1970). 100 mL de meio de cultura 2xTY foram inoculados com 1 mL de uma cultura saturada da bactéria, e incubados a 37º C até atingirem DO_{600}=0,3. As bactérias foram então coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos em rotor Sorvall SS34, a 4º C, ressuspendidas em 10 mL de acetato de sódio 20 mM, pH 6,5 e $CaCl_2$ 100 mM, e incubadas no gelo por 30 minutos. As bactérias foram novamente centrifugadas, podendo então ser ressuspendidas em 4 mL da mesma solução, para uso imediato (200 μL de bactéria por ponto de transformação) ou ressuspendidas em 3,2 mL da solução e 0,8 mL de glicerol, e congeladas. Tanto na utilização das bactérias competentes frescas quanto congeladas, o DNA foi adicionado e a bactéria foi incubada por 30 minutos no gelo, 90 segundos a 42º C e 10 minutos no gelo, e então plaqueada em meio sólido TYE (10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 8 g/L NaCl; 15 g/L ágar), com alça de Drigalski.

Colônias resistentes à carbenicilina (o mesmo gene *Amp* confere resistência à ampicilina e à carbenicilina) foram selecionadas para preparação de plasmídeo em pequena escala por lise alcalina (Sambrook e col., 1999). A presença do inserto foi verificada através da digestão dos plasmídeos com *Nco*I e *Pst*I (ver figura 4), com tampão NEB4 (New England Biolabs) a 37º C por 3 horas. Os clones com o padrão de fragmentos esperado foram testados para expressão de RLC.

E. coli BL21 (DE3) foram transformadas pelo método de alta eficiência descrito por Hanahan (Hanahan, 1985), e 3 mL de meio de cultura 2xTY contendo 200 μg/mL de carbenicilina foram inoculados com um palito contendo a bactéria. As culturas foram incubadas a 37º C até atingirem DO_{6oo} =0,9 – 1,2. Neste ponto adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,4 mM e as bactérias foram incubadas por mais 3 horas, após o que foram recuperadas por centrifugação (12.000g, 5 minutos). O precipitado foi ressuspendido em 1 x tampão de amostra para SDS-PAGE (4% SDS; 20% glicerol; 20 mM Tris-Cl pH 6,8;

0,1% 2-mercaptoetanol; 0,2% azul de bromofenol). As bactérias foram lisadas por fervura, e o extrato total foi analisado por SDS-PAGE 15% para verificar a presença da proteína induzida.

Um clone de cada plasmídeo positivo para as proteínas foi produzido em larga escala pelo método da lise alcalina e centrifugação de equilíbrio em gradiente de CsCl – brometo de etídio (Sambrook e col., 1999) ou utilizando colunas QIAGENTip500 (QIAGEN).

3.2.3 Expressão de RLC em larga escala

Para a expressão, *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com plasmídeos pT7Smo através do método de alta eficiência descrito por Hanahan (Hanahan, 1985). As colônias transformadas foram testadas para a expressão de RLC conforme descrito no item anterior.

O clone de melhor expressão foi induzido em larga escala (4 L 2xTY) conforme o método utilizado para o teste de expressão, mas a 34° C e incubando por 4 horas e meia após a indução. Esta temperatura mais baixa resulta em proteínas mais solúveis, uma vez que menor quantidade da proteína expressa fica em corpos de inclusão. As bactérias foram coletadas por centrifugação (rotor Sorvall GS3, 7.000 rpm, 10 minutos) e congeladas.

3.2.4 Purificação de RLC

O precipitado de bactéria foi ressuspendido em 25% sacarose, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM Tris-Cl pH 7,5 (25 mL/litro de cultura), e lisado por sonicação, em pulsos de 15 segundos, ou por "French Press" (16.000 psi) até a solução não estar mais viscosa.

Ao lisado, adicionou-se igual volume de ácido tricloacético a 6% lentamente, no gelo e sob agitação. Centrifugou-se a mistura a 5.000 rpm por 5 minutos em um rotor Sorvall GSA ou GS3. O precipitado foi ressuspendido em 50 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,5 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-mercaptoetanol, e o pH desta solução foi acertado para 7,0 com adições de Tris base 2 M. A suspensão foi dialisada contra 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,5 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-mercaptoetanol e, após a diálise, centrifugada a 40 krpm por 40 minutos em uma ultracentrífuga Hitachi, rotor RP50T2. O precipitado foi reservado para posterior purificação, e ao sobrenadante adicionou-se uréia para uma concentração final de 6 M, aplicando-o em seguida em uma coluna de cromatografia DEAE-Sepharose Fast Flow (diâmetro=1,6 cm, altura=40 cm), previamente equilibrada com tampão (6 M uréia, 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 2

mM 2-mercaptoetanol, 0,5 mM $MgCl_2$), com um fluxo de 250 mL/hora. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até que o efluente, monitorado por absorção de luz UV de 280 nm, tivesse absorbância próxima à do tampão puro. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 0 a 400 mM NaCl (250-250 mL), no mesmo tampão, sendo coletadas frações de 10 mL. As frações correspondendo ao pico de absorção de luz UV foram analisadas por SDS-PAGE 15%. As frações contendo RLC foram dialisadas contra o tampão sem uréia.

O precipitado da ultracentrifugação foi ressuspendido no mesmo tampão, com 6 M uréia, e novamente centrifugado, nas mesmas condições. O sobrenadante desta ultracentrifugação foi aplicado à coluna DEAE-Sepharose e submetido ao mesmo procedimento descrito acima.

Após a diálise para a retirada da uréia, adicionou-se NaCl para 3 M às soluções de proteína, que foram aplicadas a uma coluna Phenyl-Sepharose CL 4B (diâmetro=2,6 cm, altura=25 cm), equilibrada com 3 M NaCl, 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 0,5 mM $MgCl_2$, 2 mM 2-mercaptoetanol, com um fluxo de 120 mL/hora. A coluna foi lavada com o mesmo tampão até que o efluente, monitorado por absorção de luz UV de 280 nm, tivesse absorbância próxima à do tampão puro. As proteínas foram eluídas com gradientes de 3 a 1,5 M NaCl (125-125 mL) e de 1,5 a 0 M NaCl (125-125 mL), no mesmo tampão, sendo coletadas frações de 10 mL. As frações correspondendo ao pico de absorção de luz UV foram analisadas por SDS-PAGE 15%. As frações contendo RLC foram agrupadas e dialisadas contra 25 mM Tris-Cl pH 7,5; 0,5 mM $MgCl_2$; 2 mM 2-mercaptoetanol. A concentração de proteínas nestas soluções foi determinada através do método de Lowry modificado por Hartree (Hartree, 1972), usando como padrão uma solução de albumina bovina (BSA) cuja concentração foi determinada por espectrofotometria ($\varepsilon_{280}^{1\ mg/ml} = A_{280} - A_{320} = 0{,}667$). Quando necessário, as proteínas foram concentradas por precipitação com 90% $(NH_4)_2SO_3$, ou em célula de ultrafiltração Amicon.

3.3 Análise dos mutantes

3.3.1 Tratamento para a retirada de Ca^{2+} e Mg^{2+} de RLC

As proteínas foram dialisadas para a retirada de cálcio e magnésio, utilizando-se membranas Spectra/Por 2 (com limite de peso molecular de 12 a 14 kDa), produzidas por

Spectrum Medical Industries. Foram realizadas várias trocas de tampão, com intervalo mínimo de 10 horas entre elas, e com volume de tampão maior ou igual a 40 vezes o volume da solução de RLC. Os tampões utilizados (duas trocas cada) foram:

1) 5 mM EDTA pH 7,0, 12,5 mM Imidazol pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoetanol;
2) 2 mM EDTA pH 7,0, 12,5 mM Imidazol pH 7,0, 100 mM NaCl, 1mM 2-mercaptoetanol;
3) 12,5 mM Imidazol pH 7,0, 100 mM NaCl, 1mM 2-mercaptoetanol;
4) 20 mM Imidazol pH 7,0, 100 mM NaCl, 1mM 2-mercaptoetanol;

Em todas as soluções e tampões foi utilizada água Milli-Q, e toda a vidraria foi previamente tratada com 5 mM EDTA, e este procedimento foi repetido a intervalos de tempo, para prevenir a liberação de cálcio pelo vidro.

Após as diálises, a concentração de EDTA foi estimada em menos de 10^{-9} M, enquanto a concentração de cálcio contaminante (presente nos componentes das soluções) foi estimada em cerca de 10^{-6} M.

A concentração de proteína foi determinada como descrito no item 3.2.4, e para cada proteína foram feitas três medidas independentes, sendo utilizada a média.

3.3.2 Medida das constantes de dissociação de cálcio e magnésio nas RLCs

As medidas de ligação de cálcio e magnésio foram feitas através de diálise em fluxo (Colowick e Womack, 1969; Womack e Colowick, 1973; Feldmann, 1978). As medidas de ligação de cálcio foram feitas diretamente, enquanto as constantes de dissociação de magnésio foram calculadas a partir de ensaios de competição entre cálcio e magnésio. O aparato utilizado está representado na figura 5 (Feldmann, 1978).

O aparato consiste em uma célula de diálise em cuja câmara superior são colocados a proteína e o ligante marcado, sob agitação, separados da câmara inferior por uma membrana de diálise. A câmara inferior tem a forma de uma espiral, por onde passa um fluxo contínuo de tampão de ensaio. Esta espiral é aberta, de forma que durante todo o percurso o tampão fique em contato com a membrana. A forma espiral elimina a necessidade de agitação nesta câmara, e

permite que seu volume seja reduzido. A saída da câmara inferior é conectada a um coletor de frações.

O tampão utilizado nos ensaios é o mesmo da última troca da diálise, sendo acrescentados 40 μM $CaCl_2$ não marcado radioativamente nos ensaios de competição entre a ligação de cálcio e magnésio. A membrana de diálise utilizada entre os dois compartimentos foi Spectra/Por 2 (Spectrum Medical Industries), fervida uma vez em 5 mM EDTA e 2% $NaHCO_3$, 2 vezes em 5 mM EDTA e 4 vezes em água Milli-Q. Todas as fervuras foram feitas em béquer de plástico, em forno de microondas, por 10 minutos. Outras marcas de membrana apresentaram problemas diversos, desde a ligação inespecífica de cálcio até ficarem muito enroladas após o tratamento, impossíveis de serem manipuladas. Em trabalhos anteriores (Da Silva e col., 1995), foram usadas membranas Servapor.

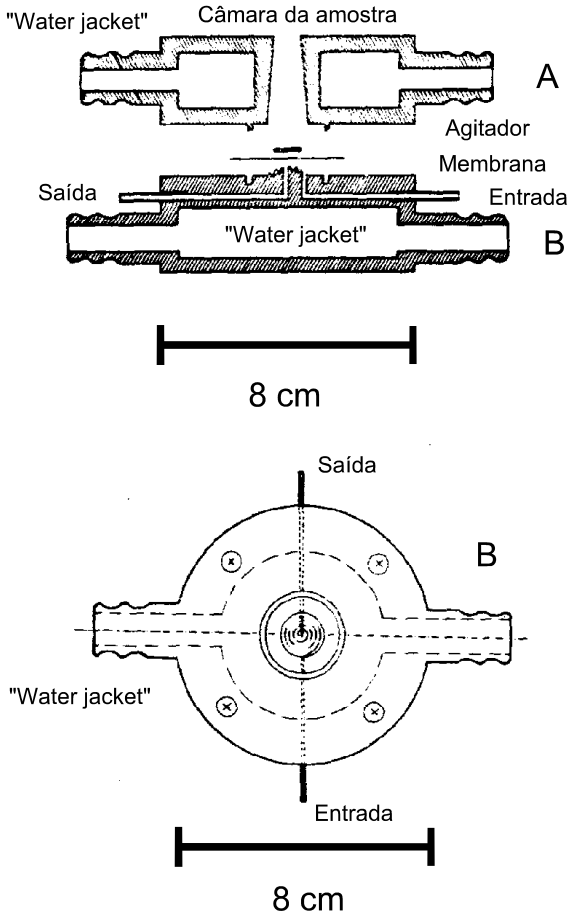


Figura 5: Diagrama do aparato para diálise em fluxo. Em cima: corte transversal; A) câmara superior; B) câmara inferior. Embaixo: vista superior da câmara inferior (B). (Feldmann, 1978)

Na câmara superior foram colocados 5 mL da solução de RLC (5,0 a 7,4 x 10^{-5} M). O fluxo na câmara inferior foi de 420 mL/hora, e o efluente foi coletado em frações de 1,6 mL, dos quais 0,8 mL foram adicionados a 5 mL de líquido de cintilação e tiveram sua radioatividade medida em um cintilador Beckman LS 1801. 10 μCi de $^{45}Ca^{2+}$ foram utilizados por ensaio. As adições de $CaCl_2$ não-radioativo ou $MgCl_2$ estão descritas na tabela 1 e foram realizadas de forma a garantir que o equilíbrio dinâmico fosse atingido. A última adição satura os sítios da proteína, liberando praticamente todo o $^{45}Ca^{2+}$. Tem-se assim a taxa máxima de difusão de Ca^{2+} radioativo, utilizada para normalizar os demais pontos da curva. Em cada equilíbrio dinâmico foram coletados três pontos, utilizando-se a média.

Os cálculos para determinar as constantes de dissociação foram feitos da seguinte forma:

1) as médias de contagens de radioatividade obtidas em cada ponto foram divididas pela contagem máxima média, para obter-se a fração de cálcio livre na câmara superior;

2) a fração de cálcio livre foi multiplicada pela concentração total de cálcio, para obter-se a concentração de cálcio livre;

3) a concentração de cálcio livre foi, por sua vez, subtraída da concentração total de cálcio, obtendo-se a concentração de cálcio ligado;

4) a concentração de cálcio ligado foi dividida pela concentração de proteína, resultando na razão moles de Ca^{2+} ligado/mol RLC (r).

Os dados de ligação de cálcio foram foram colocados em um gráfico segundo o plot de Klotz (Klotz, 1946; Klotz, 1973) e ajustados na equação de ligação (semelhante à equação 1) abaixo, com o ajuste de curvas por regressão não-linear iterativa do programa Sigma Plot, determinando assim a constante de dissociação.

$$y = \frac{n_1'[Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}] + K_{Ca^{2+}}} \qquad \text{(eq. 2)}$$

n_1' é um fator de correção para ligações inespecíficas (Da Silva e col., 1995). Valores de n_1' maiores que 1 indicam ligações inespecíficas de Ca^{2+} a outras regiões da proteína ou ao aparato e à membrana, enquanto valores inferiores sugerem que uma fração da proteína está inativa.

	Ligação de cálcio				Competição entre Ca^{2+} e Mg^{2+}	
	Selvagem, D12E, D5S/D12E, D9E/D12E e D5S/D9E/D12E		D5S, D9E e D5S/D9E		Todos	
Fração	volume	solução	volume	solução	volume	Solução
2	2 μCi	$^{45}CaCl_2$	2 μCi	$^{45}CaCl_2$	2 μCi	$^{45}CaCl_2$
11	5 μL	5 mM $CaCl_2$	-	-	2 μL	250 mM $MgCl_2$
16	5 μL	5 mM $CaCl_2$	5 μL	5 mM $CaCl_2$	8 μL	250 mM $MgCl_2$
21	5 μL	5 mM $CaCl_2$	5 μL	5 mM $CaCl_2$	10 μL	250 mM $MgCl_2$
26	5 μL	5 mM $CaCl_2$	5 μL	5 mM $CaCl_2$	20 μL	250 mM $MgCl_2$
31	5 μL	5 mM $CaCl_2$	5 μL	5 mM $CaCl_2$	30 μL	250 mM $MgCl_2$
36	10 μL	5 mM $CaCl_2$	5 μL	5 mM $CaCl_2$	30 μL	250 mM $MgCl_2$
41	25 μL	5 mM $CaCl_2$	10 μL	5 mM $CaCl_2$	40 μL	250 mM $MgCl_2$
46	-	-	25 μL	5 mM $CaCl_2$	20 μL	250 mM $MgCl_2$
48	5 μL	40 mM $CaCl_2$	-	-	-	-
51	-	-	5 μL	40 mM $CaCl_2$	40 μL	250 mM $MgCl_2$
56	10 μL	40 mM $CaCl_2$	10 μL	40 mM $CaCl_2$	70 μL	1 M $CaCl_2$
66	50 μL	1 M $CaCl_2$	50 μL	1 M $CaCl_2$	Fim	
76	Fim		Fim			

Tabela 1: Adições de $CaCl_2$ e $MgCl_2$.

Os dados dos ensaios de competição entre a ligação de cálcio e magnésio foram colocados em um gráfico de moles de Ca^{2+}/mol RLC x concentração de Mg^{2+} (em milimolares), e foram ajustados na seguinte equação de ligação:

$$y' = \frac{[Ca^{2+}]K_{Mg^{2+}}}{n_2'(K_{Mg^{2+}}K_{Ca^{2+}} + K_{Ca^{2+}}[Mg^{2+}] + K_{Mg^{2+}}[Ca^{2+}])} \qquad \text{(eq. 3)}$$

onde n_2' é um fator de correção para ligações inespecíficas, $K_{Mg^{2+}}$ é a constante de dissociação de magnésio e $K_{Ca^{2+}}$ é a constante de dissociação de cálcio, obtida através dos ensaios de ligação de cálcio. Esta equação foi obtida a partir das equações de ligação de cálcio e de magnésio, assumindo competição pelo sítio de ligação na proteína.

Os valores médios das constantes foram obtidos calculando-se a média e o desvio-padrão entre as constantes obtidas para cada experimento. Os pontos da curva média são a

média entre os pontos dos vários experimentos, e a curva média foi traçada a partir das constantes médias.

Para cada mutante, foi calculada ainda a razão entre as constantes de dissociação de magnésio e cálcio, que pode ser considerada uma medida de especificidade do sítio.

3.3.3 Cálculo das energias livres de ligação e de acoplamento

A partir das constantes de dissociação de cálcio, foram calculadas as mudanças na energia livre aparente de ligação de cálcio e magnésio causadas por cada mutação, segundo a equação 4:

$$\Delta\Delta G^{o}_{app} = -RT\ln\left({K_1}/{K_2} \right) \qquad \text{(eq. 4)}$$

onde K_1 e K_2 são as constantes de dissociação da proteína com e sem a mutação, respectivamente.

Através dos ciclos de duplos mutantes (item 1.5.2), foi calculada a energia de acoplamento entre cada par de mutações (Faiman e Horovitz, 1996; Horovitz e Fersht, 1990; Horovitz, 1987), na ausência e na presença da terceira mutação, conforme a equação 5:

$$\Delta\Delta G^{o}_{i\leftrightarrow j} = \Delta\Delta G^{o}_{il\rightarrow kl} - \Delta\Delta G^{o}_{ij\rightarrow kj} = \Delta\Delta G^{o}_{kj\rightarrow kl} - \Delta\Delta G^{o}_{ij\rightarrow il} \qquad \text{(eq. 5)}$$

onde *i* e *j* são os aminoácidos na proteína tipo selvagem, e *k* e *l* são as mutações.

3.3.4 Propagação de erros

Todos os erros foram propagados de acordo com a equação 6:

$$s^2_{\overline{w}} = \left(\frac{\partial w}{\partial x}\right)^2_{\overline{w}} s^2_{\overline{x}} + \left(\frac{\partial w}{\partial y}\right)^2_{\overline{w}} s^2_{\overline{y}} \qquad \text{(eq. 6)}$$

onde *s* é o desvio padrão, *w* é a função final, e *x* e *y* são as funções iniciais (Helene e Vanin, 1981; Taylor, 1990).

3.4 Visualização do sítio da RLC

Um modelo para a visualização do sítio da RLC foi feito a partir da estrutura da cadeia leve regulatória de miosina de vieira, determinada por difração de raios X, e refinada até a

resolução de 2,0 Å (Houdusse e Cohen, 1996). As coordenadas da estrutura foram obtidas no banco de dados PDB (Protein Data Bank), sob o número 1wdc.

A estrutura utilizada para o modelo (Houdusse e Cohen, 1996) corresponde ao domínio regulatório da miosina de vieira, ou seja, a cadeia leve regulatória de miosina de vieira foi cristalizada ligada à cadeia pesada e à cadeia leve essencial da miosina.

Foi utilizado o programa Insight II (Molecular Simulations Inc.), com o módulo Biopolymer, instalado em uma estação de trabalho Silicon Graphics Indigo^2, e os aminoácidos presentes na estrutura original foram substituídos pelos aminoácidos presentes na RLC tipo selvagem ou nos mutantes.

As águas de cristalização presentes na estrutura da cadeia leve regulatória de vieira não foram utilizadas no modelo, com exceção da molécula de água que participa da coordenação do íon.

Cálculos de minimização da estrutura foram abandonados porque os campos de força disponíveis não representam corretamente um íon ligado a uma proteína (Allouche e col., 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos mutantes de RLC

Os mutantes foram seqüenciados por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeo. A figura 6 mostra o gel de seqüenciamento contendo a região das mutações. O seqüenciamento completo do cDNA mostrou que não houve nenhuma alteração na região codificadora além das mutações esperadas.

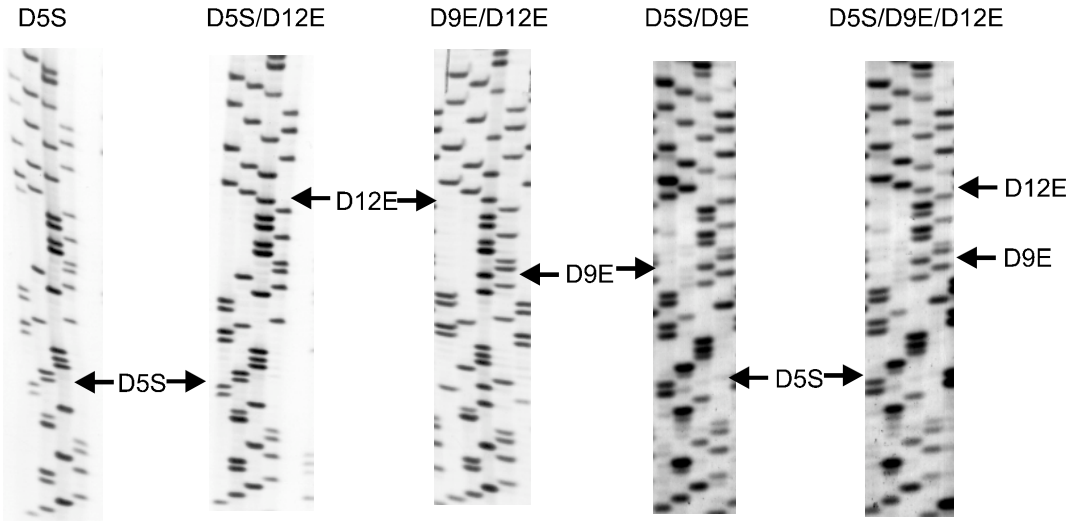


Figura 6: Auto-radiografia de géis de seqüenciamento de DNA fita simples dos clones mutantes de RLC, mostrando a região das mutações. Ordem das bases em cada clone: TCGA.

4.2 Expressão de RLC

As proteínas apresentaram alto índice de expressão no vetor pT7Smo, em *E. coli* BL21 (DE3) a 34º C. A figura 7 mostra um gel (SDS-PAGE) do extrato total da cultura de *E. coli*, imediatamente antes da indução e ao final do período de indução.

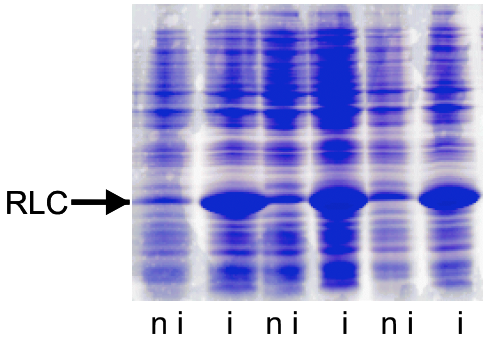


Figura 7: Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (15%) do extrato bacteriano total, mostrando um exemplo de expressão de RLC utilizando o vetor pT7Smo em *E. coli* BL21 (DE3). i – amostras induzidas; ni – amostras não induzidas.

4.3 Purificação das proteínas

As cadeias leves foram purificadas como descrito no item 3.2.4. A figura 8 mostra um gel (SDS-PAGE) dos diversos passos da purificação de RLC: após precipitação com ácido tricloroacético; sobrenadante e precipitado da ultracentrifugação; após cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose Fast Flow); e ao final da purificação, após cromatografia com uma resina hidrofóbica (Phenyl-Sepharose CL 4B). Todos os mutantes comportam-se de forma semelhante à proteína tipo selvagem durante a purificação. Mais da metade da RLC expressa pelas bactérias fica na fração precipitada na primeira ultracentrifugação, que é mais pura que o sobrenadante.

O rendimento final de RLC purificada obtido para preparações de cada mutante foi de cerca de 190 mg/L de cultura. Os extremos obtidos foram 41,5 mg de proteína/L de cultura, para uma preparação de D5S/D12E, e mais de 250 mg de proteína/L de cultura, para D5S/D9E/D12E.

Após a purificação, as proteínas são tratadas para a retirada de cátions divalentes, conforme descrito no item 3.3.1. A figura 9 mostra as proteínas purificadas, prontas para a utilização nos ensaios de diálise em fluxo.

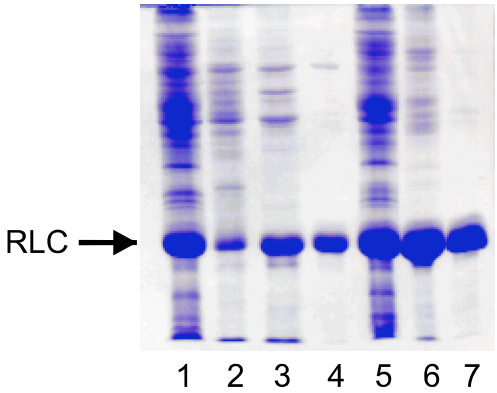


Figura 8: SDS-PAGE da purificação de RLC, mostrando as várias etapas: 1) após precipitação com ácido tricloroacético; 2) sobrenadante (fração solúvel) após restaurar o pH, a ser aplicado em coluna de DEAE-Sepharose; 3) sobrenadante após DEAE-Sepharose; 4) RLC purificada do sobrenadante; 5) precipitado após restaurar o pH (fração solúvel somente em uréia); 6) precipitado após DEAE-Sepharose; 7) RLC purificada do precipitado. Embora a coluna 2 pareça mais pura que a 5, é preciso observar que a quantidade total de proteína é menor em 2.

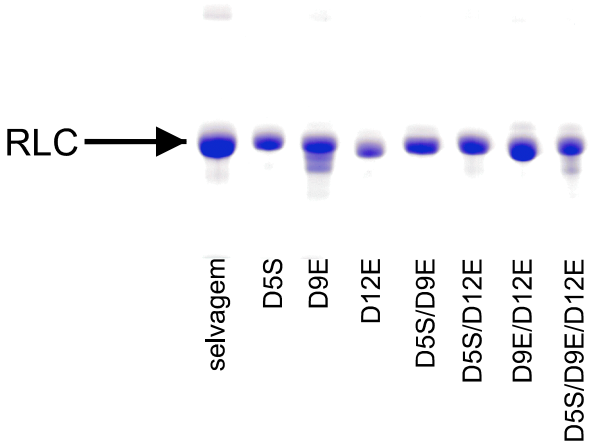


Figura 9: SDS-PAGE das RLCs purificadas e dialisadas para utilização em ensaios de diálise em fluxo.

4.4 Medidas de ligação de cálcio

As constantes de dissociação de cálcio e magnésio foram determinadas através de ensaios de diálise em fluxo. A figura 10 é um exemplo dos dados obtidos com este tipo de experimento, antes de qualquer tratamento matemático. Antes de cada nova adição de ligante

não-marcado ou de competidor, o número de contagens atinge um valor de equilíbrio, e três pontos nesta região são utilizados para o cálculo das constantes de dissociação.

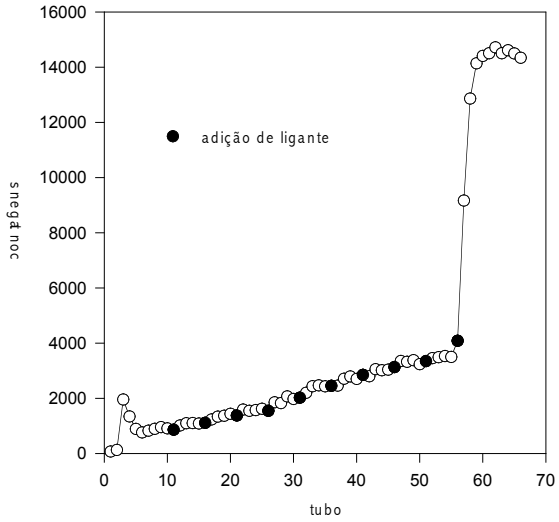


Figura 10: Dados de um ensaio de diálise em fluxo. No eixo da abscissa está o número da fração coletada, e no eixo das ordenadas, o número de contagens por minuto obtidas com o cintilador. Os círculos cheios correspondem a frações onde foram feitas adições de ligante não marcado.

Para quantificar as ligações inespecíficas, foi realizado um ensaio na ausência de proteína. O ensaio foi comparado a um resultado típico de RLC tipo selvagem, como visto na figura 11. A ligação inespecífica é inferior a 3% do total.

Para verificar se não houve perdas significativas de cálcio marcado na câmara superior de diálise, foram coletadas 4 amostras de 5 μL da solução da câmara superior, sendo duas no início e duas no final de um ensaio. Os resultados estão na tabela 2, e os valores obtidos para o início e o final do ensaio são iguais, dentro do erro. Assim, não houve perdas significativas de $^{45}Ca^{2+}$, e sua concentração na câmara superior pode ser considerada constante durante todo o ensaio. Para este controle foi utilizado um dos mutantes de menor afinidade, que por possuir maior

fração de cálcio livre durante o ensaio, e conseqüentemente maior taxa de difusão, era mais sujeito a perdas que os mutantes de maior afinidade.

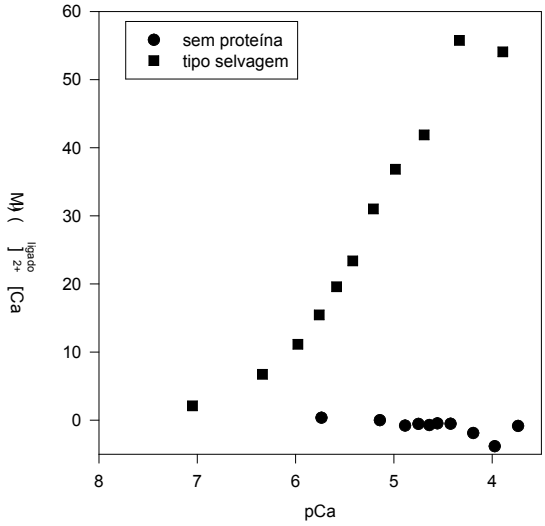


Figura 11: Ensaio de ligação de Ca^{2+}. Os ensaios foram feitos como descrito em Materiais e Métodos. Os pontos abaixo de zero devem-se a uma maior perda de $^{45}Ca^{2+}$, que se difunde da câmara superior para a inferior a uma taxa muito maior que na presença de proteína.

A tabela 3 traz os valores médios e os desvios padrão das constantes de dissociação de cálcio e magnésio para cada mutante e para o tipo selvagem, além do número de experimentos utilizados para calcular as constantes de cada proteína.

	Contagens
Início	15 525 ± 117
Final	15 614 ±141

Tabela 2: Contagens por minuto presentes em amostras de 5 μL da solução da câmara superior do aparato de diálise em fluxo, no início e no final de um ensaio.

Os sítios nos mutantes de baixa afinidade (D5S, D9E e D5S/D9E) não saturam durante os ensaios. As constantes foram calculadas a partir das curvas parciais de ligação obtidas,

usando a equação 2. Uma vez que n_1' tende a ser superestimado quando o sítio não satura durante o ensaio, o valor máximo aceito para n_1' no ajuste de curvas foi 1. Embora essa não-saturação possa levar a constantes menos precisas, não foram adicionados pontos a concentrações maiores de cálcio, porque em altas concentrações o ensaio perde a sua confiabilidade devido à ligação inespecífica de cálcio a superfícies carregadas.

As curvas médias foram traçadas a partir da média das constantes dos ensaios, e estão representadas na figura 12. Os pontos são as médias de no mínimo três ensaios feitos independentemente e as barras representam os desvios padrão das médias.

As mutações D5S e D9E reduzem a afinidade do sítio por cálcio, mas D5S produz efeitos mais acentuados, possivelmente porque implica na perda de uma carga negativa. O duplo mutante D5S/D9E tem a menor afinidade de todos, com o efeito destas duas mutações se acumulando.

A mutação D12E causa aumento na afinidade por cálcio, e possui a maior afinidade encontrada. Todos os mutantes contendo a mutação D12E possuem afinidades maiores que as da proteína selvagem. No duplo mutante D5S/D12E, a mutação D12E é capaz de reverter o efeito de D5S, e este mutante possui praticamente a mesma afinidade por cálcio que a proteína tipo selvagem.

O duplo mutante D9E/D12E liga cálcio com maior afinidade que RLC tipo selvagem, mas menor que D12E. A mutação D9E diminui a afinidade da proteína tipo selvagem e do mutante D12E, mas seu efeito parece ser menor sobre D12E que sobre o tipo selvagem.

O triplo mutante possui afinidade por cálcio intermediária entre a da proteína tipo selvagem e a do duplo mutante D9E/D12E. A dupla mutação D5S/D9E, realizada sobre o mutante D12E de forma a gerar o triplo mutante, tem efeito menor que sobre a RLC tipo selvagem. Estes resultados combinados sugerem que D12E tenha um efeito estabilizador sobre o sítio.

É interessante observar também que a mutação D9E, realizada sobre RLC tipo selvagem, reduz a afinidade por cálcio, mas quando acrescentada ao duplo mutante D5S/D12E gera um triplo mutante de maior afinidade. No triplo mutante, a afinidade é maior do que seria de se esperar pelo efeito de cada uma das três mutações em separado.