

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JOSÉ LUIS DA ROCHA SANTOS

QUANTIFICAÇÃO DO CLÁSSICO PROCESSO DE DISSOCIAÇÃO DO VÍRUS DO  
MOSAICO DO TABACO (TMV) UTILIZANDO ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA.

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia para obtenção do Título  
de Mestre em Biologia Funcional e  
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
**BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Campinas, 09 de Março de 2004.

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé \_\_\_\_\_  
(Orientador)

Prof Dr. Jerson Lima Silva \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Ione Salgado \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrío Volpe \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pela grande oportunidade de ter desenvolvido este trabalho, pelo modo sério, competente, brilhante e principalmente paciente que me ajudaram a conduzir este estudo, pelas agradáveis aulas e discussões de termodinâmica e bioquímica, pelo respeito, carinho e mais que tudo, pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Francisco Pessine, pela ajuda com o fluorímetro e pelas interpretações dos gráficos de fluorescências.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, por ter cedido seu laboratório várias vezes para a realização dos experimentos com cromatografia, e, em especial à suas alunas, Márcia Tomy e Silvia Simi, que por várias vezes ajudaram a montar os experimentos.

À Prof. Dra. Ione Salgado, pelo apoio e incentivo no ingresso deste curso.

Ao José Ailton C. Bispo, por ajudar a enriquecer este trabalho.

Ao Engenheiro Carlos Sandrine e ao Valdiney Pimenta, que automatizaram o sistema do gerador de pressão e o fluorímetro, e pela constante atenção em resolver os problemas que surgiam no software do equipamento.

Aos amigos do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Leonardo e Gustavo, pela grande amizade ao longo desses dois anos, à técnica do nosso laboratório Juliana Mattoso por sua grande ajuda na realização dos experimentos; as amigas Luzia, Elzira e Juscelei e, principalmente, à Andréia e Marina, por todo apoio e atenção

Especialmente a meus pais, Joaquim e Maria Aparecida, a meu irmão Eron e sua noiva Silvia, à minha noiva Gisele Amadeu e seus pais Reinaldo e Lurdes, e a meu tio José de Carvalho e família, aos quais dedico este trabalho, pelo apoio, amizade, conselhos, sacrifício e compreensão.

A todos os meus tios, tias, primos e amigos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Ao CNPq, FAPESP e a FAEP-UNICAMP pelo suporte financeiro.

E acima de tudo a Deus.

*A força não provém da capacidade física e sim de uma vontade indomável.*

Mahatma Gandhi

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e, em especial, a minha noiva Gisele.*

## ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
Uso de alta pressão hidrostática em sistemas biológicos .....	01
TMV: Características gerais .....	03
Estrutura do TMV .....	05
Dissociação do TMV dentro da célula hospedeira .....	07
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
Reagentes .....	11
Purificação do TMV .....	11
Equipamento de alta pressão hidrostática .....	12
Medidas de fluorescência e espalhamento de luz sob pressão .....	15
Medidas de tempo de vida sob pressão .....	15
Microscopia eletrônica .....	16
Gel filtração em Cromatografia Líquida de Alta Performance .....	17
<b>CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS</b> .....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	21
Efeito do pH sobre o estado de agregação do TMV em pressão atmosférica .....	21
Efeito da pressão sobre o TMV em diferentes valores de pH .....	24
<b>DISCUSSÃO</b> .....	36

<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho do TMV e dos grupos carboxílicos existentes entre suas subunidades.

Figura 2 – Representação dos tipos de arranjos da proteína capsídica do TMV.

Figura 3 – Foto do gerador de pressão, do fluorímetro, das cubetas e da câmara de alta pressão.

Figura 4 – Efeito do pH sobre a intensidade de espalhamento de luz no TMV em pressão atmosférica e inclusão: gráfico de dissociação.

Figura 5 – Microscopia eletrônica do TMV em diferentes valores de pH, em pressão atmosférica.

Figura 6 – Efeito da pressão sobre o TMV em diferentes valores de pH.

Figura 7 – Cromatografia de alta performance em gel filtração do TMV em diferentes valores de pH, à pressão atmosférica e após pressão de 220 MPa.

Figura 8 – Microscopia eletrônica do TMV, fixado sob pressão e após retorno à pressão atmosférica.

Figura 9 – Gráfico de dissociação do TMV, e gráfico de  $\ln K_p^{pH}$ .

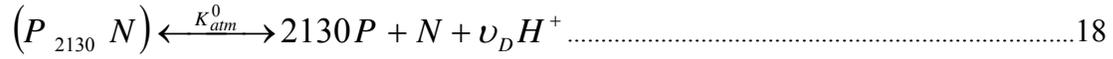
Figura 10 – Efeito do pH sobre a energia livre de Gibbs na dissociação do TMV, e gráfico da variação de volume de dissociação em função do pH.

Figura 11 – Espectro de emissão de fluorescência do TMV em diferentes condições de pH e pressão.

Figura 12 – Efeito do pH sobre o tempo de vida de triptofano do TMV

## LISTA DE FÓRMULAS

$$\alpha_p = (S_i - S_p) / (S_i - S_f) \dots\dots\dots 15$$



$$K_{atm}^0 = \frac{[P]^{2130} [N] [H^+]^{\nu_D}}{[P_{2130} N]} \dots\dots\dots 19$$

$$K_{atm}^{pH} = \frac{K_{atm}^0}{[H^+]^{\nu_D}} = \frac{[P]_{pH}^{2130} [N]_{pH}}{[P_{2130} N]_{pH}} \dots\dots\dots 19$$

$$\Delta G_{atm}^{pH} = \Delta G_{atm}^0 + \nu_D RT \ln[H^+] = \Delta G_{atm}^0 - 2.303 \nu_D RT pH \dots\dots\dots 19$$

$$\Delta G_p^{pH} = \Delta G_{atm}^{pH} + p \Delta V \dots\dots\dots 19$$

$$K_p^{pH} = K_{atm}^{pH} \exp\left(\frac{-p \Delta V^0}{RT}\right) = \frac{[P]_{pH,p}^{2130} [N]_{pH,p}}{[P_{2130} N]_{pH,p}} \dots\dots\dots 20$$

$$K_p^{pH} = K_{atm}^{pH} \exp\left(\frac{-p \Delta V}{RT}\right) = \frac{2130^{2130} C^{2130} \alpha^{2131}}{(1 - \alpha)} \dots\dots\dots 20$$

$$\ln K_p^{pH} = \ln K_{atm}^{pH} - \frac{p \Delta V}{RT} \dots\dots\dots 20$$

$$\ln k_p^{pH} = 2130 \ln 2130 + 2130 \ln C + 2131 \ln \alpha - \ln(1 - \alpha) \dots\dots\dots 20$$

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>BMV</b>	Brome mosaic virus
<b>C</b>	Concentração
<b>CMV</b>	Cowpea mosaic virus
<b>Da</b>	Dalton
<b>FMDV</b>	Vírus da febre aftosa
<b>M</b>	Molar
<b>MPa</b>	Mega Pascal
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>TMV</b>	Vírus do mosaico do tabaco
<b>VSV</b>	Vírus da estomatite vesicular
<b>μL</b>	Microlitro
<b>P<sub>2130</sub>N</b>	TMV
<b>2130<sub>2130</sub>P</b>	TMV dissociado
<b>S<sub>p</sub></b>	Intensidade de espalhamento de luz sob pressão
<b>S<sub>f</sub></b>	Intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada
<b>S<sub>i</sub></b>	Intensidade de espalhamento de luz da forma associada
<b>α</b>	Grau de dissociação
<b>ν<sub>D</sub></b>	Número de prótons
<b>K<sub>atm</sub><sup>0</sup></b>	Constante de equilíbrio de dissociação em pressão atmosférica e pH = 0
<b>K<sub>atm</sub><sup>pH</sup></b>	Constante de equilíbrio de dissociação em um dado pH e pressão atmosférica
<b>K<sub>p</sub><sup>pH</sup></b>	Constante de equilíbrio de dissociação em pH e pressão <i>p</i> específicos

$\Delta G_{atm}^{pH}$	Varição de energia livre de Gibbs de dissociação
$R$	Constante universal dos gases
$\Delta G_{atm}^0$	Varição de energia de dissociação em pH=0
$\Delta V$	Varição de volume de dissociação
$\Delta G_p^{pH}$	Varição de energia livre de Gibbs de em um dado pH e pressão $p$ específicos

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - grau de dissociação ( $\alpha$ ) do TMV em diversos valores de pH e pressão atmosférica.....	21
Tabela 2 – grau de dissociação ( $\alpha$ ) do TMV em diversos valores de pH e pressão.....	31
Tabela 3 – valores do tempo de vida de triptofano do TMV em diversas condições de pH e pressão.....	31

## RESUMO

O vírus do mosaico do tabaco (TMV) é um modelo de vírus muito estudado. A dissociação de vírus pode ser induzida através de alta pressão hidrostática sem ocorrência de desnaturação protéica. Este trabalho mostra a dissociação do TMV induzida por pressão até 220 MPa, em diferentes condições de pH. A suspensão viral (0,25 mg/mL), incubada a 4 °C, apresentou uma significativa diminuição da intensidade de espalhamento de luz com o aumento do pH, sugerindo dissociação. Essas observações foram confirmadas através de HPLC em gel filtração e microscopia eletrônica. Uma análise dos ciclos de compressão/descompressão indicou uma estabilização dos produtos de dissociação com progressiva redução na energia livre de Gibbs de dissociação com o aumento do pH. A variação de volume ( $\Delta V$ ) de dissociação calculada foi de  $-49,7$  mL/mol de subunidade de TMV em pH 4,2 para  $-21,7$  mL/mol de subunidade de TMV em pH 9,0. A diminuição de pH 9,0 para 4,2 representou uma energia de estabilização de  $14,1$  KJ/ mol de subunidade de TMV. A liberação de prótons calculada a partir das curvas de dissociação induzida por pressão foi de  $0,634$  mol de  $H^+$ /mol de subunidade de TMV. Os resultados sugerem que o grau de inativação do vírus por pressão e a imunogenicidade das estruturas inativadas podem ser otimizadas pela modulação do pH circundante.

## ABSTRACT

Tobacco mosaic virus (TMV) is an intensely studied model of viruses. The dissociation of viral protein aggregates can be induced by high hydrostatic pressure, with no detectable denaturation. This paper reports an investigation into the dissociation of TMV by pH and pressure up to 220 MPa. The viral solution (0.25 mg/mL) incubated at 277 K showed a significant decrease in light scattering with increasing pH, suggesting dissociation. This observation was confirmed by HPLC gel filtration and electron microscopy. An analysis of cycles of compression/decompression indicated a stabilization of the dissociation products, with a progressive reduction in the Gibbs free energy of dissociation as the pH increased. The calculated volume change of dissociation ( $\Delta V$ ) decreased from -49.7 ml/mol of subunit at pH 4.2 to -21.7 ml/mol of subunit at pH 9.0. The decrease from pH 9.0 to 4.2 caused a stabilization energy of 14.1 kJ/mol of TMV subunit. The estimated proton release calculated from pressure-induced dissociation curves was 0.634 mol H<sup>+</sup>/mol of TMV subunit. The results suggest that the degree of virus inactivation by pressure and the immunogenicity of the inactivated structures can be optimized by modulating of the surrounding pH.

## INTRODUÇÃO

### Uso de alta pressão hidrostática em agregados protéicos

A termodinâmica de interação proteína-proteína é de fundamental importância na compreensão de sistemas biológicos. Nos últimos anos, progressos nessa área têm sido realizados através da utilização de alta pressão hidrostática, ferramenta que promove dissociação de proteínas sem significantes efeitos na estrutura terciária das mesmas (Silva & Weber, 1993). Agentes que promovem dissociação têm sido empregados, como variação de temperatura e pH, ou a adição de agentes desnaturantes, como por exemplo uréia. Nesses casos a estrutura terciária é em maior ou menor grau afetada. A utilização de alta pressão hidrostática combinada com esses agentes pode levar a informações bastante interessantes sobre a termodinâmica da dissociação e desnaturação de proteínas (Silva & Weber, 1988, Bonafe *et al.*, 1991, Da Poian *et al.*, 1993, Bonafe *et al.*, 1994, 1998). A dissociação ocorre devido à contração de volume nesse processo. As subunidades expõem a interface proteína-proteína ao solvente, e esta nova interação promove organização do solvente, que tende a ocupar menor espaço (Weber & Drickamer, 1983). Fatores que devem contribuir para a contração de volume correspondem à liberação de espaços não preenchidos na interface devido às “imperfeições” no contato entre as subunidades, e à interação do solvente com resíduos polares e apolares expostos na dissociação (Silva *et al.*, 2001).

O processo de dissociação e os produtos de dissociação por pressão podem ser acompanhados através de técnicas espectroscópicas, gel filtração em HPLC e microscopia eletrônica. Investigações da dissociação de diversos agregados protéicos por pressão

levaram à elaboração de uma nova teoria sobre a associação das subunidades, denominada "deriva conformacional". Essa propriedade consiste na diminuição da afinidade entre as subunidades de uma proteína quando estas estão separadas, seja por pressão, por diluição ou baixa temperatura, ocorrendo assim um aumento do grau de dissociação, observados através de histerese da curva de dissociação por pressão (Xu & Weber, 1982, Weber, 1986, Silva *et al.*, 1986). Outro fenômeno observado é a heterogeneidade quanto à energia livre de associação em proteínas com muitas subunidades, ao contrário do observado em proteínas diméricas. Essa propriedade explica a falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão (Silva & Weber, 1988, Ruan & Weber, 1989, Silva *et al.*, 1989).

Silva & Weber (1988) observaram que ocorre dissociação reversível do BMV ("brome mosaic vírus" ) após incubação em pressão de até 140 MPa, na qual ocorre dissociação de 75%. Acima dessa pressão a reorganização diminuiu, havendo formação de agregados amorfos compostos por proteínas capsídicas no retorno à pressão atmosférica, comportamento que pode ser atribuído à "deriva conformacional".

Os primeiros estudos de efeito de pressão em vírus foram realizados no vírus do mosaico do tabaco (TMV) por Lauffer & Dow (1941), que observaram inativação por pressão em poucos minutos à 750 MPa. Nos últimos anos vários vírus foram investigados em relação à inativação por pressão, como os da família *Picornaviridae*, dentre eles o FMDV (vírus da febre aftosa), poliovírus e o rinovírus. Partículas de FMDV são drasticamente afetadas sob pressão de 240 MPa à temperatura ambiente, ocasionando perda da infectividade. Poliovírus e rinovírus sofrem dissociação e inativação nesse nível de pressão apenas em combinação com baixa temperatura e uréia. (Oliveira *et al.*, 1999).

Em vários trabalhos têm sido empregada alta pressão hidrostática isoladamente ou em conjunto com outras condições bioquímicas, químicas ou físicas, como metodologia para a produção de vacinas. Estudos mostraram que anticorpos contra partículas virais inativadas por pressão são tão efetivos quanto aqueles contra as partículas virais intactas, evidenciando que a nova conformação dessas partículas não apresentam perda de imunogenicidade (Silva *et al.*, 1992, Jurkiewics *et al.*, 1995, Oliveira *et al.*, 1999, Bonafe *et al.*, 2000).

### **TMV: Características gerais**

O vírus do mosaico do tabaco (TMV) é um vírus clássico bastante utilizado como modelo de associação viral (Klug 1999). A associação-dissociação da sua proteína capsídica tem sido muito estudada, assim como o efeito dos íons  $H^+$  no processo de associação, sendo evidenciado que o pH alcalino facilita muito a dissociação protéica. (Shalaby & Laufer, 1977, Shuster *et al.*, 1980, Shalaby *et al.*, 1982). O efeito do pH no vírus íntegro também tem sido muito investigado, e os resultados demonstram dissociação das subunidades na direção do terminal 5' para 3' do RNA, assim como a presença de alguns intermediários de dissociação (Schramm *et al.*, 1955, Harrington & Schachman, 1956, Perhan 1969, Perham & Wilson, 1976, Ohno & Okada, 1977, Powell 1975, Perham & Wilson, 1978). Estudos da dissociação alcalina do TMV em pH 9,5 a 10,5 e separação em gel agarose mostraram a predominância de algumas formas distintas de partículas virais parcialmente dissociadas correspondentes a aproximadamente 93, 68, 61, 39, 31, 24 e 16% do comprimento do vírus nativo, que é de 300 nm (Hogue & Asselin, 1984). Outras metodologias e investigações demonstraram intermediários semelhantes com pequenas

variações em número de formas e em tamanho. (Perhan & Wilson, 1978, Pelcher & Halasa, 1979, Hogue & Asselin, 1984).

Experimentos realizados por Blowers & Wilson (1982) usando uréia para promover dissociação do TMV mostraram dissociação do capsídeo predominantemente na direção do terminal 5' para 3' da molécula de RNA, semelhante às observações para a dissociação alcalina. Em outros vírus, como o (CMV) vírus do mosaico do “cowpea”, investigações utilizando alta pressão hidrostática em combinação com uréia mostraram que a molécula de RNA estabiliza a partícula do vírus, e aumenta a reversibilidade de desnaturação induzida por pressão (Da Poian *et al.*, 1994).

Estudos de estabilidade em outros vírus indicam que a associação é facilitada por interações específicas entre as subunidades da proteína e seqüências internas no RNA (Mesh *et al.*, 1983, Mougél *et al.*, 1987, Da Poian *et al.*, 1995, Gaspar *et al.*, 1997). No TMV essa seqüência no RNA é conhecida como “origem de associação” ou “Oa” que permite a nucleação para posterior alongação (Zimmern & Butler, 1977). Modificações na conformação do RNA, ocorrência de mutações e mudanças nas condições externas podem afetar o início do “empacotamento”, bem como a velocidade de agregação, através de mudanças nas interações proteína-RNA predominantemente na origem de associação.

Recentemente nosso grupo descreveu alguns aspectos termodinâmicos da dissociação e desnaturação do TMV utilizando alta pressão hidrostática em combinação com baixa temperatura na presença e ausência de uréia (Bonafe *et al.*, 1998). Nessa investigação, a dissociação do TMV foi monitorada pela diminuição da intensidade de espalhamento de luz na suspensão de vírus. A ocorrência de estruturas desnaturadas foi determinada pelo desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência. Esses resultados não indicaram desnaturação quando a dissociação foi realizada por pressão em

baixa temperatura e na ausência de uréia. Em temperatura de 20 °C ocorreu reduzida dissociação mesmo em pressão de 250 MPa. Em concentrações subdesnaturantes de uréia (2,5M) em pressão atmosférica foi observada significativa dissociação. Apenas em altas concentrações de uréia, ou em concentrações subdesnaturantes de uréia em combinação com alta pressão, ocorreu desnaturação apreciável.

No presente trabalho estendemos as investigações com o TMV submetido em diferentes condições de pH e alta pressão hidrostática. A possível ocorrência de desnaturação sob estas condições foi analisada através de espectros de emissão de fluorescências. A metodologia usada para caracterizar o processo de dissociação foi realizada através do espalhamento de luz, o qual forneceu uma análise quantitativa do efeito de prótons na dissociação do TMV, e permitiu uma estimativa da energia e da variação de volume de dissociação em cada pH.

### **Estrutura do TMV**

O TMV é um fitopatógeno bastante estudado que produz manchas e descolorações nas folhas do tabaco, conforme seu nome sugere. Esse vírus, cuja massa molecular é de 40.000 kDa, é um excelente modelo para estudo de montagem viral por seu fácil isolamento e manipulação. O TMV é constituído de um cilindro de cerca de 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro, que consiste de 2130 cópias de proteínas capsídica (17,5 kDa, 158 resíduos de aminoácidos), formando uma hélice de 16 e 1/3 de subunidades por volta, com um canal interno (Goelet *et al.*, 1982). O material genético deste vírus é uma fita simples positiva de RNA, com 6.400 nucleotídeos (2.000 kDa), enovelado internamente ao capsídeo protéico formando uma hélice na qual cada subunidade protéica se liga a 3

nucleotídeos (Hirth & Richards, 1981). A Figura 1A, mostra o desenho do TMV e suas partes constituintes.

Dependendo das condições de força iônica e pH, a proteína capsídica, facilmente isolável, se polimeriza de diferentes modos. Por exemplo, em pH 8,0 e alta força iônica, ocorre formação de partículas com coeficiente de sedimentação 27S, 37S ou mais. Em pH 7,0 e baixa força iônica, ocorre a formação de discos duplos de 20S, mas que não se agregam. Em pH acima de 7,0 e baixa força iônica, a proteína se encontra com polimerização bastante limitada, observando-se monômeros, talvez dímeros, trímeros e, em menor percentagem, associação em agregados maiores. Em pH abaixo de 7,0 e baixa força iônica, a proteína capsídica se associa formando longas hélices, semelhante à estrutura protéica do capsídeo do vírus nativo. Em pH 7,0 e média força iônica são observadas apenas proto-hélices, com  $39 \pm 2$  subunidades por volta, similares às estruturas das longas hélices mencionadas acima. Em pH neutro e baixa força iônica (condições que se assemelham às fisiológicas), a proteína capsídica forma hélices somente na presença de RNA viral (Klug, 1972, Hirth & Richards, 1981), Figura 2.

A associação do RNA viral com a proteína capsídica, baseado em inúmeros dados experimentais, pode ser descrita em duas etapas: nucleação e rápido alongamento. Em ambas as etapas ocorre a incorporações de agregados de discos 20S no terminal 5' do RNA, enquanto que no terminal 3' ocorre lento alongamento de agregados protéicos menores (Butler, 1999, Klug, 1999).

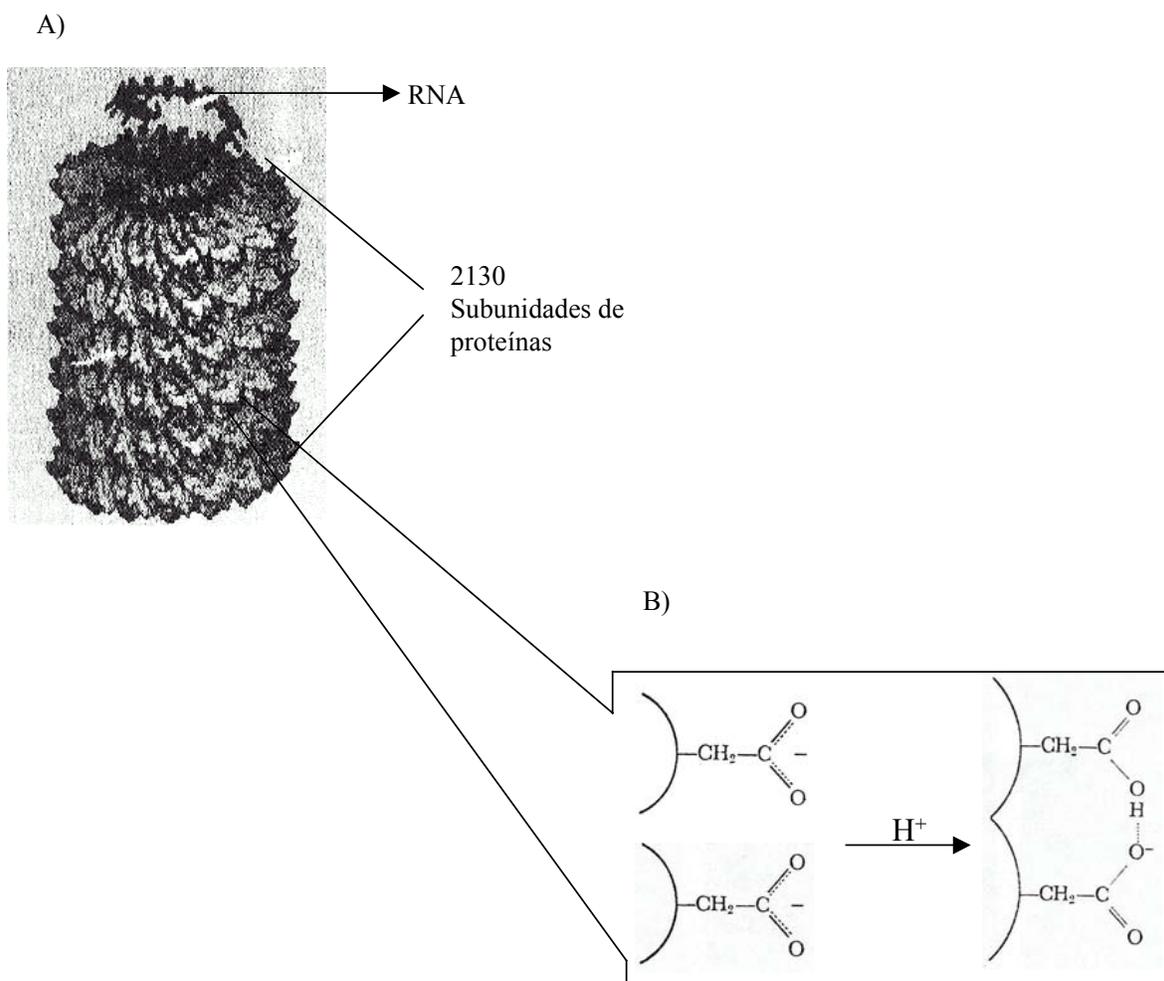


Figura 1. A) Desenho esquematizando o TMV e seus componentes, adaptado de Stubbs, 1999. B) grupos carboxílicos de resíduos de glutamato e/ou aspartato localizados entre as interfaces das subunidades do TMV, na ausência e presença de  $\text{H}^+$ , respectivamente, adaptado de Klug, 1972.

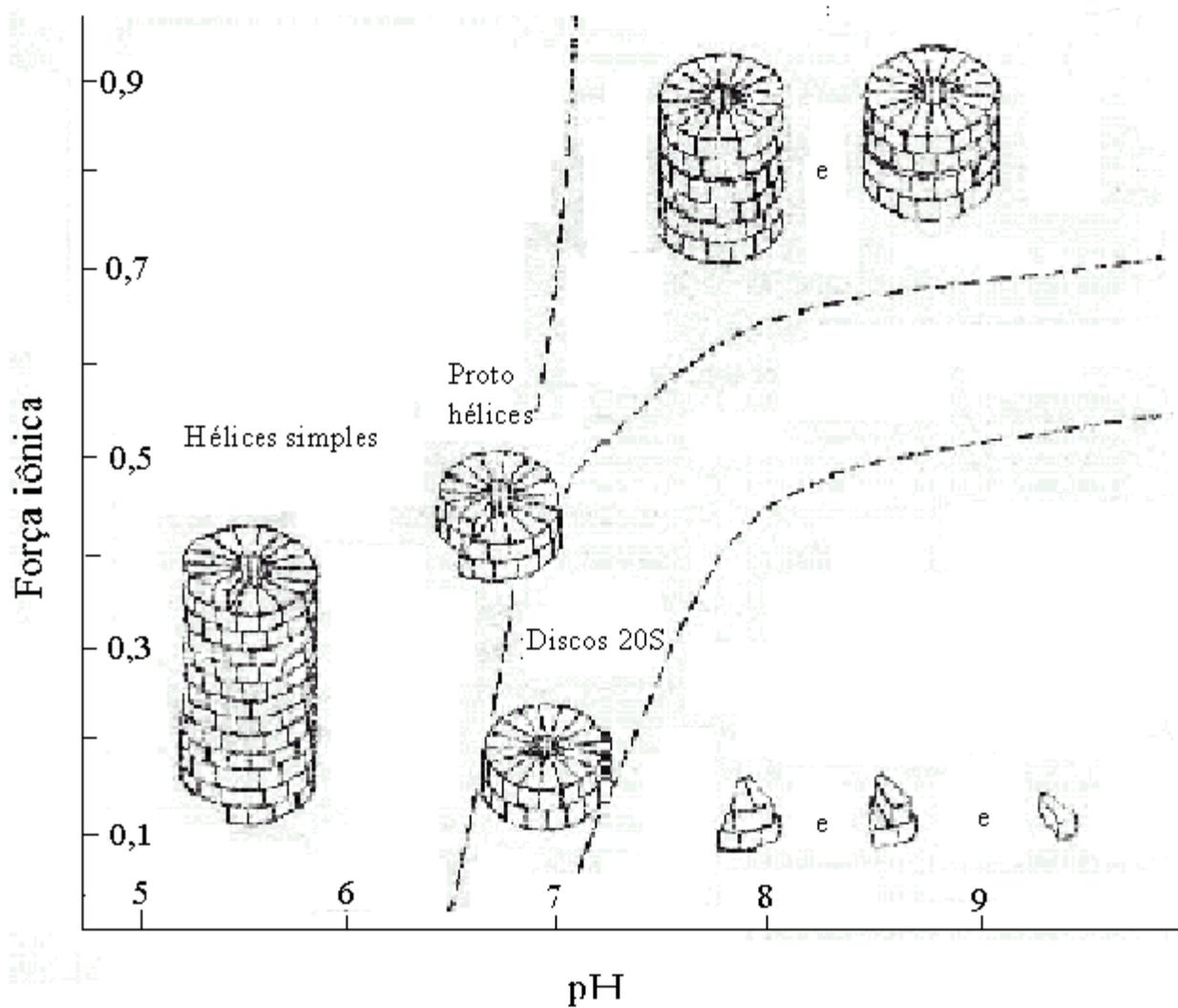


Figura 2. Tipos de arranjos da proteína capsídica do TMV, em diferentes condições de pH e força iônica. Esquema adaptado de Hirth & Richards, 1981.

### **Dissociação do TMV dentro da célula hospedeira.**

O TMV é altamente estável e é capaz de sobreviver por longos períodos no ambiente. No ponto de vista evolutivo isso deve estar relacionado ao fato deste vírus não possuir um vetor específico, e de seu mecanismo de transmissão ser dependente de via mecânica (rompimento da parede celular do hospedeiro). Porém, após entrar na célula o TMV se desestabiliza, se dissociando e liberando seu material genético, para iniciar o processo de replicação viral. Assim, alterações na estabilidade do TMV se devem à capacidade das subunidades responderem às mudanças ambientais. Caspar na década de 60 propôs que grupos carboxílicos de glutamato ou aspartato existentes entre as subunidades, possuem um pK em torno de 7,1 gerando uma interação repulsiva entre as cargas negativas destes grupos. Essa tensão seria reduzida pela presença de prótons ou  $\text{Ca}^{2+}$ , através da neutralização das cargas negativas, aumentando a estabilidade e a afinidade entre subunidades, como é mostrado na Figura 1B. No meio celular, através de mudanças nas concentrações de prótons ou  $\text{Ca}^{2+}$ , o TMV teria excesso de grupos carboxílicos carregados negativamente. A força repulsiva derivada destas interações poderia desestabilizar a estrutura do TMV, provocando sua dissociação e iniciando o processo de replicação viral (Caspar, 1963, Klug, 1972, Culver, 2002).

## **OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é o estudo de parâmetros termodinâmicos da dissociação do TMV em diferentes valores de pH através de alta pressão hidrostática. Entre esses parâmetros estão a energia livre de dissociação, variação de volume e análises quantitativa da participação de prótons no processo de dissociação. Para monitorar a dissociação e processos de desnaturação foram usadas medidas de espalhamento de luz, fluorescência e tempo de vida (de triptofano), assim como microscopia eletrônica e gel filtração em HPLC.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q. Os experimentos foram realizados utilizando-se tampões 50mM de acetato de sódio, pH 4,2 e 5,2, Bis Tris propano, pH 6,0 e 6,5 e Tris HCl pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0. As escolhas dos tampões se deu devido à baixa dependência de seus pKas em função da pressão (Neuman, *et al.*, 1973).

Os experimentos foram realizados a 4°C e em todos foram utilizadas a mesma concentração de vírus: 0,25 mg/mL.

### **Purificação do TMV**

A purificação do TMV foi obtida pela adaptação do método descrito por Asselin & Zaitlin (1978) (“Método PEG – Celite – Triton X-100 – fosfato”). As folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectadas pelo vírus foram homogenizadas com solução de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5M em ascorbato de sódio 0,5% (m/v), na proporção de 1,3 mL/g de tecido fresco. Manteve-se o material à 4 °C, exceto quando mencionada outra condição. A suspensão foi filtrada em filtro de nylon, clarificando-se com celitre, 5g/100mL, e centrifugada a 10.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi filtrado e o vírus precipitado por adição de polietilenoglicol 6.000 e NaCl, em concentrações finais de 3% e 1% em massa, respectivamente. Após 10 min sob agitação e repouso por 20 min em banho de gelo, a

suspensão foi novamente centrifugada a 10.000 x g por 30 min. O precipitado foi ressuspenso em um quarto do volume original com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,01M e Na-ascorbato 0,01% (m/v), e submetido a novo processo de clarificação, precipitação e ressusensão, nas mesmas condições. Após centrifugação da solução a 10.000 x g por 15 min, adicionou-se ao sobrenadante Triton X-100, obtendo-se uma concentração final de 5% (m/v). A solução obtida foi agitada e centrifugada a 90.000 x g por 2h em gradiente descontínuo de sacarose (60% e 20%). A fração de TMV foi coletada na interface entre 60 e 20% de sacarose, e dialisada contra EDTA 1mM, pH 7,2, e depois contra tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,0. A solução foi incubada a 37 °C por 4h após 10 min de centrifugação a 10.000 x g. A solução contendo o vírus foi novamente dialisada e centrifugada nas mesmas condições, estocando-se o TMV a 4°C em presença de azida sódica 0,001 g%.

Determinou-se a concentração viral através da diferença de absorvância entre 260 e 290 nm ( $\epsilon_{0,1, \% 260\text{nm}} - \epsilon_{0,1, \% 290\text{nm}} = 1,31$ ). (Noordan, 1973)

### **Equipamento de alta pressão hidrostática**

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão “HIP” que é conectado à câmara de pressão hidrostática modelo “ISS HP”, Figuras 3A e B, respectivamente. Essa câmara possui três janelas ópticas de safira, através das quais realizam-se medidas espectroscópicas das amostras a pressões de até 250 MPa, limite que essas janelas toleram. No interior da câmara coloca-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta foi selada com

um tubo de polietileno cuja extremidade foi fechada por aquecimento, Figura 3C. Esse tubo colapsado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta é fixada em uma base cilíndrica metálica para evitar o movimento desta no interior da bomba. Utiliza-se etanol absoluto como meio líquido para a transmissão da pressão por possuir índice de refração próximo ao do quartzo, minimizando a perda de sinal nas medidas espectroscópicas. Através de um sistema adaptado a amostra pode permanecer sob baixa temperatura pois esta câmara está conectada a um banho refrigerador. O sistema gerador de pressão é automatizado e controlado por um software denominado “Automa” escrito na linguagem Delphi 5.0 compatível com o Windows. Um computador controla a movimentação de um motor acoplado ao gerador de pressão, coleta os valores de comprimento de onda de emissão e excitação do monocromador do fluorímetro e movimenta os motores para ajuste das janelas para leituras de fluorescência e espalhamento de luz, Figura 3D. O software recebe informações das medidas de pressão através de um sensor analógico-digital, que permite o controle da pressão em tempo real (adaptado de Paladine & Weber, 1981).

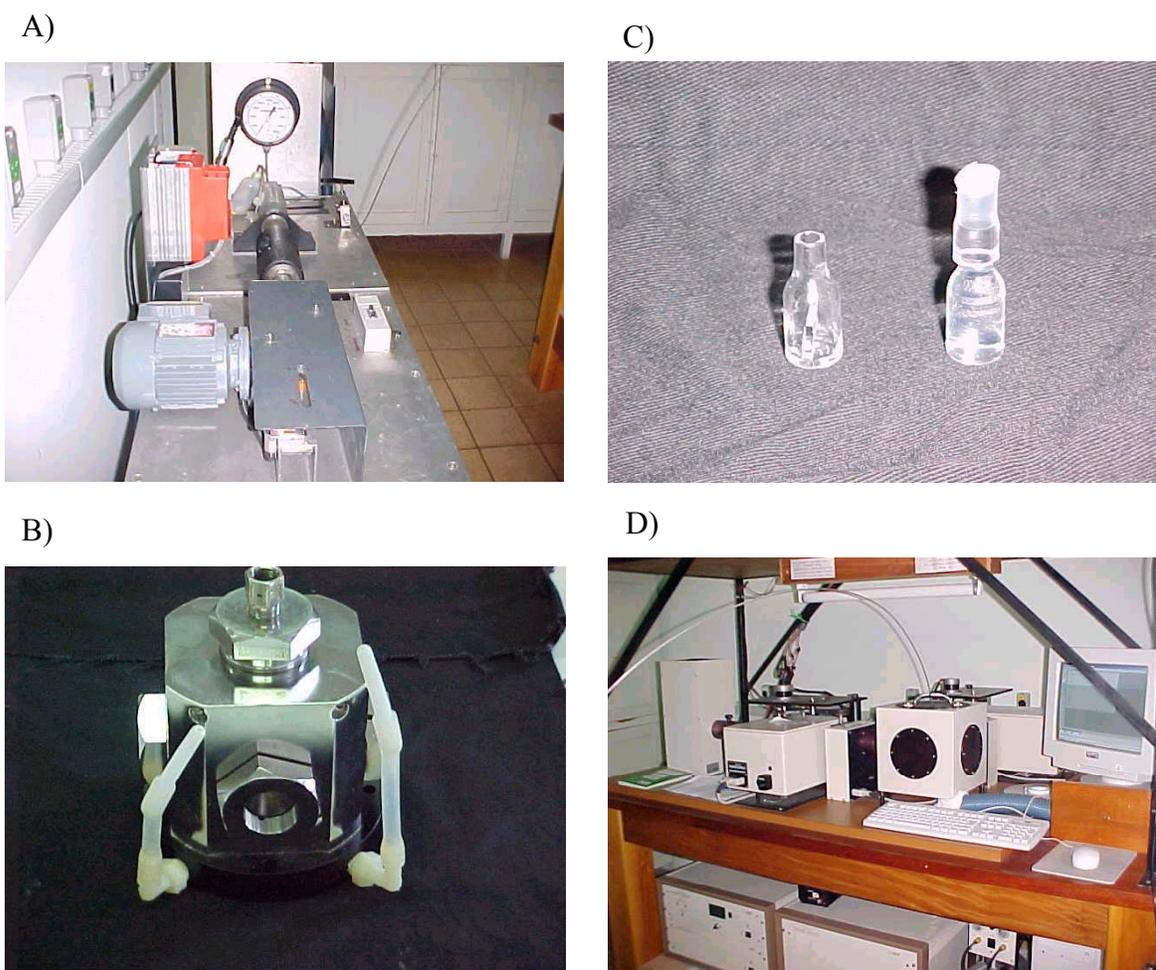


Figura 3. A) Foto do gerador de pressão. B) foto da câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e as mangueiras onde é conectado o sistema refrigerador. C) foto das cubetas de quartzo, uma dividida ao meio utilizada para os experimentos de microscopia sob alta pressão, sem ser selada (lado esquerdo) e a outra selada com tubo plástico de polietileno usada nos demais experimentos (lado direito). D) foto do fluorímetro e do computador, o qual é responsável por executar uma série de funções.

## Medidas de fluorescência e espalhamento de luz sob pressão

Os espectros de fluorescência e medidas de espalhamento de luz foram registrados em um espectrofluorímetro “Edimburg FL 900”, equipado com uma lâmpada fonte de xenônio. A fluorescência intrínseca é devida a resíduos aromáticos de triptofano, predominantemente, e pode ser utilizada para acompanhar o estado de agregação do TMV, a exemplo de proteínas em geral. O processo de dissociação leva à exposição de resíduos de triptofano ao solvente, ocorrendo desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência (Silva & Weber, 1988). Originalmente obtém-se dados de intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda, porém, foi feita a conversão para intensidade de fluorescência em função do número de onda, pois o último é diretamente proporcional à energia associada ao fóton. Para estas medidas foram utilizados comprimento de onda de excitação de 280 nm, os espectros de fluorescências foram obtidos entre 300 a 400 nm.

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas objetivando a monitorização do estado de agregação do TMV sob pressão. O espalhamento de luz Rayleigh é excelente para detectar a dissociação de agregados em partículas. Pode-se assumir que a intensidade de luz espalhada é proporcional à massa molecular média ( $M_a$ ) para soluções diluídas (Silva *et al.*, 1989). Assim, o grau de dissociação  $\alpha_p$ , pode ser relacionado à intensidade de espalhamento de luz à pressão  $p$ ,  $S_p$ , pela seguinte equação:

$$\alpha_p = (S_i - S_p) / (S_i - S_f) \quad (1)$$

onde  $S_f$  e  $S_i$  correspondem a intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada e associada, respectivamente (Silva *et al.*, 1989). O espalhamento de luz foi medido em um

ângulo de 90° relativo à luz incidente, usando comprimento de onda de excitação de 340 nm e comprimento de onda de emissão entre 338 e 343 nm.

### **Medidas de tempo de vida sob pressão**

Os estudos com tempo de vida (de triptofano) foram realizados no referido espectrofluorímetro utilizando-se uma lâmpada “nanoflash” preenchida com gás hidrogênio. Esta lâmpada produz pulsos de luz de nanosegundos a sub-nanosegundos com taxa de repetição acima de 50kHz, o que torna possível contagens de fótons correlacionados com o tempo. Neste tipo de medida a amostra é excitada com um pulso de luz de preferência muito mais curto que o tempo de decaimento da mesma. A intensidade tempo-dependente é então medida seguindo-se o pulso de excitação, sendo então calculado o tempo de decaimento. A intensidade de decaimento experimentalmente obtida é então submetida a um ajuste, utilizando-se normalmente um modelo multiexponencial para obtenção dos respectivos tempos de decaimento, fornecendo desta forma dados qualitativos e quantitativos a respeito das mudanças no ambiente dos fluoróforos no decorrer do processo de dissociação. As amostras foram excitadas em 285 nm, com pulso de frequência de 40 kHz e a emissão foi analisada em 320 nm.

### **Microscopia Eletrônica**

Foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão modelo “LEO 902”. As amostras foram colocadas em grades de cobre revestidas com filme de carbono, nas quais foram colocadas 5µL de suspensão viral (0,25 mg/mL) por grade, nas diferentes

condições experimentais. Após 4 minutos as grades foram tratadas com solução contrastante de acetato de uranila 1% (Raghavendra *et al.*, 1986).

Para as microscopias foram escolhidas as amostras em tampão 50mM de acetato de sódio pH 4,2, em tampão Bis Tris propano pH 6,5 e em tampão Tris HCl para as amostras em pH 8,0 e 9,0.

As amostras foram submetidas à microscopia eletrônica em pressão atmosférica e fixadas em alta pressão ou pós pressão. A fixação sob pressão foi realizada através de uma cubeta de quartzo com dois compartimentos separados na parte inferior (Figura 3C), onde de um lado colocou-se a solução viral e do outro lado uma solução de glutaraldeído 0,5% como fixador. A parte superior da cubeta foi preenchida com dodecano, selando-se com tubo de polietileno, como no caso das cubetas de quartzo, utilizadas nos outros experimentos de pressão. As amostras foram comprimidas até 220 MPa por tempo determinado, e então a câmara de alta pressão foi invertida e agitada vigorosamente por cerca de 10 minutos para mistura da amostra viral com o fixador. Feito isso, as amostras foram descomprimidas e em seguida retiradas da cubeta para serem submetidas à microscopia eletrônica.

### **Gel filtração em Cromatografia Líquida de Alta Performance**

Foram realizadas em um cromatograma modelo “Shimadzu HPLC system”, para avaliar o estado de agregação do TMV nas diferentes condições de pH e pressão. A coluna utilizada foi a GPC 1000 (Synchropack, Inv., Linden, In), com fluxo de 0,3 mL/min, com monitorização da absorvância a 280 nm. Considerou-se o volume de exclusão da coluna ( $V_o$ ) como o volume de eluição do TMV (40.000 kDa), e o volume total ( $V_t$ ) foi

determinado utilizando-se hemoglobina humana (64 kDa). A hemoglobina extracelular de anelídeo *G. paulistus* foi utilizada como forma de calibrar a coluna, pois possui massa molecular de  $3,3 \times 10^6$  Da, peso intermediário entre o TMV e a hemoglobina humana.

## CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

A participação de prótons na dissociação do TMV a suas subunidades e seu material genético (representado por  $N$ ), pode ser expressa da seguinte maneira:



onde,  $P_{2130} N$  e  $2130P + N$ , representam as formas nativa e dissociada do vírus,  $K_{atm}^0$  corresponde à constante de equilíbrio de dissociação do vírus em condições de pressão atmosférica e  $pH = 0$ , e  $\nu_D$ , ao número de prótons absorvidos ou liberados durante o processo de dissociação, conforme o sinal de  $\nu_D$ . Esse equilíbrio certamente tem algumas formas intermediárias, correspondentes possivelmente à “partículas parcialmente dissociadas” (do inglês, PSV, ou “partially stripped virus”), (Hogue & Asselin, 1983). Porém, a presente consideração está relacionada ao equilíbrio envolvendo uma dissociação completa

Essa reação é descrita de forma semelhante à proposta de Bonafe *et al*, 1998, (equação 6), mas aqui foi introduzida a participação de prótons, importante para explicitar a dependência de  $pH$  neste processo. Assim, se a exposição de uma das interfaces subunidade-subunidade ao solvente modifica a interação de resíduos durante a dissociação da proteína, o  $pK$  médio dos aminoácidos afetados deve mudar, gerando desta maneira uma

liberação ( $\nu_D > 0$ ) ou absorção ( $\nu_D < 0$ ) líquida de prótons, ou até mesmo uma aparente independência de prótons ( $\nu_D = 0$ ).

A correspondente relação de equilíbrio para a Eq. 2, corresponde a:

$$K_{atm}^0 = \frac{[P]^{2130}[N][H^+]^{\nu_D}}{[P_{2130}N]} \quad (3)$$

Essa equação pode ser reescrita para mostrar o comportamento esperado para as espécies em outros valores de pH diferente de zero. Assim:

$$K_{atm}^{pH} = \frac{K_{atm}^0}{[H^+]^{\nu_D}} = \frac{[P]_{pH}^{2130}[N]_{pH}}{[P_{2130}N]_{pH}} \quad (4)$$

e

$$\Delta G_{atm}^{pH} = \Delta G_{atm}^0 + \nu_D RT \ln[H^+] = \Delta G_{atm}^0 - 2.303\nu_D RT pH \quad (5)$$

onde  $K_{atm}^{pH}$  é a constante de equilíbrio de dissociação em um dado pH e pressão atmosférica,  $\Delta G_{atm}^{pH}$  é a variação de energia livre de Gibbs de dissociação,  $R$  é constante universal dos gases (8,31 J/mol.K),  $T$  é a temperatura absoluta em Kelvin, e  $\Delta G_{atm}^0$  corresponde à variação de energia de dissociação em pH=0. A forma derivada da Eq. 5 é equivalente à equação 20a de Chu *et al.*, (1984) usada para analisar o efeito de prótons sobre a hemoglobina.

A relação que correlaciona essa constante de dissociação com a pressão pode ser obtida baseada nas mudanças de volume de dissociação,  $\Delta V$  (Ruan & Weber, 1989), que é dado como:

$$\Delta G_p^{pH} = \Delta G_{atm}^{pH} + p\Delta V \quad (6)$$

onde  $\Delta G_p^{pH}$  é a variação de energia livre de Gibbs de dissociação a um dado pH e pressão  $p$  específicos.

A constante de equilíbrio de dissociação derivada da Eq. 6 corresponde a:

$$K_p^{pH} = K_{atm}^{pH} \exp\left(\frac{-p \Delta V^0}{RT}\right) = \frac{[P]_{pH,p}^{2130} [N]_{pH,p}}{[P_{2130}N]_{pH,p}} \quad (7)$$

A presença de pH e  $p$  na constante de equilíbrio de dissociação,  $K_p^{pH}$ , e a concentração de espécies do lado direito da Eq. 7 indica a dependência de pH e pressão. A Eq. 7, reescrita em termos de grau de dissociação  $\alpha$ , (que é razão entre a quantidade de vírus que dissocia em relação a quantidade total de vírus), permite uma correlação direta com os dados experimentais (Bonafe *et al.*, 1998). Assim temos:

$$K_p^{pH} = K_{atm}^{pH} \exp\left(\frac{-p \Delta V}{RT}\right) = \frac{2130^{2130} C^{2130} \alpha^{2131}}{(1-\alpha)} \quad (8)$$

onde  $C$  é a concentração total de vírus e  $\alpha$  é o grau de dissociação observado em cada pH e pressão. A forma logarítmica nos fornece uma correlação linear:

$$\ln K_p^{pH} = \ln K_{atm}^{pH} - \frac{p \Delta V}{RT} \quad (9)$$

que é o mesmo que:

$$\ln k_p^{pH} = 2130 \ln 2130 + 2130 \ln C + 2131 \ln \alpha - \ln(1-\alpha) \quad (9)$$

Note que aqui nós consideramos  $[P] = 2130 \alpha C$ ,  $[N] = \alpha C$  e  $[P_{2130}N] = (1-\alpha) C$ .

O gráfico de  $\ln k_p^{pH}$  versus  $p$  fornece uma reta de onde se obtém os coeficientes linear e angular (dados a partir da Eq. 9) que permitirão a obtenção dos valores para  $\Delta G_{atm}^{pH}$  e  $\Delta V$ , respectivamente. A aplicabilidade e as limitações desses métodos são discutidos adiante.

## RESULTADOS

### Efeito do pH sobre o estado de agregação do TMV em pressão atmosférica

O estado de agregação do TMV foi estudado através de medidas de espalhamento de luz em diferentes condições de pH em pressão atmosférica. A Figura 4, mostra a diminuição da intensidade de espalhamento de luz com o aumento do pH. O grau de dissociação ( $\alpha$ ) foi aproximadamente 48% para a amostra de TMV em pH 9,0, diminuindo para aproximadamente 14% para a amostra em pH 6,5, Figura 4, inclusão. A tabela 1, mostra os valores do grau de dissociação ( $\alpha$ ), do TMV nos demais valores de pH.

A estrutura do vírus nestas condições foi investigada através de microscopia eletrônica de transmissão, Figura 5. Em condições de baixos valores de pH, Figura 5A e B, observou-se maior número de imagens de vírus na forma associada. Em altos valores de pH, Figura 5C e D, observou-se o predomínio de fragmentos de vírus e uma menor tendência em ocorrer agregação, comparado com as amostras em baixos valores de pH. Esses resultados estão de acordo com os dados de espalhamento de luz e com o observado na literatura. (Harrington & Schachman, 1956, Perham & Wilson, 1978, Pelcher & Halasa, 1979, Hogue & Asselin, 1984).

	pH								
	4,2	5,2	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
$\alpha$	0,0613	0,06131	0,1192	0,1405	0,2198	0,2719	0,3079	0,4004	0,4858

Tabela 1, mostra os valores do grau de dissociação ( $\alpha$ ) do TMV em diferentes valores de pH e pressão

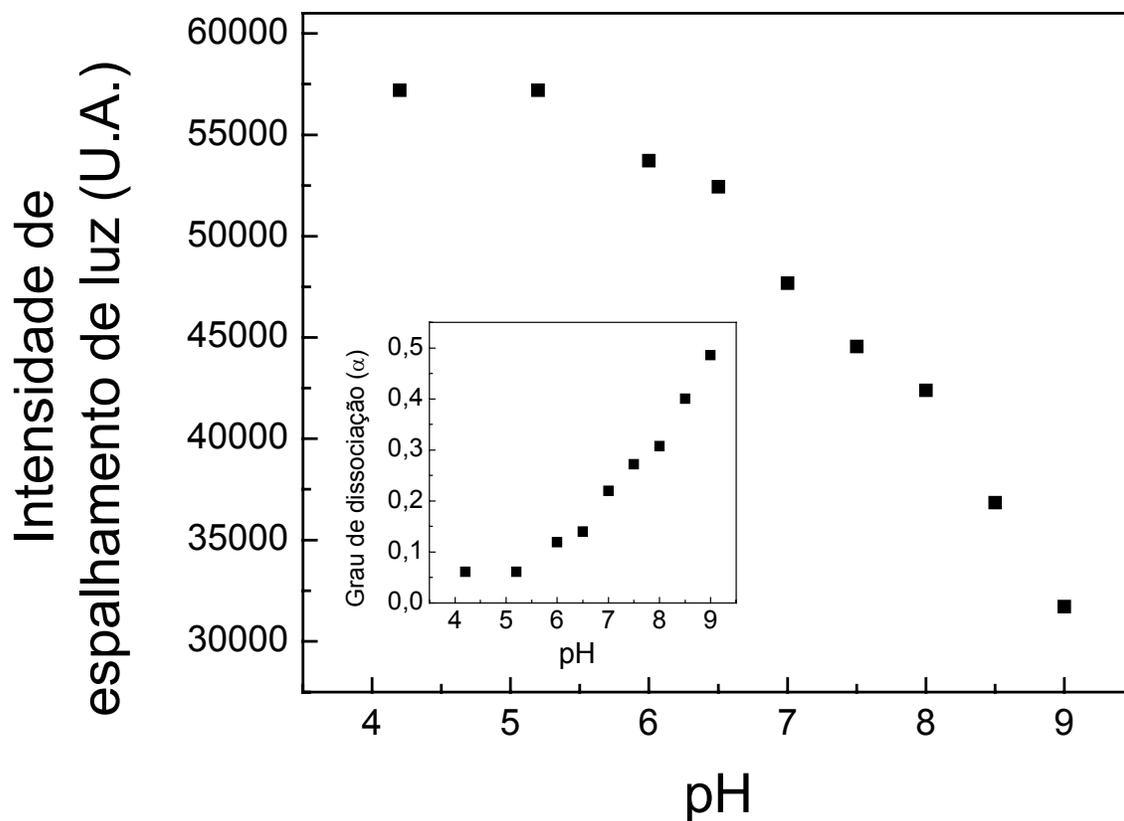


Figura 4. Efeito do pH sobre a intensidade de espalhamento de luz no TMV. A solução de vírus utilizada foi de 0,25 mg/mL, as amostras estavam em tampão 50 mM de acetato de sódio para pH 4,2 e 5,2, Bis Tris propano para pH 6,0 e 6,5 e Tris HCl para pH 7,0 a 9,0. As amostras foram preparadas e colocadas numa cubeta de quartzo, e após repouso de 24h foram realizadas as medidas espectroscópicas. Figura 4, inclusão: grau de dissociação ( $\alpha$ ) em função do pH, calculado a partir da Eq. 1.

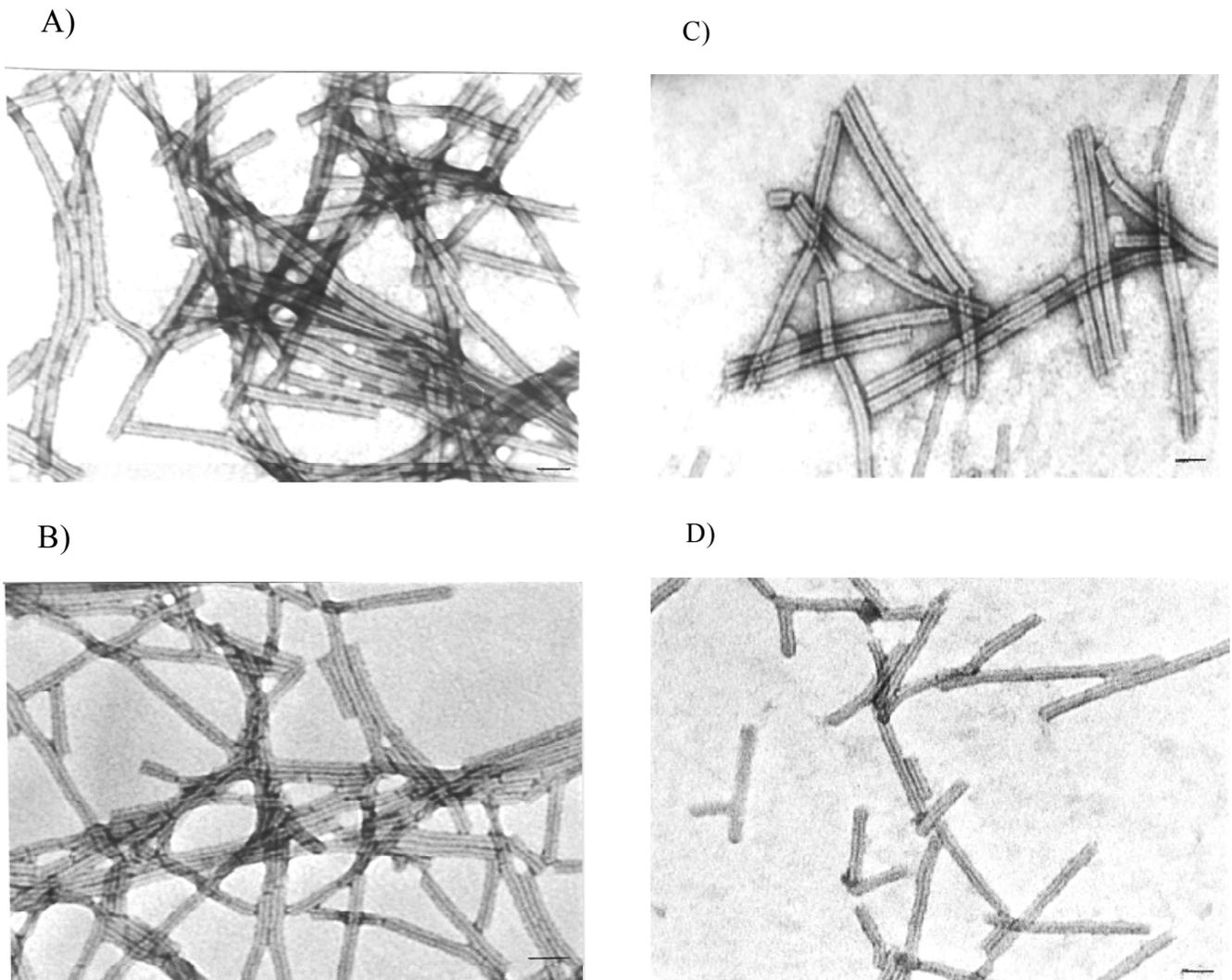


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão do TMV em diferentes valores de pH e em pressão atmosférica. A solução viral de 0,25 mg/mL estava em tampão 50 mM de acetato de sódio pH 4,2 (A), Bis Tris propano pH 6,5 (B), Tris HCl pH 8,0 (C) e pH 9,0 (D). As amostras foram preparadas e depois de 24h foram realizadas as microscopias. Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. A barra de calibração corresponde a 50 nm.

### **Efeito da alta pressão sobre o TMV em diferentes valores de pH**

O processo de dissociação do TMV foi monitorado através do espalhamento de luz sobre as amostras de TMV em diferentes valores de pH e pressão, Figura 6. Foi possível observar que a intensidade de espalhamento de luz foi maior em pressão e pH menores. A partir de pH 7,0, houve queda de espalhamento de luz já à pressão atmosférica, facilitando significativamente a dissociação induzida por pressão. No retorno à pressão atmosférica após alta pressão não se observou significativa recuperação da intensidade de espalhamento de luz para as amostras em  $\text{pH} \geq 6,0$ , indicando estabilização dos produtos de dissociação, representados nesta figura pelos símbolos abertos.

Foi estudado o perfil de eluição através de cromatografia de alta performance em gel filtração do TMV, em diferentes valores de pH, e após incubação em alta pressão, Figura 7. Em pH 6,5 em pressão atmosférica e após pressão de 220 MPa, o TMV eluiu no volume de exclusão da coluna ( $V_0$ ), indicando que os produtos de dissociação apresentavam ainda um alto peso molecular, Figura 7A, enquanto que em pH 8,0 em pressão atmosférica o TMV já apresentava parcial dissociação, que foi mais acentuada após pressão de 220 MPa, eluindo próximo ao volume total da coluna, correspondendo a produtos de dissociação de baixo peso molecular, Figura 7B.

A Figura 8 mostra a microscopia eletrônica de transmissão do TMV fixado sob pressão de 220 MPa e no retorno à pressão atmosférica. Em pH 6,5, foi observado um grande número de partículas menores de TMV, Figuras 8A e B. O mesmo efeito foi observado em pH 8,0, porém, com maior intensidade no grau de dissociação, Figuras 8C e D. Em ambos valores de pH as espécies dissociadas mostraram uma tendência reduzida em se reassociar após incubação em alta pressão.

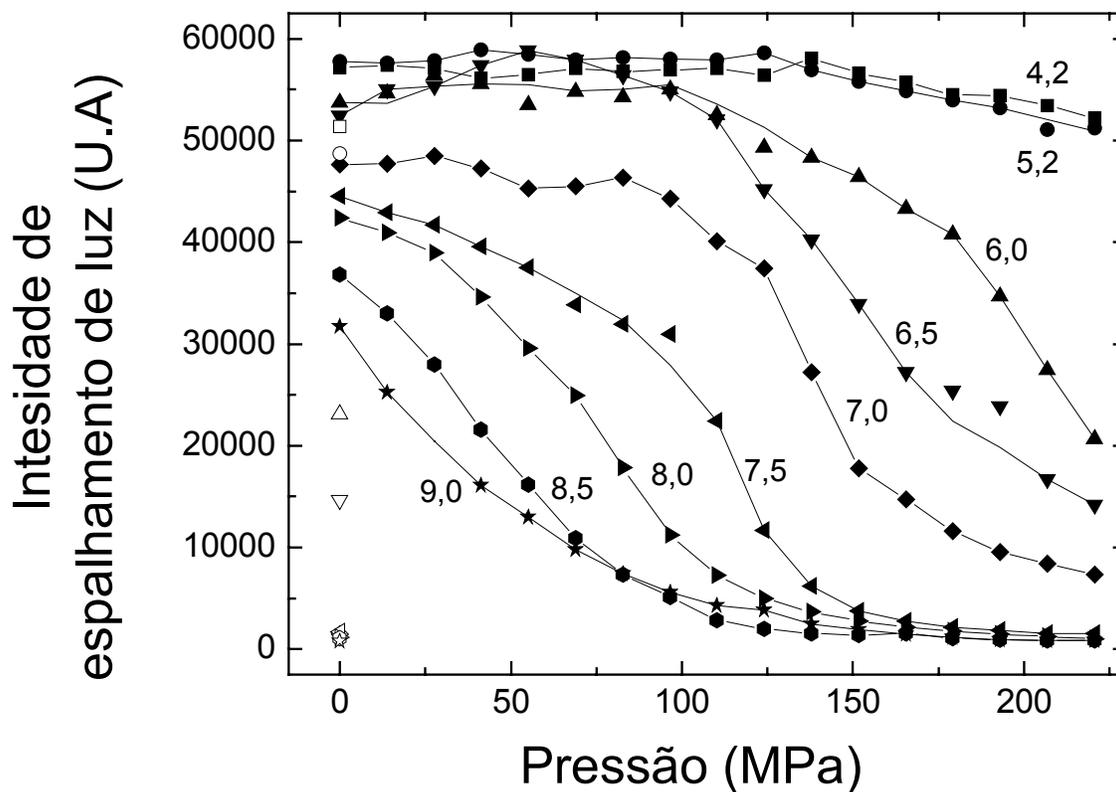


Figura 6. Efeito da pressão sobre o TMV em diferentes valores de pH. A solução de vírus 0,25 mg/mL estava em tampão 50 mM de acetato de sódio (pH 4,2 e 5,2), Bis Tris propano (pH 6,0 e 6,5) e Tris HCl (pH 7,0 a 9,0). Após o preparo as amostras foram submetidas a alta pressão, as medidas de espalhamento de luz foram realizadas 16 minutos após cada nível de pressão. U.A. = unidade arbitrária. Símbolos abertos: retorno à pressão atmosférica. Os experimentos foram feitos em triplicata apresentando desvio padrão menor que os símbolos.

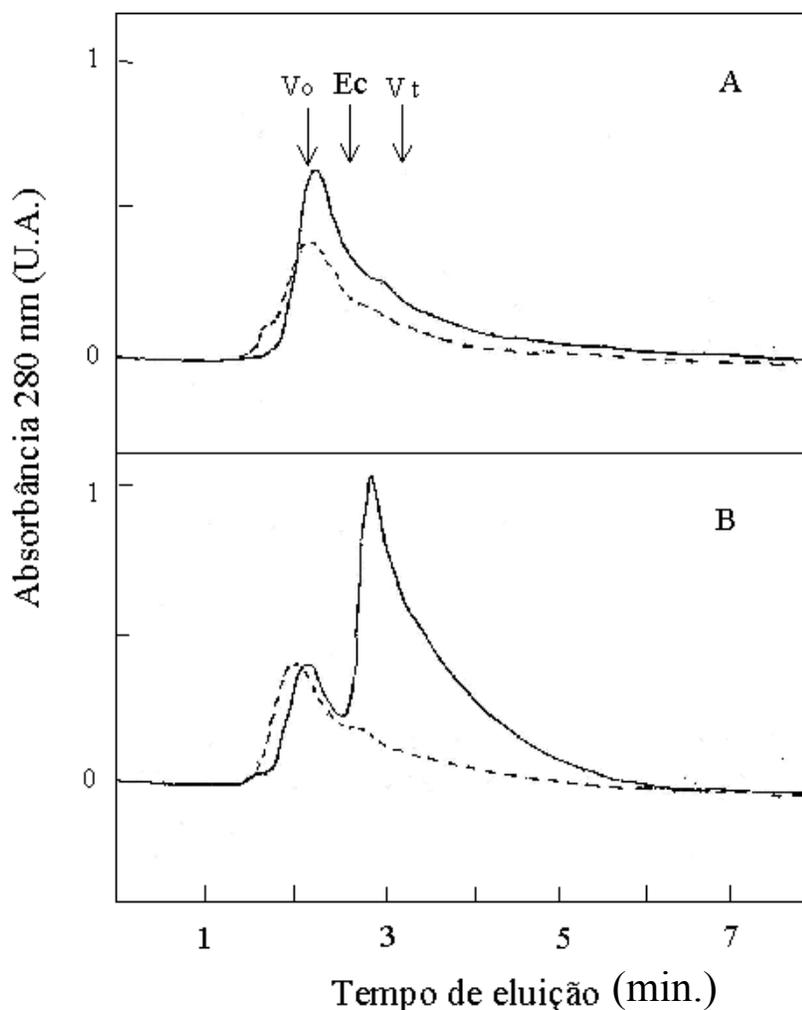


Figura 7. Cromatografia de alta performance em gel filtração do TMV em diferentes valores de pH, à pressão atmosférica e após pressão de 220 MPa. Foram aplicados 100  $\mu$ l da amostra viral (0,25 mg/mL) e o fluxo utilizado foi de 0,3 mL/ min. Linha tracejada, TMV em pressão atmosférica e linha contínua TMV após 100 minutos incubados sob pressão de 220 MPa. (A) TMV pH 6,5 em tampão 50 mM Bis Tris propano, (B) TMV pH 8,0 em tampão 50 mM Tris HCL.  $V_0$  é o volume inicial e,  $E_c$  e  $V_t$ , correspondem, respectivamente, ao ponto de eluição da hemoglobina extracelular de anelídeo *G. paulistus* de  $3,3 \times 10^6$  Da. e da hemoglobina humana de 64 kDa. U.A. = unidade arbitrária.

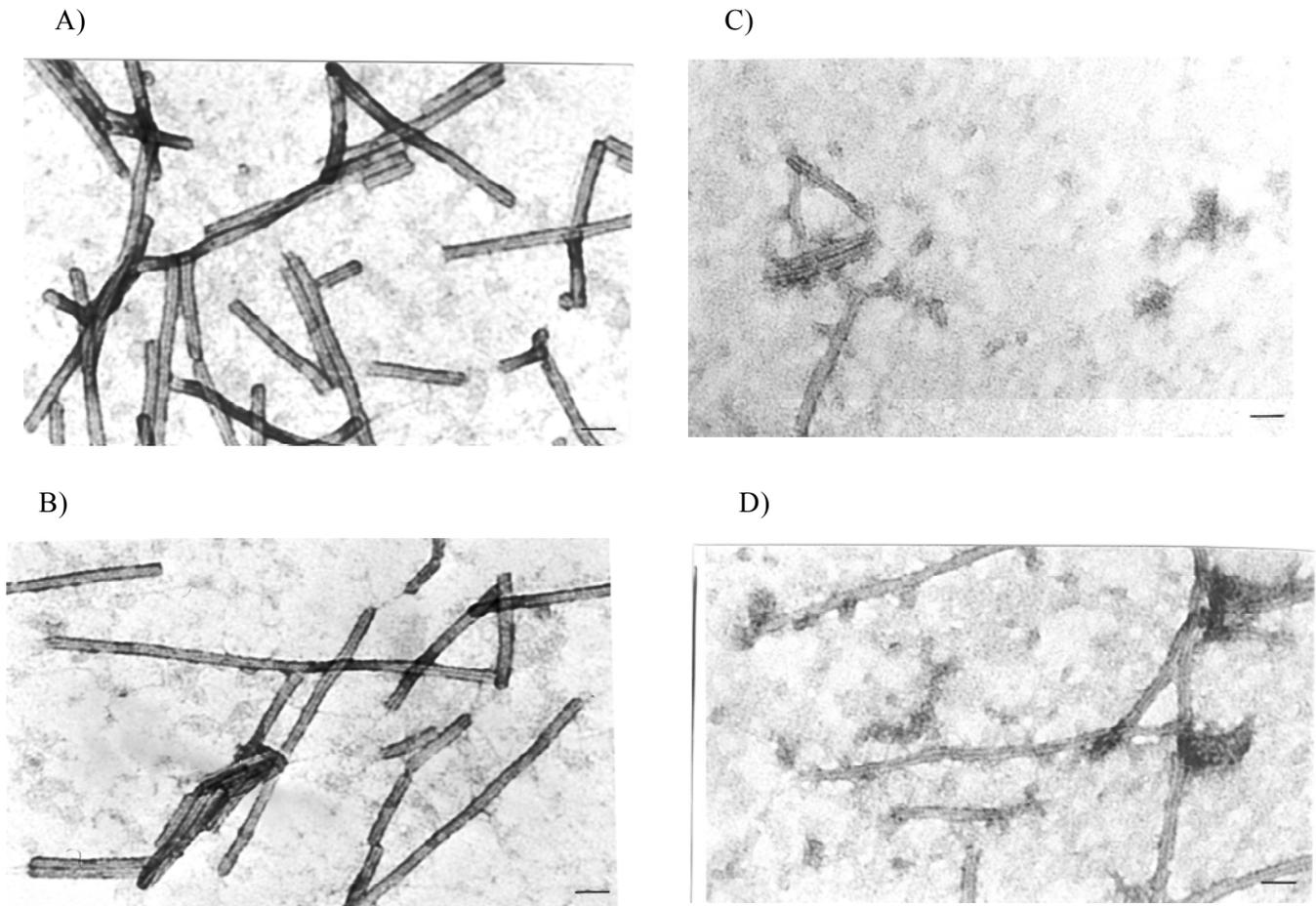


Figura 8. Microscopia eletrônica do TMV fixado sob pressão e após retorno à pressão atmosférica. Solução de vírus de 0,25 mg/mL em tampão 50 mM de Bis Tris propano pH 6,5 (A e B) e Tris HCl pH 8,0 (C e D). O TMV foi incubado por 100 min em pressão de 220 MPa e fixado nesta pressão (A e C) e 40 min. após retornar a pressão atmosférica (B e D). A fixação foi realizada com solução de glutaraldeído 0,5%. Contrastante negativo acetato de uranila 1%. A barra de calibração corresponde a 50 nm.

Os dados de espalhamento de luz da Figura 6, podem ser correlacionados aos respectivos graus de dissociação ( $\alpha$ ) através da Eq. 1, Figura 9A. Considerou-se  $\alpha = 0$  (100% associado) a solução de TMV em pH 4,2, a qual apresentou uma maior intensidade de espalhamento de luz, e  $\alpha = 1$  (100% dissociado) para o TMV em pH 9,0 sob pressão de 220 MPa, condição de intensidade de espalhamento de luz similar à solução tampão. Os dados mostrados são semelhantes aos descritos para a Figura 6, porém, com uma melhor ideia quantitativa da dissociação. Em baixos valores de pH (4,2 e 5,2), mesmo sob alta pressão as amostras apresentaram dissociação em torno de 10%. Dissociação intermediária foi observada nas amostras em pH 6,0 e 6,5, com aproximadamente 60 e 65% de dissociação, respectivamente. Acima de pH 7,5 atingiu-se 100% de dissociação. No retorno à pressão atmosférica, as amostras acima de pH 5,2, permaneceram dissociadas, Figura 9A, símbolos abertos. A tabela 2, mostra todos os valores do grau de dissociação ( $\alpha$ ) do TMV em diferentes condições de pH e pressão. Com a aplicação da Eq. 9, a representação gráfica de  $\ln K_p^{pH}$  versus  $p$ , fornece a relação linear destes pontos, que é mostrada na Figura 9B, cujo coeficiente linear e angular correspondem, respectivamente, aos valores de  $\Delta G_{am}^{pH}$  e  $\Delta V$  de dissociação.

A Figura 10 mostra o cálculo do  $\Delta G_{am}^{pH}$  em função do pH. Observa-se a diminuição da energia livre de dissociação de 88,49 para 58,43 MJ/mol de TMV na elevação do pH de 4,2 a 9,0, portanto, com uma energia de estabilização de 30,06 MJ/mol de TMV nessa mudança de pH, correspondendo a 14,1 kJ/mol de subunidade de TMV. A variação de volume de dissociação com o pH é mostrado na Figura 10, inclusão. Observou-se uma diminuição em valores absolutos de -49,7 para -21,7 mL/mol de subunidade de TMV, na variação de pH de 4,2 a 9,0. Isso sugere que as espécies dissociadas presentes na solução

apresentam uma nova conformação, onde ocorre exposição parcial das interfaces das subunidades da proteína, e o possível surgimento de espaços não ocupados entre as subunidades dissociadas faz com que haja uma nova reorganização do solvente, que então passa a ocupar um menor volume (Silva *et al.*, 2001).

A estequiometria de prótons na dissociação do TMV ( $\nu_D$ , Eq. 2) pode ser obtida graficamente através da Eq. 5. O ajuste linear dos resultados obtidos para  $\Delta G_{atm}^{pH}$  versus pH, Figura 10, fornece como coeficiente linear o  $\Delta G_{atm}^0$  igual a 119,43 MJ/mol de TMV, e o coeficiente angular corresponde ao  $\nu_D$  igual a 1349,42 mol de H<sup>+</sup>/mol de partícula de vírus, ou 0,634 mol de H<sup>+</sup>/ mol de subunidade de TMV.

Para investigar se as estruturas formadas em solução estavam desnaturadas, foi examinado o espectro de emissão de fluorescência em vários valores de pH e pressão. A figura 11, inclusão, mostra um aumento da intensidade de fluorescência do TMV com o aumento do pH e pressão. A figura 11, mostra a normalização (através da intensidade) dessas fluorescências, e comparando-se os extremos em pH 9,0 sob pressão de 220 MPa, e em pH 4,2 em pressão atmosférica, (linhas a e b, respectivamente), foi observada uma pequena mudança para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência de aproximadamente 200 cm<sup>-1</sup>, indicando assim ausência de desnaturação significativa. Em contraste, a presença de uréia 4M em pressão atmosférica em pH 7,0 induziu significativa mudança para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência, 2600 cm<sup>-1</sup> (linha c).

As análises de dinâmica de fluorescência do TMV para estudo de tempo de vida de triptofano foram feitas nestas condições, Figura 12. Observa-se um contínuo aumento no tempo de vida médio de triptofano com aumento do pH em pressão atmosférica, sob pressão de 220 MPa, e um aumento mais significativo na presença de uréia 4M em pressão

atmosférica. A tabela 3, mostra os valores do tempo de vida médio de triptofano do TMV nestas diferentes condições.

Pressão MPa	pH								
	4,2	5,2	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
	$\alpha$								
0	0	0,0015	0,06171	0,08445	0,16894	0,25325	0,27929	0,37548	0,46441
13,789	0,00084	0,00247	0,04478	0,09802	0,16837	0,26443	0,30437	0,44215	0,57698
27,579	0,00169	0,00578	0,01457	0,09171	0,17454	0,27545	0,33829	0,52891	0,675
41,368	0,00174	0,00751	0,02941	0,11265	0,17613	0,3125	0,41382	0,64032	0,73496
55,158	0,00196	0,00947	0,06559	0,13454	0,21205	0,34965	0,50123	0,73426	0,78921
68,97	0,00215	0,01245	0,04283	0,15325	0,20794	0,41404	0,58142	0,82434	0,84429
82,737	0,00407	0,01687	0,05182	0,17451	0,19301	0,44864	0,70416	0,88638	0,88619
96,526	0,00697	0,01845	0,07787	0,18452	0,22896	0,46618	0,8196	0,92479	0,91691
110,32	0,01446	0,02458	0,08244	0,19654	0,30297	0,6179	0,88791	0,96432	0,93929
124,11	0,01644	0,02851	0,14029	0,21247	0,35069	0,80858	0,9276	0,97899	0,94718
137,89	0,01845	0,03476	0,15748	0,30021	0,53179	0,90487	0,9499	0,98712	0,97213
151,68	0,02619	0,04487	0,19068	0,41301	0,7002	0,94863	0,96604	0,99062	0,98083
165,47	0,04809	0,05106	0,24711	0,53211	0,75392	0,96632	0,97689	0,98795	0,98842
179,26	0,04861	0,06706	0,29139	0,56408	0,80947	0,97666	0,98372	0,99574	0,99402
193,05	0,06615	0,07039	0,39948	0,59209	0,84595	0,98266	0,98828	0,99835	0,99731
206,84	0,08802	0,10559	0,52834	0,61852	0,86679	0,98779	0,99232	0,99894	0,99934
220,63	0,09644	0,10836	0,59981	0,65395	0,88537	0,98782	0,99619	0,99971	0,99915
0 Volta	0,0095	0,1052	0,6045	0,6534	0,8952	0,9825	0,9954	0,9941	0,9991

Tabela 2, valores do grau de dissociação ( $\alpha$ ) do TMV em diferentes condições de pH e pressão.

	Tempo de vida médio de triptofano do TMV								
	PH								
	4,2	5,2	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
Controle	2,88	2,89	3,07	3	3,15	3,2	3,3	3,41	3,51
220 MPa	2,9		3,6		4,07				4,3
Uréia 4M	3,16		4,55		5,25			6,42	7,67

Tabela 3, valores de tempo de vida médio de triptofano do TMV, em diferentes condições de pH e pressão.

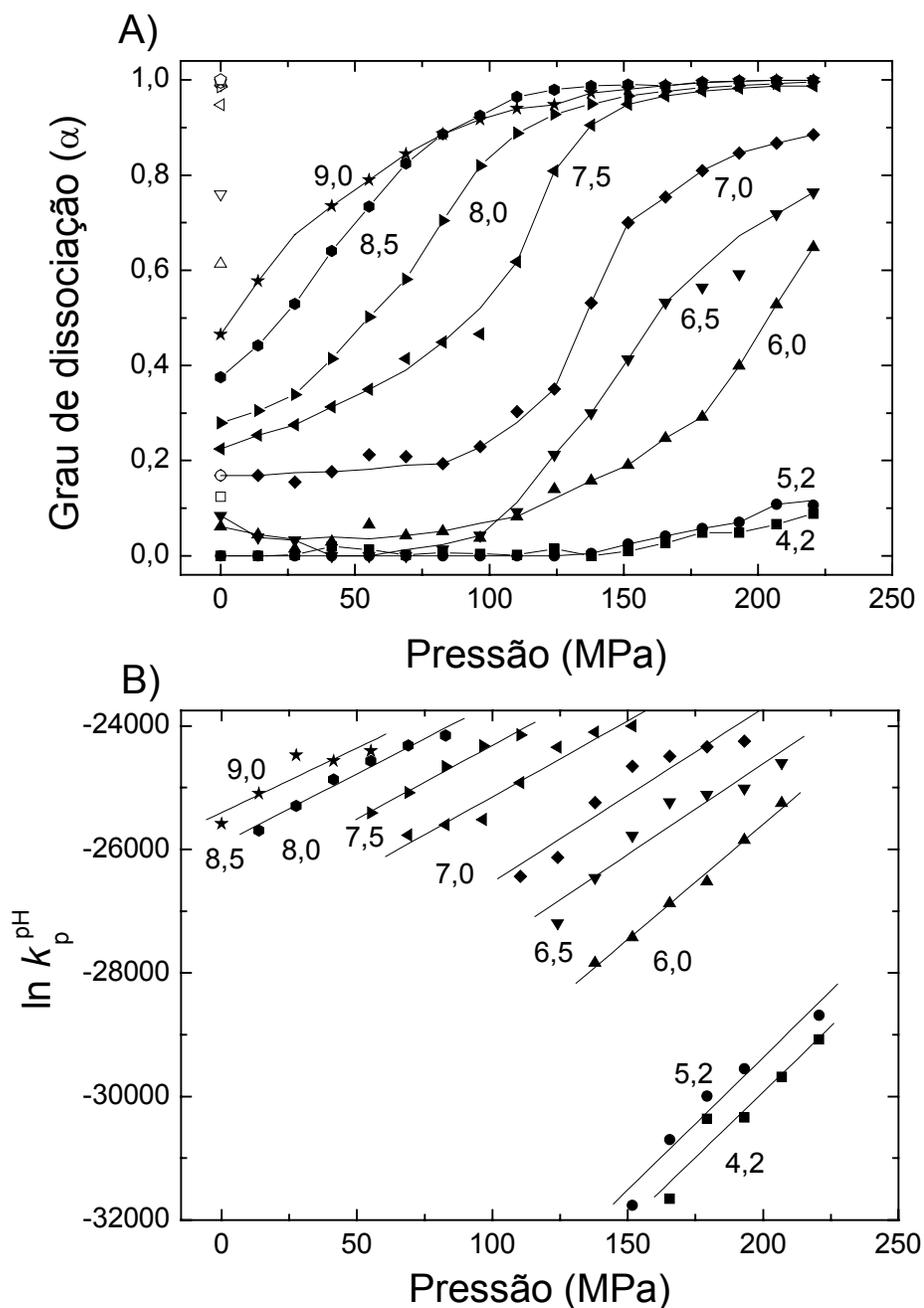


Figura 9. A) Grau de dissociação baseado nos dados de espalhamento de luz da Figura 6 e Eq. 1. B) Gráfico de  $\ln K_p^{\text{pH}}$  em função da pressão, onde  $\ln K_p^{\text{pH}} = 2130 \ln 2130 + 2130 \ln C + 2131 \ln \alpha - \ln (1-\alpha)$ . As linhas são correspondentes aos ajustes lineares desses dados em cada pH.

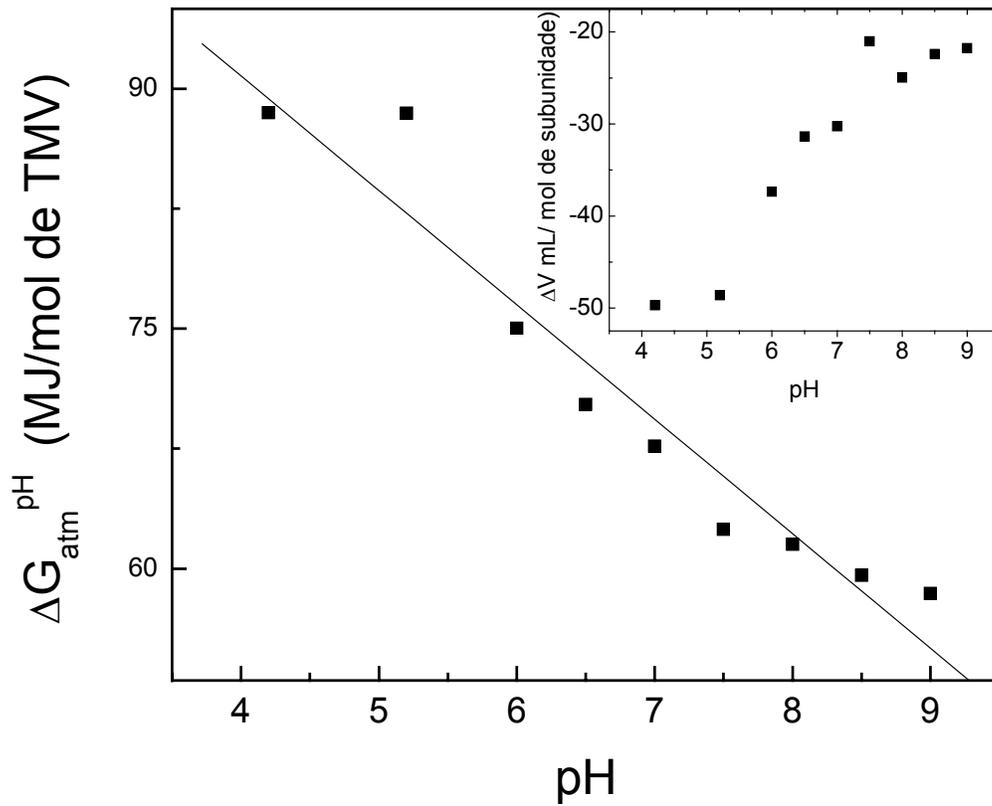


Figura 10. Efeito do pH sobre a energia livre de Gibbs na dissociação do TMV,  $\Delta G_{atm}^{pH}$ . Esses resultados foram obtidos dos ajustes lineares da Figura 9B aplicados à Eq. 9. Figura 10, inclusão: variação de volume de dissociação  $\Delta V$  em função do pH. Dados obtidos dos ajustes angulares da Figura 9B.

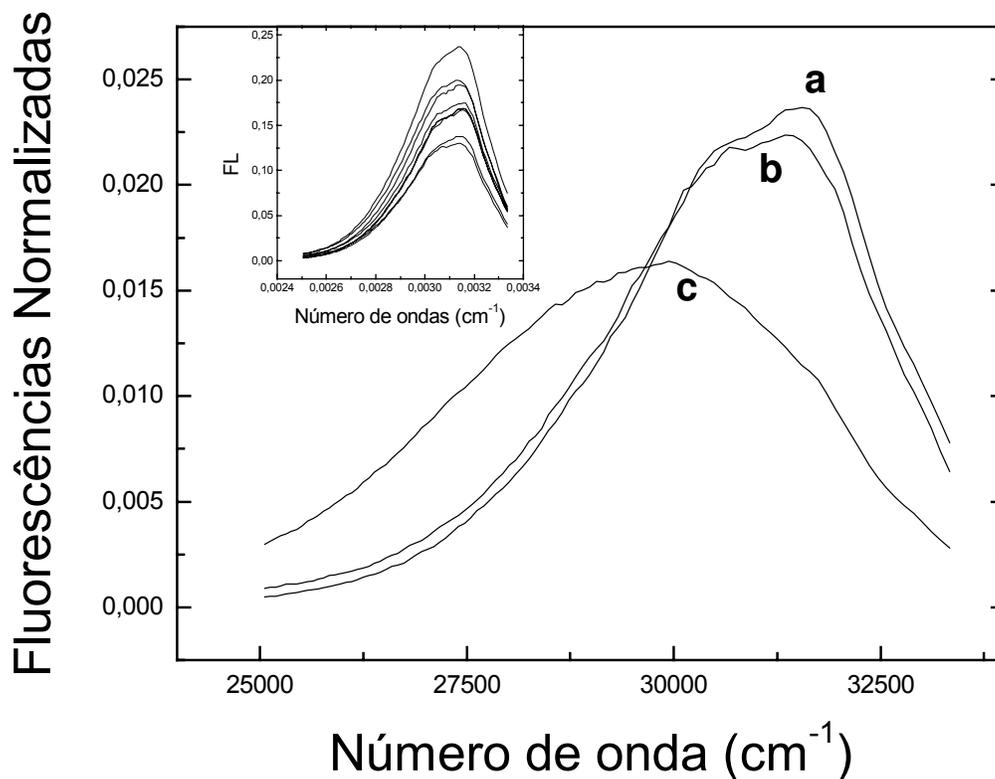


Figura 11 Efeito do pH sobre o espectro de emissão de fluorescência do TMV (normalizadas pela intensidade), (a) em pressão atmosférica em tampão 50mM de acetato de sódio pH 4,2, (b) sob pressão de 220 MPa em tampão 50 mM Tris HCL pH 9,0 e (c) em pressão atmosférica em tampão Tris HCL pH 7,0 em combinação com uréia 4M. Figura 11, inclusão: Efeito do pH sobre o espectro de emissão de fluorescência do TMV em diferentes valores de pH e pressão, dados não normalizados.

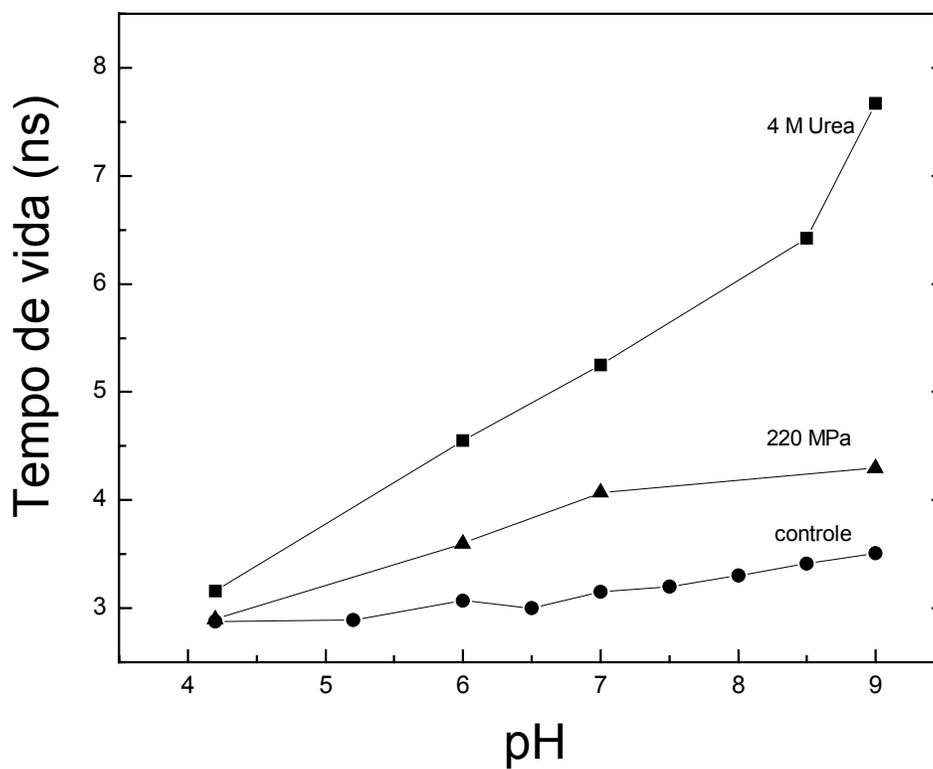


Figura 12. Efeito do pH sobre o tempo de vida de triptofano do TMV em pressão atmosférica (●), em pressão de 220 MPa (●) e em presença de uréia 4M em pressão atmosférica (●). As amostras foram excitadas em comprimento de onda de 285 nm.

## DISCUSÃO

O presente trabalho mostra quantitativamente o efeito do pH na estabilidade do TMV, fenômeno bastante conhecido para este vírus clássico, porém, não tendo sido feita anteriormente a análise desse parâmetro. O efeito de prótons na estabilidade deste vírus é devido à interação de grupos carboxílicos de aminoácidos existentes entre as subunidades. A neutralização destes grupos por íons  $H^+$  diminui a repulsão eletrostática entre as subunidades do TMV, com conseqüente aumento na afinidade entre as mesmas. Em pH alcalino predominam as repulsões eletrostáticas entre as subunidades facilitando a dissociação (Caspar, 1963, Klug, 1972, Culver, 2002). A introdução de alta pressão permitiu promover dissociação de maneira significativa, e assim analisar mais detalhadamente a estequiometria de prótons.

Os experimentos de dissociação em diferentes condições de pH e pressão indicaram que durante a dissociação do TMV, suas subunidades sofrem mudanças estruturais que levam a uma liberação de prótons. Em pH alcalino observa-se facilitação da dissociação, portanto, redução da afinidade entre suas subunidades ( $\Delta G_{am}^{pH}$ ). Este comportamento é também observado em vários processos envolvendo agregados protéicos, incluindo a dissociação da hemocianina (Bonafe *et al.*, 1991, 1994) e a dissociação e oxigenação da hemoglobina humana (Chu *et al.*, 1984), mostrando a abrangência e significativa participação dos prótons na regulação da função e na dinâmica de proteínas. Outros íons, como o cálcio, apresentam efeitos significativos de estabilização em vários sistemas, entre eles a hemocianina e a hemoglobina extracelular, incluindo processo de reassociação de moléculas dissociadas (Bonafe *et al.*, 1991, 1994).

Para quantificar a atuação dos prótons na clássica dissociação do TMV, os resultados obtidos pelo gráfico do  $\Delta G_{atm}^{pH}$  em função do pH foram traçados usando um modelo linear baseado em uma única estrutura de vírus sujeita a dissociação. Assim, os dados experimentais de natureza sigmoïdal sugeriram pelo menos duas estruturas ou estados de agregações virais distintos, cada um predominando em diferentes extremos de pH. Nesse contexto, o número de prótons obtidos na dissociação, 0,634 mol de H<sup>+</sup>/mol de subunidades de TMV, representam uma média de populações provavelmente heterogêneas. A heterogenidade têm sido observada em vários sistemas (Silva *et al.*, 1989, Erijman & Weber, 1991, Bonafe *et al.*, 1994). No caso do TMV, essa heterogenidade pode corresponder às diferentes formas de dissociação observadas na literatura (Harrington & Schachman, 1956, Perham & Wilson, 1978, Pelcher & Halasa, 1979, Hogue & Asselin, 1984).

Weber (1986), propôs que moléculas de água em contato com interfaces proteína-proteína das espécies dissociadas mudam as estruturas das espécies pela interação com regiões hidrofóbicas, levando a diminuição de afinidade entre as subunidades. A formação dessas estruturas seria controlada por um processo que levaria em conta a extensão das exposições das subunidades livres com as moléculas de água. Isso pode explicar os resultados obtidos aqui, bem como os relatos encontrados, tais como o alto grau de associação observado durante um ciclo rápido de compressão/descompressão e a progressiva diminuição na reversibilidade com o aumento de tempo nesses experimentos (Weber 1986, Bonafe *et al.*, 1994). Os resultados obtidos para a mudança de energia de dissociação e para o retorno às condições de pressão atmosférica após compressão indicam

que em altos valores de pH e pressão, estruturas de baixa afinidade predominam em solução.

A desestabilização do TMV pelo aumento do pH parece estar relacionada com três sítios de repulsão eletrostática com envolvimento de grupos carboxílicos, que são: Glu 50 de uma subunidade e Asp 77 de uma subunidade adjacente, Glu 95 e Glu 106 de subunidades adjacentes, e o sítio de ligação do RNA, onde o Asp 116 está próximo a um fosfato do RNA (Namba *et al.*, 1989). Culver *et al.* (1995), demonstraram que mutagênese sítio dirigidas do Glu 50 e Asp 77, substituídos respectivamente por Gln e Asn, resulta em uma estabilização alcalina e significativa perda da infectividade. Neste contexto, provavelmente, a maioria da contribuição dos prótons encontrados para a estequiometria (0.634 mol de H<sup>+</sup>/mol de subunidade de TMV) são originadas desses três grupos.

Os valores de  $\Delta V$  obtidos durante dissociação por pressão indicam um comportamento heterogêneo, com uma redução nos valores em termos absolutos de -49,7 a -21,7 mL/ mol de subunidade de TMV, com aumento do pH de 4,2 a 9,0. O sinal e a magnitude das mudanças de volume em resposta ao efeito da pressão em processos biológicos têm sido extensivamente discutidos (Kauzmann, 1987, Dill 1990). Para muitas proteínas analisadas em baixa e moderada temperatura, a variação de volume é negativa (Royer 2002). A origem da diminuição de volume no processo de dissociação pode ser explicado pelos seguintes fenômenos: organização do solvente e conseqüente contração de volume, denominado de eletrostricção, devido a quebra de pontes salinas ou exposição de resíduos polares e não polares seguidos pela hidratação e, ocupação do solvente em espaços livres surgidos de contatos imperfeitos entre as subunidades dissociadas (Silva *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o aumento do pH induz aumento de exposição de grupos carregados, resíduos polares e hidrofóbicos e também a exposição de cavidades que seriam preenchidas pelo solvente, reduzindo assim os valores de  $\Delta V$  de dissociação. Uma dependência similar de  $\Delta V$  em função de pH foi também observada para a desnaturação da RNase A (Brandts, *et al.*, 1970) e para o apocitocromo b562 a 20 °C, nesse caso mudando de  $-97$  mL/mol em pH 3,92 a  $-60$  mL/mol em pH 10 (Fuentes, *et al.*, 1998).

Um fenômeno similar envolvendo uma diminuição no  $\Delta V$  com a dissociação do TMV com aumentos da concentração de uréia foi descrito anteriormente. Novamente nesse caso deve ter ocorrido hidratação parcial das subunidades, com conseqüente diminuição de  $\Delta V$  (Bonafe *et al.*, 1998).

Normalmente não se observa desnaturação de vírus apenas por alta pressão (pelo menos até 220 MPa). Alta pressão em rotavírus, promove significativa inativação em poucos minutos, sem ocorrência de desnaturação, porém, em presença de uréia mesmo em baixas concentrações como 1M, é observada importante desnaturação (Pontes *et al.*, 2001). Experimentos com o bacteriófago R17 mostraram que o aumento da pressão de 0,1 a 250 MPa, promoveu desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência de  $150$   $\text{cm}^{-1}$ , ao passo que a presença de uréia aumentou o desvio para o vermelho a  $1000$   $\text{cm}^{-1}$ . O efeito do pH sobre o espectro de emissão de fluorescência na dissociação do TMV mostrou um comportamento similar àqueles observados para o efeito da pressão. Embora o aumento do pH da solução tenha facilitado a dissociação da proteína nesse intervalo de pH, foi incapaz de desnaturar significativamente o TMV na ausência de uréia. O aumento na intensidade do espectro de emissão de fluorescência em altos valores de pH e pressão

sugeriu maior exposição dos resíduos de triptofano a moléculas de água, e a adição de uréia aumentou drasticamente a polaridade no ambiente dos triptofanos, causando assim um importante aumento no desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência.

Análises do tempo de vida foram usadas para estudar detalhes no ambiente dos aminoácidos na presença e ausência da molécula de RNA viral na estabilidade de vírus (Da Poian, *et al.*, 2002). Esses autores compararam componentes “middle” e “bottom” isolados por ultracentrifugação do vírus do mosaico do cowpea (CMV), com o componente “top” formado pelo capsídeo vazio (livre do RNA), que tem coeficiente de sedimentação menor, ocupando um nível mais alto no tubo. O tempo de vida do triptofano foi menor na presença do RNA (1,8 e 2,8 ns para os componentes “middle” e “bottom”, respectivamente), enquanto que o componente “top”, livre do RNA, apresentou tempo de vida de 4,2 ns. Esses resultados sugeriram uma maior estabilidade da partícula viral mediada pela molécula de RNA (Da Poian *et al.*, 2002). Analogamente, a presente investigação detectou um importante efeito de pH no tempo de vida de triptofano para o TMV. Assim, a redução observada no tempo de vida em baixos valores de pH sugeriram que o aumento na estabilidade viral teve correlação com o tempo de vida médio dos resíduos de triptofano.

Desde a evidência inicial do envolvimento de prótons na associação das subunidades do TMV obtidas por Sreenivasaya & Pirie (1938), muitos esforços têm sido realizados para fornecer uma explicação plausível do mecanismo envolvido nesse processo, bem como sua regulação. O presente trabalho para quantificar os prótons envolvidos na dissociação viral fornece uma informação importante acerca da quantificação desse importante efector, na estabilidade do vírus. A relevância desses resultados se relaciona da diversidade de processos biológicos que usam esse efector como íon comum em inúmeros passos de reação. A consequência desse fenômeno é a formação de estados relativos de

energia, correspondendo a diferentes estruturas em solução a serem moduladas pela variação do pH, dependendo da estequiometria de prótons envolvidos em cada passo da reação.

A evidência de que o pH modula a dissociação por alta pressão sem modificação drástica das estruturas protéicas dissociadas (pois não ocorre desnaturação significativa), sugere que a inativação de vírus por pressão deve ser investigada cuidadosamente em diversas condições para otimização dos efeitos imunogênicos e eficiência na inativação. O estudo do mecanismo de inativação por pressão, mesmo em vírus complexos, tem desvendado detalhes em eventos moleculares. Recentemente, estudos de vírus envelopados como o VSV mostraram através de microscopia de fluorescência que as partículas virais pressurizadas mantêm propriedades fusogênicas com a membrana da célula sem causar infecção viral, o que sugere um mecanismo de inativação por pressão (Gomes, *et al.*, 2003). Os resultados presentes reforçam as expectativas que a inativação por pressão representa uma poderosa ferramenta para a produção de vacinas antivirais de aplicações médicas. A compreensão da participação de fatores físicos e químicos na estabilidade viral contribui para progressos nessa área.

## CONCLUÇÕES

- O pH altera de maneira significativa a estabilidade viral, conforme inúmeros trabalhos na literatura, e isso é bem evidenciado utilizando-se alta pressão hidrostática, como ferramenta dissociativa.

- Os parâmetros termodinâmicos de energia livre de dissociação nos diversos valores de pH, mostraram uma desestabilização linear com o pH.

- A variação de volume encontrada em diferentes valores de pH, sugerem importante exposição de subunidades em altos valores de pH, repercutindo em diminuição da variação de volume (em valores absolutos).

- A quantificação da estequiometria de prótons no processo de dissociação caracterizou melhor tal fenômeno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asselin, A. & Zaitlin, M. (1978). Characterization of a second protein associated with virion of tobacco mosaic virus. *Virology* **91**, 173-181.
- Blowers, L.E. & Wilson, T.M.A. (1982). The effect of urea on tobacco mosaic virus-polarity of disassembly. *J. Gen. Virol.* **61**, 137-141.
- Bonafe, C.F.S.; Glaser, M.; Voss, E.W.; Weber, G. & Silva, J.L. (2000). Virus inactivation by anilinonaphthalene sulfonate compounds and comparison with other ligands. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 955-61.
- Bonafe, C.F.S.; Vital, C.M.R.; Telles, R.C.B.; Gonçalves, M.C.; Matsuura, M.S.A.; Pessine, F.B.T.; Freitas, D.R.C. & Veja, J. (1998). Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry* **37**, 11097-11105.
- Bonafe, C.F.S.; Araujo, J.R.V. & Silva, J.L. (1994). Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry* **33**, 2651-2659.
- Bonafe, C.F.S.; Villas-Boas, M.S.; Suarez, M.C. & Silva, J.L. (1991). Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonproteic factors. Effect of calcium and glycerol on the reassociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13210-13216.

- Brandts, J.F.; Oliveira, R.J. & Westort, C. (1970). Thermodynamics of protein denaturation. Effect of pressure on denaturation of ribonuclease A. *Biochemistry* **4**, 1038-1047.
- Butler, P.J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus particle: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 537-550.
- Caspar, D.L. (1963). Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Adv Protein Chem.* 1963; **18**, 37-121.
- Chu, A.H.; Turner, B.W. & Ackers, G.K. (1984). Effect of protons on the oxygenation-linked subunit assembly in human-hemoglobin. *Biochemistry* **23**, 604-617.
- Culver, J.N. (2002). Tobacco mosaic virus: assembly and disassembly determinants in pathogenicity and resistance *Annu Rev Phytopathol.* **40**, 287-308.
- Culver, J.N.; Dawson, W.O.; Plonk, K. & Stubbs, G. (1995). Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* **206**, 724-730.
- Da Poian, A.T.; Johnson, J.E. & Silva, J.L. (2002). Protein-RNA interactions and virus stability as probed by the dynamics of tryptophan side chains. *J. Biol. Chem.* **277**, 47596-47602.
- Da Poian, A.T.; Oliveira, A.C. & Silva, J.L. (1995). Cold denaturation of an icosahedral virus: the role of entropy in virus assembly. *Biochemistry* **34**, 2672-2677.

- Da Poian, A.T.; Johnson, J.E. & Silva, J.L. (1994). Differences in pressure stability of the three components of cowpea mosaic-virus: implications for virus assembly and disassembly. *Biochemistry* **33**, 8339-8346.
- Da Poian A.T.; Oliveira A.C.; Gaspar, L.P.; Silva J.L. & Weber, G. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *J Mol Biol.* **231**, 999-1008.
- Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Erijman, L. & Weber, G. (1991). Oligomeric protein associations: transition from stochastic to deterministic equilibrium. *Biochemistry* **30**, 1595-1599.
- Fuente, E.J. & Wand, A.J. (1998). Local dynamics and stability of apocytochrome b562 examined by hydrogen exchange. *Biochemistry* **37**, 3687-3698.
- Gaspar L.C.; Johnson, J.E.; Silva, J.L. & Da Poian, A.T. (1997). Partially folded states of the capsid protein of cowpea severe mosaic virus in the disassembly pathway. *J. Mol. Biol.* **273**, 456-466.
- Goelet, P.; Lomonosoff, G.P.; Butler, P.J.; Akam, M.E.; Gait, M.J. & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**, 5818-5822.
- Gomes, A.M.O.; Pinheiro, A.S.; Bonafe, C.F.S. & Silva, J.L. (2003). Pressure-induced fusogenic conformation of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Biochemistry* **42**, 5540-5546.

- Harrington, W.F. & Schachman, H.K. (1956). Studies on the alkaline degradation of tobacco mosaic virus. I. Ultracentrifugal analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 278-295.
- Hirth, L. & Richards, K.E. (1981). Tobacco mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **26**, 145-199.
- Hogue, R.; & Asselin, A. (1984). study of tobacco mosaic-virus invitro disassembly by sucrose density gradient centrifugation and agarose-gel electrophoresis. *Can. J. Bot.* **62**, 457-462
- Jurkiewics, E.; Villas-Boas, M.; Silva, J.L.; Weber, G.; Hunsman, G. & Clegg, R.M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 6935-6937.
- Kauzmann, W. (1987). Protein stabilization. Thermodynamics of unfolding. *Nature* **325**, 763-764.
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 531-535.
- Klug, A. (1972). Assembly of tobacco mosaic virus. *Fed. Proc.* **31**, 30-42.
- Lauffer, M.A. & Dow, R.B. (1941). The denaturation of tobacco mosaic virus at high pressures. *J. Biol. Chem.* **140**, 509-518.
- Mesh, T.; Kiyama, R.; Ohno, T. & Okada, Y. (1983). Nucleotide sequence of the coat protein cistron and the 3'noncoding region of cucumber green mottle mosaic virus (watermelons strain) RNA. *Virology* **127**, 54-64.

- Mougel, M.; Eyerman, F.; Westhof, E.; Romby, P.; Expert-Bezancon, A.; Ebel, J.P.; Ehersmann, B. & Ehresmann, C. (1987). Binding of Escherichia coli ribosomal protein S8 to 16 S rRNA. A model for the interaction and the tertiary structure of the RNA binding site. *J. Mol. Biol.* **198**, 91-107.
- Neuman, R.C.Jr.; Kauzmann, W. & Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionization in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.* **77**, 2687-2691.
- Noordan, D. (1973). In identification of plant viruses. Methods & experiments. *Centre for Agricultural and Documentation Wafeningem*.
- Ohno, T. & Okada, Y. (1977). Polarity of stripping of tobacco mosaic-virus by alkali and sodium dodecyl-sulfate. *Virology* **76**, 429-432.
- Oliveira A.C., Ishimaru, D.; Goncalves, R.B.; Smith, T.J.; Mason, P.; Sa-Carvalho, D. & Silva, J.L. (1999). Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. *Biophys J.* **76**, 1270-1279.
- Paladini, A. A. & Weber, G. (1981). Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 419-427.
- Pelcher, L. E. & Halasa, M. C. (1979). Comparative-study of the alkaline disassembly of 2 strains of tobacco mosaic-virus. *Virology* **98**, 489-492.
- Perham, R. N. & Wilson, T.M.A. (1978). Characterization of intermediates formed during disassembly of tobacco mosaic-virus at alkaline pH. *Virology* **84**, 293-302.
- Perham, R.N. & Wilson, T.M.A. (1976). Polarity of stripping of coat protein subunits from RNA in tobacco mosaic-virus under alkaline conditions. *FEBS Lett.* **62**, 11-15.

- Perham, R.N. (1969). Sucrose density-gradient analysis of alkaline degradation of tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **45**, 439-441.
- Pontes, L.; Cordeiro, Y.; Giongo, V.; Villas-Boas, M. S.; Barreto, A.; Araujo, J.R.V. Silva, J.L. (2001). Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein *J. Mol. Biol.* **307**, 1171-1179.
- Powell C.A. (1975). Effect of cations on alkaline dissociation of tobacco mosaic-virus. *Virology* **64**, 75-85.
- Raghavendra, K.; Kelly, J.A.; Khairallah, L. & Schuster, T.M. (1988). Structure and function of disk aggregates of the coat protein of tobacco mosaic virus. *Biochemistry* **27**, 7583-7588.
- Royer, C.A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim. Biophys. Acta.* **159**, 201-209.
- Ruan, K. & Weber. G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **28**, 2144-2153.
- Schramm, G.; Schumacher, G. & Zillig, W. (1955). Über die struktur des tabakmosaikvirus. III. Der zerfall in alkalischer losung. *Z. Naturforsch.* **10**, 481-492
- Schuster, T.M.; Scheele, R.B.; Adams, M.L.; Shire, S.J.; Steckert, J.J. & Potschka, M. (1980). Studies on the mechanism of assembly of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.* **32**, 313-329.

- Shalaby, R.A.; Stevens, C.L. & Lauffer, M.A. (1982). Ultracentrifugation studies on early stage polymerization of tobacco mosaic virus protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**, 384-401.
- Shalaby, R.A.F. & Lauffer, M.A. (1977). Hydrogen ion uptake upon tobacco mosaic virus protein polymerization. *J. Mol. Biol.* **116**, 709-725.
- Silva, J.L.; Foguel, D. & Royer, C.A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 612-618.
- Silva, J.L. & Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Adv. Rev. Phys Chem.* **44**, 89-113.
- Silva J.L.; Luan, P.; Glaser, M., Voss, E.W. & Weber, G. (1992). Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J. Virol.* **4**, 2111-7.
- Silva, J.L.; Villas-Boas, M.S.; Bonafe, C.F.S. & Meirelles, N.C. (1989). Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **264**, 15863-15868.
- Silva, J.L. & Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **199**, 149-159.
- Silva J.L.; Miles, E.W. & Weber, G. (1986). Pressure dissociation and conformational drift of the beta dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry.* **25**, 5780-5786.

- Sreenivasaya, M. & Pirie, N.W. (1938). CCXXII. The disintegration of tobacco mosaic virus preparations with sodium dodecyl sulphate. *Biochem. J.* **32**, 1707-1710.
- Stubbs, G. (1999). Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 551-557.
- Weber, G. (1986). Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and of hydrostatic pressure. *Biochemistry* **25**, 3626-3631.
- Weber, G. & Drickamer, H.G. (1983). The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 89-112.
- Xu, G.J. & Weber, G. (1982). Dynamics and time-averaged chemical potential of proteins: Importance in oligomer association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 5268.
- Zimmern, D. & Buttler, P.J.G. (1977). Isolation of tobacco mosaic-virus RNA fragments containing origin for viral assembly. *Cell* **11**, 455-462.