

EFEITO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E BAIXA TEMPERATURA NO VÍRUS DO MOSAICO DO TABACO (TMV)

Cláudia Maria Ribeiro Vital

Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a) <i>Cláudia Maria Ribeiro Vital</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>19/12/96</i>
--

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Bioquímica.

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Campinas, SP - Brasil

1996

V83e

29954/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	TIUNICAMP
	V83e
V.	5.
TOMADO R.	29954
PROD.	281197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/05/97
N.º CPD	

CM-00097729-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

V83e

Vital, Cláudia Maria Ribeiro

Efeito de alta pressão hidrostática e baixa temperatura
no vírus do mosaico do tabaco (TMV) / Cláudia Maria
Ribeiro Vital. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. Pressão hidrostática. 2. Plantas de fumo. 3. Baixas
temperaturas. 4. Vírus de plantas. 5. Uréia. I. Bonafé,
Carlos Francisco Sampaio. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

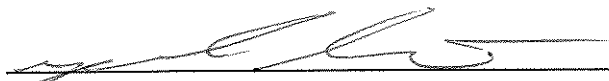
EFEITO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E BAIXA TEMPERATURA NO VÍRUS DO MOSAICO DO TABACO (TMV)

CLÁUDIA MARIA RIBEIRO VITAL

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em 19 de dezembro de 1996, para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Banca examinadora:

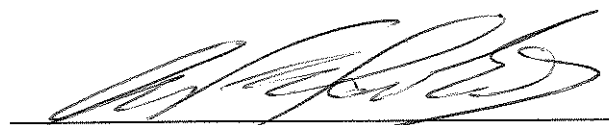
Titulares:



Prof. Dr. Jerson Lima Silva



Prof. Dr. Francisco B.T. Pessine



Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé (orientador)

Suplente:

Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann

" Talvez algum dia a solidão venha a ser adequadamente reconhecida e apreciada como mestra da personalidade. Há muito que os orientais o sabem. O indivíduo que teve experiência da solidão não se torna vítima fácil da sugestão das massas. "

(De palavras lapidadas de Einstein)

A Deus e ao meu pai, Manoel,
pertence esta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos F.S. Bonafê pela orientação neste tempo de trabalho.

A Profa. Dra. Maria do Carmo Gonçalves, ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine e ao Prof. Dr. Jorge Vega pela colaboração para o desenvolvimento do trabalho experimental.

A Deus que acima de tudo me deu forças para conseguir fazer esta dissertação.

A CAPES pela bolsa fornecida.

RESUMO

Investigou-se o efeito de baixa temperatura e diferentes concentrações de uréia combinados a alta pressão hidrostática (até 2,5 kbar) no Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV), um vírus cilíndrico com 40.000 kDa de massa molecular, composto de aproximadamente 2.130 cópias da proteína capsídica (17,5 kDa) envolvendo uma fita de RNA positiva. O vírus foi purificado a partir de folhas de tabaco previamente infectadas com TMV. Os efeitos da pressão foram investigados utilizando gel filtração, microscopia eletrônica (antes e depois de incubação em alta pressão), e métodos espectroscópicos como espalhamento de luz Rayleigh (para avaliar o estado de agregação), fluorescência intrínseca com estudo da intensidade de fluorescência e centro de massa do espectro de emissão (relacionado à ocorrência de desnaturação), e fluorescência extrínseca utilizando-se o Bis-(8-anilinaftaleno-1-sulfonato) (Bis-ANS) como sonda de ambientes hidrofóbicos. Pressão até 2,5 kbar induziu dissociação a $\alpha = 18\%$, e o subsequente abaixamento de temperatura até $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ promoveu dissociação adicional, levando α a 72%. Nessas condições não ocorreu mudança significativa do centro de massa do espectro de emissão, portanto sem desnaturação significativa. A sonda Bis-ANS interagiu mais intensamente com a proteína capsídica na fase de abaixamento de temperatura, sugerindo estrutura semelhante a "molten-globule", e provável interação do Bis-ANS com resíduos positivos da proteína capsídica. Microscopia eletrônica e gel filtração mostraram que os produtos de dissociação são estáveis, ocorrendo reassociação após meses. O gráfico de van't Hoff permitiu calcular a entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) de associação por subunidade deste sistema, respectivamente $+8,23\text{ kcal/mol}$ e $+50,26\text{ cal/K mol}$, mostrando que a associação do TMV é um processo entropicamente dirigido. Uréia induziu significativa dissociação do TMV, e a incubação em alta pressão promoveu dissociação a graus mais elevados. Resultados de microscopia eletrônica e gel filtração foram concordantes com esses achados. A desnaturação do TMV à pressão atmosférica foi observada apenas a partir de concentrações de uréia de 4,0 M. Alta pressão induziu desnaturação do TMV em presença de uréia 2,5 M, com desvio para o vermelho do centro de massa a valores semelhantes aos obtidos em presença de uréia 6,0 M. A variação de volume de associação calculada através da dissociação por pressão (ΔV_p) diminuiu de 16,3 a 3,1 ml / mol subunidade dissociante, respectivamente na ausência e na presença de uréia 2,5 M. Essa diferença sugere que a uréia promove exposição de interfaces proteína-proteína no TMV. A variação de volume de desnaturação calculada através do centro de massa, ΔV_{des} , em presença de uréia 2,5 M, foi de 103,5 ml/mol subunidade desnaturada.

SUMMARY

In this work it was investigated the effect of low temperature and different urea concentrations combined with high hydrostatic pressure (up to 2.5 kbar) on purified samples of Tobacco Mosaic Virus (TMV). The TMV is a single strand RNA (positive sense) virus, showing a cylindrical morphology. It holds a molecular mass of 40,000 kDa and about 2130 copies of the capsidic protein (17.5 kDa). The effect of high pressure on the virus particles was followed by gel filtration, electron microscopy studies and spectroscopic methods such as Rayleigh light scattering (to evaluate the aggregation state), intrinsic fluorescence with fluorescence intensity and center of mass emission spectra (related to denaturation occurrence) studies, and extrinsic fluorescence by using of Bis-(8-anilinonaphthalene-1-sulfonate) (Bis-ANS) as hydrofobic environment probe. Results indicated that incubation at 2.5 kbar have induced dissociation to $\alpha = 18\%$, and decreasing of temperature to $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ have promoted additional dissociation to $\alpha = 72\%$. In such condition it did not occur significative change in the center of mass emission spectra, therefore without significative denaturation. The Bis-ANS probe interacted more intensively with the capsidic protein in the decreasing temperature phase, suggesting similar structure to molten-globule, and probable interaction of Bis-ANS with positive residues of the capsidic protein. Electron microscopy and gel filtration studies showed that the dissociation products are stable, occuring reassociation process after months. The plot of van't Hoff allowed calculating the enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS) of association per subunit mol of that system, respectively of $+8.23\text{ kcal/mol}$ and $+50.26\text{ cal/K mol}$, indicating that the TMV association is an entropic driving process. Urea induced significative dissociation of TMV samples, and the incubation at high pressure promoted dissociation at higher levels. Electron microscopy and gel filtration results were in agreement with that findings. The denaturation of TMV at atmospheric pressure was observed only at 4.0 M and higher urea concentrations. High pressure induced TMV denaturation in the presence of 2.5 M urea, followed by red shift of the mass center up to values similar to those obtained in the presence of 6.0 M urea. The volume change of association calculated by the pressure dissociation (ΔV_p) decreased from 16.3 to 3.1 ml/mol subunit dissociated, respectively in the absence and presence of 2.5 M urea. Such difference suggests that urea induces exposure of the interface protein-protein in the TMV particle. The volume change of denaturation calculated by the center of mass, ΔV_{des} in the presence of 2.5 M urea was of 103.5 ml/mol subunit denaturated.

ABREVIACES

Bis-ANS	(Bis-(8-anilinonaftaleno-1-sulfonato))
CPMV	Vrus do Mosaico do Cowpea
DNA	cido Desoxiribonucleico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
RNA	cido Ribonucleico
TMV	Vrus do Mosaico do Tabaco
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1- Pressão hidrostática e ligações intermoleculares.....	2
2- Termodinâmica da dissociação de proteínas. Efeito da pressão.....	3
3-Efeito de uréia e pressão em proteínas.....	8
4- Efeito de baixa temperatura sobre a estabilidade de proteínas.....	8
5-Estrutura e montagem do TMV.....	10
OBJETIVOS	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
1-Reagentes.....	14
2-Equipamento de Alta Pressão Hidrostática e Termodinâmica da Dissociação por Pressão.....	14
3- Obtenção e purificação do TMV	16
4- Microscopia Eletrônica.....	17
5-Estudos de Fluorescência Sob Pressão.....	17
6- Espectros de Fluorescência do Bis-ANS.....	19
7- Gel Filtração em Cromatografia Líquida de Alta Performance.....	19
RESULTADOS	21
- Efeito de pressão hidrostática e baixa temperatura sobre o TMV.....	21
- Efeito de pressão e diferentes concentrações de uréia sobre o TMV.....	42
DISCUSSÃO	55
- Alta pressão em TMV: pouca dissociação.....	55
- Alta pressão e baixa temperatura em TMV: dissociação sem desnaturação.....	56
- Alta pressão em presença de uréia: dissociação <i>versus</i> desnaturação.....	59
BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE FIGURAS

1	Representação esquemática do TMV e da proteína capsídica.....	11
2	Esquema do sistema de pressão hidrostática.....	15
3	Esquema da câmara de pressão em corte lateral.....	15
4	Sonda de Fluorescência Bis-(8-anilinaftaleno-1-sulfonato) (Bis- ANS).....	20
5	Imagens de microscopia eletrônica do TMV nativo de diferentes purificações.....	27
6	Efeito de pressão e baixa temperatura no espalhamento de luz do TMV.....	29
7	Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV.....	30
8	Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de emissão de fluorescência do TMV.....	31
9	Gráfico de van't Hoff do TMV a 2,5 kbar.....	32
10	Efeito da pressão na dissociação do TMV expresso na forma logarítmica $\ln k_d$	33
11	Espectros de emissão de fluorescência do Bis-ANS.....	34
12	Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de emissão de fluorescência do Bis-ANS no TMV.....	35
13	Gel filtração do TMV.....	37
14	Imagens de microscopia eletrônica do TMV aproximadamente 24 horas depois de incubado a 2,5 kbar e -18°C.....	38
15	Imagem de microscopia eletrônica do TMV 4 dias após incubação a 2,5 kbar e -19°C.....	39
16	Imagem de microscopia eletrônica do TMV 6,5 meses após incubação a 2,5 kbar e -18°C.....	40
17	Imagens de microscopia eletrônica do TMV aproximadamente 6 horas depois de incubado a 2,5 kbar e 25 °C.....	41
18	Efeito de pressão e uréia no espalhamento de luz do TMV.....	44
19	Efeito de pressão e uréia no espectro de emissão de fluorescência do TMV.....	45
20	Efeito da pressão na dissociação do TMV em diferentes concentrações de uréia expresso na forma logarítmica $\ln k_d$, ou $\ln k_p$	46

21	Efeito da pressão na desnaturação do TMV em uréia 2,5 M expresso na forma logarítmica $\ln k_{des}$	47
22	Gel filtração do TMV.....	50
23	Imagens de Microscopia eletrônica do TMV em uréia 2,5 M a pressão atmosférica e 25 °C.....	51
24	Imagens de microscopia eletrônica do TMV em uréia 2,5 M, aproximadamente 5 dias após incubação a 2,5 Kbar e 25 °C.....	52
25	Imagem de microscopia eletrônica do TMV em uréia 6,0 M, aproximadamente 48 horas pós incubação a 2,5 kbar e 25 °C.....	53
26	Efeito de uréia no espectro de emissão de fluorescência do Bis-ANS no TMV.....	54

INTRODUÇÃO

O uso de pressão hidrostática é bastante eficiente para o estudo de processos que ocorrem com variação de volume. Em sistemas biológicos onde o conhecimento de interações entre moléculas é essencial, a pressão é uma ferramenta que permite variar continuamente distâncias intermoleculares podendo fornecer novas informações sobre o sistema. Além disso, a introdução de fatores químicos e físicos adicionais à utilização de alta pressão, tais como composição do solvente e mudança de temperatura, pode enriquecer ainda mais as investigações dos processos dependentes de variação de volume (Silva & Weber, 1993).

A associação de proteínas é de grande importância para o estabelecimento e regulação de processos biológicos, estando presente por exemplo em enzimas alostéricas, ribossomos, proteínas de defesa, algumas proteínas carreadoras, capsídeos virais, entre outros. Em cada um destes sistemas, a associação em agregados suscita o aparecimento de propriedades que não estão presentes nas unidades proteicas separadas. No caso de estruturas virais, o material genético do vírus pode ser protegido e liberado no tempo e local apropriado graças ao elevado grau de interação entre as subunidades do capsídeo viral.

O uso de pressão hidrostática fornece um método de induzir a dissociação reversível de proteínas oligoméricas em concentrações suficientemente altas de forma a se poder acompanhar este processo através de inúmeras técnicas espectrofotométricas (Silva & Weber, 1988; Bonafé e cols., 1991; Silva & Weber, 1993) e de transporte de massa. Outros dados sobre o estado de agregação podem ser obtidos através de eletroforese e de gel filtração em HPLC como também dados morfológicos por microscopia eletrônica (Frossard, 1982; Lamy & Maaroufi, 1993).

Um dos fenômenos observados através dessa técnica levou à elaboração de uma nova teoria sobre a associação das subunidades, denominada 'deriva conformacional' que consiste na diminuição da afinidade entre as subunidades quando estas estão separadas, seja por pressão, por diluição ou baixa temperatura. Outro aspecto recentemente

descoberto através da indução da dissociação de proteínas oligoméricas por pressão é a heterogeneidade quanto à energia livre de associação em proteínas com muitas subunidades, ao contrário do observado em proteínas diméricas. Esse aspecto explica a falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão para proteínas de muitas subunidades (Silva & Weber, 1988; Ruan & Weber, 1989; Silva e cols., 1989; Silva & Weber, 1993; Foguel e cols., 1995).

O efeito de alta pressão no Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV) em extratos de plantas infectadas foi estudado há várias décadas por Giddings e cols. (1929), que mostraram que até 5 kbar não ocorreu inativação, entretanto o TMV foi completamente inativado a 9 kbar. Posteriormente, Lauffer & Dow (1941) demonstraram que a inativação por pressão de TMV purificado ocorre em poucos minutos a 7,5 kbar, e que ocorre a formação de um “coágulo com presença de quantidades mínimas de fósforo” após incubação em pressão entre 6 e 8 kbar, indicando “desnaturação viral, com liberação do ácido nucleico”. A inativação ocorreu em uma velocidade muito maior que essa desnaturação observada.

Nos últimos anos tem sido utilizada alta pressão hidrostática para estudar a dissociação de diversos vírus com monitorização de medidas espectroscópicas (Silva & Weber, 1988; Da Poian e cols., 1993, 1994). Algumas propriedades observadas com proteínas oligoméricas estão presentes nesse sistema, como a deriva conformacional e a heterogeneidade quanto à energia livre de associação (Silva & Weber, 1988).

1- Pressão hidrostática e ligações intermoleculares.

A aplicação de pressão afeta as interações internas pelas alterações nas distâncias (volumes) dos componentes, enquanto que a energia total do sistema se mantém quase constante (Silva, 1993). As alterações são mais relevantes em sistemas onde ocorrem reações que envolvam diferenças nas forças intermoleculares dos produtos e reagentes solvatados. Considerações sobre o processo de solvatação são importantes. As interações de moléculas de água com cargas iônicas representam uma importante causa do

decréscimo de volume, onde ocorre o empacotamento e organização dos dipolos da água em torno de cargas iônicas. Esse fenômeno é chamado de “eletrostricção”, levando o sistema a ocupação de menor volume, em concordância com o princípio de Le Chatelier. Reações entre reagentes e produtos que levam a formação de grupos ionizáveis são altamente influenciadas pela pressão (Weber & Drickamer, 1983).

Além disso, a aplicação de pressão tende a aumentar a ionização de eletrólitos fracos em água. Este fato foi observado pela primeira vez por Fanjung, em 1894, usando medidas de condutância sobre soluções aquosas de ácido carboxílico (citação de Lown e cols., 1968).

A constante de ionização de ácidos fracos tende a aumentar à medida que se aumenta a pressão aplicada. Assim, o pH de soluções tampão aquosas varia com a pressão aplicada. No caso do tampão Tris-HCl usado nesse trabalho ocorre pequena mudança de volume e, conseqüentemente a ionização apresenta pequena dependência da pressão (Neuman e cols., 1973).

2- Termodinâmica da dissociação de proteínas. Efeito da pressão.

A variação da energia livre de Gibbs de dissociação (ΔG) de proteínas oligoméricas é relacionada com a constante de dissociação à pressão p , K_p , através de:

$$\Delta G = - R T \ln K_p \quad (1)$$

onde R é a constante universal dos gases, que é 1,9872 cal / K mol, e T é a temperatura em graus Kelvin. Por outro lado, ΔG se relaciona com a variação de entalpia (ΔH) e de entropia (ΔS) através de:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2)$$

Essa relação pode ser reescrita da seguinte maneira:

$$\Delta G/T = \Delta H (1/T) - \Delta S \quad (3)$$

que é conhecida como equação de van't Hoff (Weber, 1995). Fazendo-se um gráfico de valores de $\Delta G/T$ em função de $1/T$, o coeficiente angular corresponde a ΔH e o coeficiente linear a $-\Delta S$.

A dissociação de proteínas ocorre com variação negativa de volume (ΔV), sendo portanto favorecida pela alta pressão. A constante de dissociação à pressão p , K_p , e à pressão atmosférica, K_{atm} , são relacionados através da equação:

$$K_p = K_{atm} \exp(p\Delta V^0/RT) \quad (4)$$

onde p é a pressão (em bar) e ΔV^0 é a variação de volume padrão de associação (em ml/mol). Rigorosamente, ΔV^0 é dependente da pressão devido à diferença de compressibilidade entre a proteína e sua forma dissociada. Entretanto a compressibilidade de proteínas é muito pequena e dificilmente ocorreria uma variação significativa relacionada com o estado de agregação. Assim, podemos considerar ΔV^0 independente da pressão como boa aproximação (Ruan & Weber, 1988). A equação (4) expressa na forma logarítmica lineariza a relação, permitindo o cálculo de K_{atm} e ΔV através do gráfico $\ln K_p$ em função de p :

$$\ln K_p = \ln K_{atm} + p\Delta V^0/RT \quad (5)$$

Introduzindo a definição de grau de dissociação à pressão p , α_p , para uma proteína que se dissocia em n subunidades



a constante de dissociação k_p é

$$K_p = [X]^n / [X_n] \quad (7)$$

assim tem-se que

$$[X] = n \cdot \alpha_p \cdot C \quad (8)$$

e

$$[X_n] = C - \alpha_p \cdot C = C (1 - \alpha_p) \quad (9)$$

onde C é a concentração da proteína total. Podemos expressar K_p utilizando (8) e (9):

$$K_p = n^n (\alpha_p)^n C^{n-1} / (1 - \alpha_p) \quad (10)$$

Substituindo K_p em (5) tem-se

$$\ln [n^n (\alpha_p)^n / (1 - \alpha_p)] = p \Delta V^0 / RT + \ln (K_{atm} / C^{n-1}) \quad (11)$$

Colocando-se em forma gráfica $\ln [(\alpha_p)^n / (1 - \alpha_p)]$ em função de p , pode-se calcular o ΔV^0 pela inclinação do gráfico e o K_{atm} pelo intercepto no eixo y (Silva e cols., 1986; Ruan & Weber, 1988).

Quando é possível estabelecer uma correlação entre mudanças no espectro de emissão de fluorescência e dissociação, pode-se considerar o grau de dissociação “ α ” como:

$$\alpha_p = [1 + Q (\langle v_p \rangle - \langle v_f \rangle) / (\langle v_i \rangle - \langle v_p \rangle)]^{-1} \quad (12)$$

onde Q é a razão de rendimento quântico de fluorescência entre a molécula dissociada e a associada, v_p é o centro de massa espectral a pressão p , e $\langle v_f \rangle$ e $\langle v_i \rangle$ são os valores de número de ondas correspondentes respectivamente à forma dissociada e à forma associada (Silva e cols., 1986).

Para agregados de alto peso molecular que se dissociam em subunidades significativamente menores, é possível monitorar o espalhamento de luz Rayleigh em soluções diluídas de proteína, pois a intensidade de espalhamento de luz a 90° (I_{90}) é proporcional à massa molecular média (M_a).

$$I_{90} \propto M_a \quad (13)$$

Assim, o grau de dissociação α_p pode ser relacionado à intensidade de espalhamento de luz à pressão p , S_p , pela seguinte equação:

$$\alpha_p = (S_I - S_p) / (S_I - S_F) \quad (14)$$

onde S_F e S_I são, respectivamente, a intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada e associada (Silva e cols., 1989).

A curva de dissociação por pressão de proteínas apresenta muitas vezes histerese, sendo que o retorno gradativo à pressão atmosférica mostra, a cada valor de pressão, um maior grau de dissociação comparado à curva ascendente (de 1 a 2.500 bar) (Xu & Weber, 1982; Silva e cols., 1986; Weber, 1986). Esse fenômeno parece se relacionar à exposição da interface proteína-proteína ao solvente, que induz mudanças conformacionais levando à diminuição da afinidade entre subunidades. Outra evidência desse fenômeno é que a indução de dissociação por pressão de enzimas diméricas mostra perda de atividade enzimática parcial ou completa após retorno à pressão atmosférica apesar da imediata

reassociação das subunidades. A atividade enzimática pode ser recuperada com o tempo. Aparentemente a mudança conformacional correspondente a esta alteração funcional sofre reversão através do retorno do contato proteína-proteína das interfaces entre subunidades. Isso foi observado, por exemplo, para o dímero β_2 da triptofano sintase (Silva e cols., 1986). Em tetrâmeros, a recuperação da atividade enzimática é muito menor que nos dímeros e altamente dependente da temperatura. Se a lactato desidrogenase ou a gliceraldeído fosfato desidrogenase for submetida a um ciclo de compressão e descompressão a 20 °C, a atividade enzimática diminui, sendo recuperada após 1 ou 2 horas. Porém se tal ciclo for feito a 0 °C a enzima se mantém inativa enquanto é mantida nesta temperatura, e retorna a uma completa atividade depois de um período a 20 °C. A mudança conformacional parece depender de um período de tempo suficientemente longo da proteína no estado associado, que ocorre em temperaturas mais elevadas (Weber, 1991).

Muitos estudos indicam que os intermediários do enovelamento são encontrados quando amostras são submetidas a alta pressão hidrostática. Estes intermediários apresentam uma forma compacta, denominada "molten globule", que apresenta uma estrutura secundária semelhante à nativa, porém com uma estrutura terciária desordenada (Creighton, 1990; Silva, 1993; Silva e cols., 1996).

Este tipo de observação já foi feita em proteínas multiméricas como o repressor Arc, uma pequena proteína dimérica que se liga ao DNA. A dissociação pode ser obtida apenas pela diluição, ou também pela aplicação de alta pressão hidrostática (Silva e cols., 1992).

O efeito de agentes químicos ou físicos conjuntamente à alta pressão hidrostática em proteínas pode ser estudado, como veremos em seguida, com a presença de uréia ou em temperaturas abaixo de 0 °C.

3-Efeito de uréia e pressão em proteínas.

Uréia em altas concentrações tende a promover importantes mudanças na estrutura de proteínas. O mecanismo envolvido ainda não está claro, porém pode envolver interação uréia - cadeia polipeptídica, ou solubilização de grupamentos laterais não polares, especificamente grupos aromáticos. A dificuldade de testar essas hipóteses diretamente é devido ao desenovelamento de proteínas ser altamente cooperativo, com a participação de muitos intermediários diferentes (Scholtz e cols., 1995).

Concentrações subdesnaturantes de uréia em combinação com alta pressão podem promover mudanças importantes que alteram o espectro de emissão de fluorescência de resíduos de triptofano. Estudos do efeito de uréia combinado com alta pressão já foram realizados, por exemplo, no Vírus do Mosaico do Cowpea (CPMV), onde a 2,5 kbar na presença de uréia 2,5M se observou uma dissociação e desnaturação do componente "top". Esse componente, no processo de purificação, fica perto do topo em ultracentrifugação em gradiente de concentração, e é composto apenas de proteína, não contendo material genético (Da Poian e cols., 1994).

O efeito de uréia no TMV foi estudado por Stanley e Lauffer, os quais observaram que a exposição do TMV a uréia 6,0 M em tampão fosfato 0,1 M pH 7 causa redução da infectividade do vírus, acompanhada por uma diminuição na turbidez da solução (Stanley & Lauffer, 1939). Esses achados foram confirmados por Buzzel (1960). Blowers e Wilson (1982) mostraram que a degradação do TMV por uréia ocorre predominantemente na porção 5' terminal do seu RNA, a exemplo de outros agentes químicos.

4- Efeito de baixa temperatura sobre a estabilidade de proteínas.

A estrutura de proteínas pode ser perturbada através da baixa temperatura. A estabilidade de proteínas se deve a vários tipos de forças como interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, pontes salinas, forças de Van-der-Waals. Em uma recente revisão desse tema (Franks, 1995), foram propostas diferentes abordagens para o estudo do efeito

de baixas temperaturas em proteínas sem que ocorra congelamento da solução em que elas se encontram. Uma dessas propostas foi a extrapolação de $\Delta G(T)$ à temperatura abaixo de 0 °C, baseando-se em dados experimentais do efeito da temperatura entre 0 e 60 °C. Outra proposta é a adição de criossolventes para diminuição da temperatura de congelamento. Infelizmente esse procedimento desestabiliza ou estabiliza diretamente a proteína. Uma tentativa é colocar ao mesmo tempo um agente estabilizante e um caotrópico para tentar uma “compensação” dos efeitos (ex.: adição de glicerol e metanol).

A grande vantagem de se estudar estruturas proteicas a baixa temperatura sob alta pressão é que esta não altera significativamente a estrutura terciária das proteínas, até 3 kbar (Silva & Weber, 1993), e ao mesmo tempo leva ao abaixamento da temperatura de congelamento, permitindo, a 2,2 kbar, atingir-se até pelo menos -20 °C (Silva e cols., 1996).

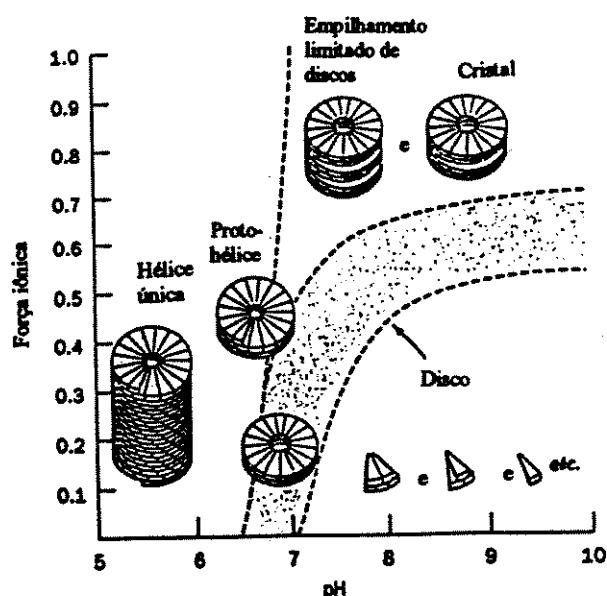
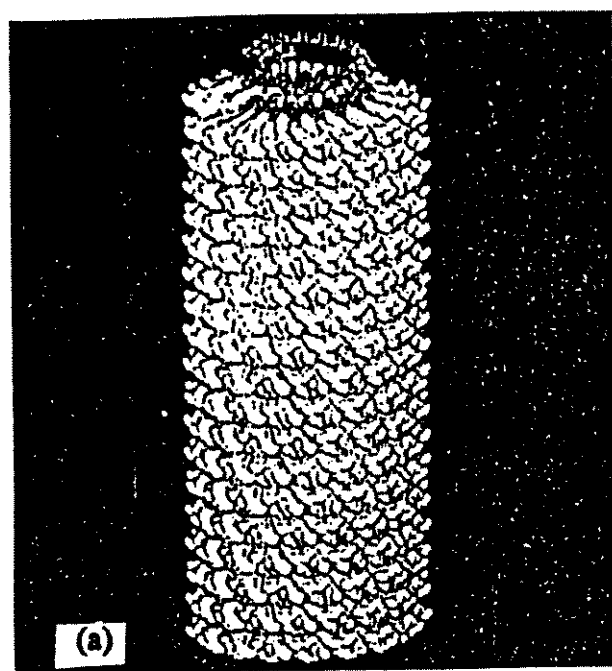
Sabe-se que certas proteínas oligoméricas como a lactato desidrogenase são inativadas a 4 °C (King & Weber, 1986a), ou em alta pressão. King & Weber (1986b) propuseram um mecanismo similar de inativação que ocorreria pela presença de um ciclo de dissociação, desvio conformacional e reassociação a tetrâmeros inativos. Agregados maiores como o Vírus do Mosaico do Cowpea (CPMV) submetido a baixa temperatura em alta pressão (-15 °C, 2,5 kbar) mostrou decréscimo de espalhamento de luz (cerca de 6 vezes), na qual ocorre liberação do RNA e dissociação. No retorno à temperatura ambiente, a intensidade do espalhamento não voltou ao valor inicial, e gel filtração em HPLC mostrou a presença de agregados menores (Da Poian e cols., 1995).

Por outro lado, proteínas diméricas tendem a retornar à conformação inicial e à sua atividade original mais rapidamente que agregados maiores, após incubação em alta pressão ou baixa temperatura. Provavelmente isso se deve à maior simplicidade estrutural (interface proteína-proteína que envolve apenas duas subunidades) (Weber, 1991).

5-Estrutura e montagem do TMV.

O TMV, cuja representação esquemática é mostrada na Fig. 1, é um vírus bastante estudado que, como o seu nome sugere, produz manchas e descoloração na folha do tabaco. Este vírus, cuja massa molecular é 40.000 kDa, é um excelente modelo para estudo de montagem viral por seu fácil isolamento e manipulação. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do TMV mostram arquitetura bem definida que consiste de um cilindro de cerca de 3.000 Å de comprimento e 180 Å de diâmetro. A proteína capsídica, de 17,5 kDa e 158 resíduos de aminoácidos (Goelet e cols., 1982) está arranjada em cerca de 2.130 subunidades, formando uma hélice de 16 e 1/3 de subunidades por volta, com um canal interno. O material genético consiste em uma fita simples positiva de RNA, com 6.400 nucleotídeos, 2.000 kDa, enovelado internamente ao capsídeo proteico formando uma hélice na qual cada subunidade proteica se liga a 3 nucleotídeos.

PARTÍCULA VIRAL



(b)

PROTEÍNA CAPSÍDICA

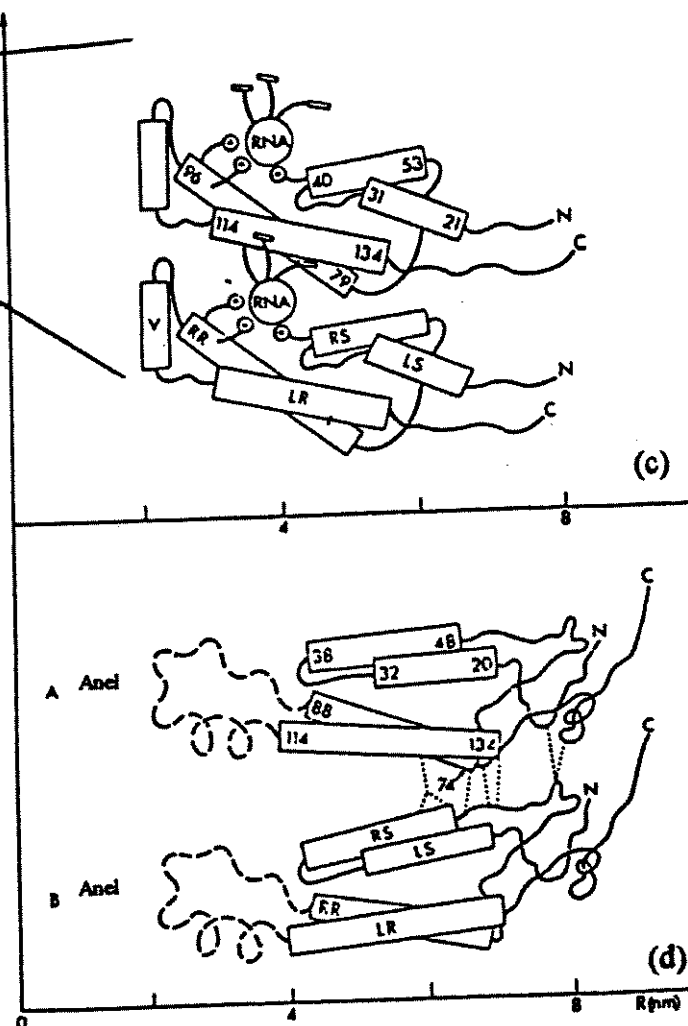


Figura 1: Representação esquemática do TMV e da proteína capsídica.

Partícula viral (a), Tipos de arranjo da proteína capsídica em diferentes condições de pH e força iônica (b), Estrutura terciária por dados de Cristalografia de Raio X, do TMV nativo (c), e da proteína capsídica (d). (Hirth & Richards, 1981).

A proteína capsídica, facilmente isolável, apresenta polimerização em diferentes estruturas, altamente dependente de condições de pH e força iônica, como pode ser observado na Fig. 1b. Assim, em pH 8 e alta força iônica, a proteína capsídica forma uma estrutura cristalina com discos duplos (17 subunidades por disco) agregados em camadas, em número limitado, com coeficientes de sedimentação de 27 S, 37 S ou mais. Em pH 7 e baixa força iônica, também formam-se discos duplos de 20 S que não se agregam. Em pH acima de 7 e baixa força iônica a proteína se apresenta com pequena agregação, encontrando-se monômeros, talvez dímeros, trímeros e, em menor porcentagem, agregados maiores. Em pH abaixo de 7 e baixa força iônica, a proteína capsídica se associa formando longas hélices, estrutura semelhante à proteína capsídica do vírus nativo. Em pH = 7 e “média” força iônica são observadas apenas proto-hélices, com 39 ± 2 subunidades, similar à estrutura das longas hélices mencionadas acima. É interessante notar que em pH = 7 e baixa força iônica, condições que se assemelham às fisiológicas, a proteína capsídica forma hélice somente na presença do RNA viral (Klug, 1972; Hirth & Richards, 1981). A estrutura terciária do capsídeo proteico separado do RNA viral apresenta quatro regiões em α -hélice, e na partícula viral ocorre uma α -hélice adicional devido a mudanças conformacionais que incluem interação de aminoácidos básicos com o RNA viral (Fig. 1c e d).

A associação do RNA viral e da proteína capsídica pode ser descrita em duas etapas: nucleação e alongamento. A primeira é dependente de sequência específica de RNA, assim como requer a formação de um agregado proteico de 19-20 S, identificado como uma hélice com pouco mais de 2 voltas, com 16 e 1/3 de subunidades por volta. O alongamento, continuação do processo, parece depender da adição de proto-hélices, às quais o RNA se liga internamente, acompanhando a estrutura helicoidal (Hirth & Richards, 1981; Raghavendra e cols., 1988).

OBJETIVOS

A presente dissertação tem como objetivo central o estudo da termodinâmica da interação proteína-proteína do TMV, utilizando alta pressão hidrostática. Essa ferramenta utilizada como fonte de perturbação do meio, como anteriormente mencionado, não altera diretamente a estrutura terciária da proteína, ocorrendo no entanto a deriva conformacional das subunidades quando dissociadas (Weber, 1986; Silva e cols., 1986). O fenômeno de deriva conformacional e as condições que a influenciam são de interesse, pois podem ter implicações na organização do vírus completo (subunidades proteicas e RNA).

Na presente tese foram estudados os efeitos de alta pressão hidrostática combinados com baixa temperatura, ou na presença de uréia.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Reagentes.

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q. Os experimentos foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, salvo se mencionado as condições. O tampão Tris foi escolhido devido à pequena dependência de seu pKa em função da pressão (Neuman e cols., 1973).

2- Equipamento de Alta Pressão Hidrostática e Termodinâmica da Dissociação por Pressão.

A pressão hidrostática foi aplicada em amostras através de um sistema constituído por uma câmara e um gerador de pressão (figuras 2 e 3).

A câmara de pressão apresenta três janelas ópticas de quartzo, através das quais foram realizadas medidas espectroscópicas da amostra a pressões de até 2500 bar. Essa pressão limite é devida a tolerância máxima das referidas janelas. No interior da câmara coloca-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com capacidade de cerca de 1,2 ml que contém a amostra a ser submetida a alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta é selada com um tubo de polietileno cuja extremidade é fechada por aquecimento. 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 e por possuir índice de refração próximo ao do quartzo, minimizando a perda de sinal nas medidas espectroscópicas. A unidade geradora de pressão é constituída por um pistão operado manualmente que injeta etanol através de dutos metálicos até a câmara. A medida de pressão é realizada por um manômetro analógico (Paladini, 1980; Paladini & Weber, 1981).

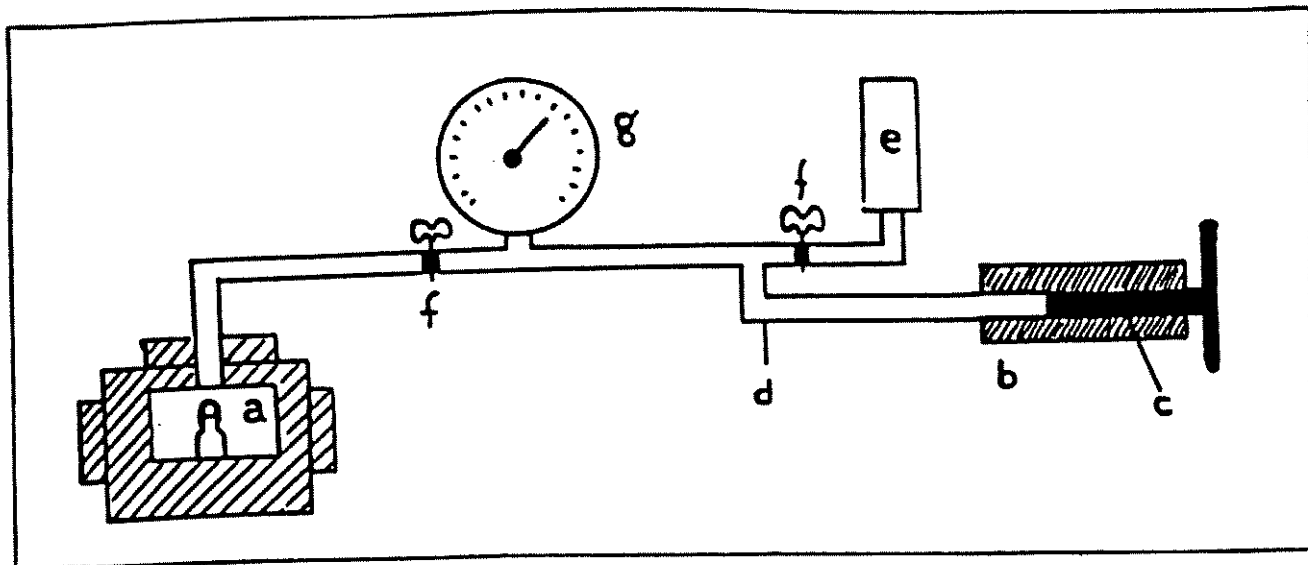


Figura 2: Esquema do sistema de pressão hidrostática. Câmara (a), conectada ao gerador de pressão (b), com o pistão (c) que comprime a linha de etanol (d). Reservatório de etanol (e), válvulas (f) e manômetro (g). (Figura baseada em Suarez, 1995).

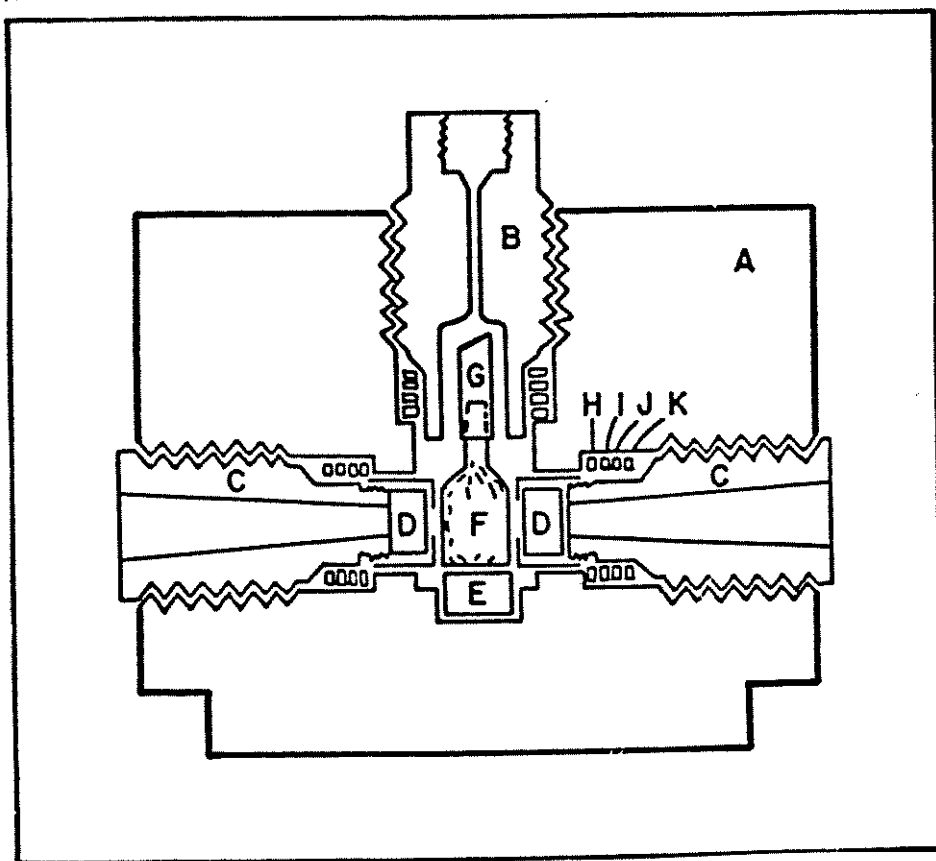


Figura 3: Esquema da câmara de pressão em corte lateral.

Câmara de pressão (A), entrada da linha de etanol que comunica com o gerador de pressão (B), suportes que retêm a janela de quartzo (C), janelas de quartzo (D), base suporte para cubeta (E), cubeta de quartzo que recebe a amostra a ser submetida à pressão (F), tubo de polietileno que sela o material contido no interior da cubeta e permite a equalização da pressão interna com a externa à cubeta (G), anel extrator (permite a extração dos anéis de vedação quando necessária a troca) (H), anéis de vedação (I), (J) e (K).

3- Obtenção e purificação do TMV.

Sementes de uma variedade de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), suscetível à infecção por TMV, foram colocadas em sementeira, e após obtenção de plantas com aproximadamente 3 cm (cerca de 2 semanas), procedeu-se o transplante em vasos para posterior crescimento. Após cerca de 2 semanas, as plantas foram infectadas com TMV através de contato de inóculo com folhas previamente lesadas, permitindo crescimento da planta até as folhas atingirem tamanho ótimo (o que ocorre em cerca de 4 semanas). É possível observar a lesão em mosaico devido ao TMV em poucos dias pós-infecção. As folhas inferiores, maiores, foram coletadas, e após lavagem, enxugadas e pesadas, estocando-se a - 70 °C.

A purificação do TMV foi iniciada através de imersão das folhas em nitrogênio líquido para melhor rompimento das células. Foi utilizado o método de purificação descrito por Asselin e Zaitlin (1978) ("Método PEG - Celite - Triton X-100 - Fosfato"), com algumas adaptações. Manteve-se o material a cerca de 4 °C, exceto quando mencionada outra condição. As folhas foram homogeneizadas por 4 min em um liquidificador usando alta velocidade, em solução 0,5 M de Na_2HPO_4 em Na-ascorbato 0,5% (m/v), 1,3 ml/g de tecido fresco. O homogenato foi passado através de filtro de nylon, clarificando-se com celite, 5 g/100 ml do extrato, centrifugando-se a 10.000 g por 30 min. A fração do sobrenadante foi passada através de filtro de nylon, submetendo-se a precipitação com polietilenoglicol 6.000 e NaCl, respectivamente a uma concentração final de 3% e 1%, através de lenta adição de solução de polietilenoglicol/NaCl quatro vezes mais concentrada (portanto 12% e 4% respectivamente). O extrato foi agitado por 10 min, deixado 20 min no gelo, e centrifugado a 10.000 g por 30 min. O precipitado foi ressuspense em um quarto do volume original com Na_2HPO_4 0,01 M e Na-ascorbato 0,01% (m/v), e submetido a outra clarificação, precipitação e ressuspensão nas mesmas condições. Centrifugou-se a solução a 10.000 g por 15 min, adicionando-se ao sobrenadante triton X-100, levando-se a uma concentração final de 5 % (v/v). A solução foi submetida a agitação por 10 min, deixando-se então 20 min à temperatura ambiente,

centrifugando-se em seguida a 90.000 g por 2 h em gradiente descontínuo de sacarose (60% e 20%). A fração de TMV foi coletada na interface entre 60 e 20% de sacarose, sendo dialisada contra solução de EDTA 1 mM, pH 7,2, e depois contra tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,0. A solução foi então submetida à centrifugação a 10.000 g por 10 min, incubando-se o sobrenadante a 37 °C por 4 h. O vírus foi sedimentado novamente em gradiente descontínuo de sacarose nas mesmas condições, dialisando-se a fração viral contra EDTA 1 mM, pH 7,2. Centrifugou-se a solução a 10.000 g por 10 min, estocando-se o TMV a 4 °C em presença de azida sódica 0,01 g%.

A concentração viral foi determinada através do espectro de absorção entre 240 e 300 nm, particularmente utilizando-se a diferença de absorbância entre 260 nm e 290 nm ($\epsilon_{0,1\% \text{ 260 nm}} - \epsilon_{0,1\% \text{ 290 nm}} = 1,3$) (Noordan, 1973, pag. 93-95).

4- Microscopia Eletrônica.

Foi realizada em um microscópio eletrônico modelo ZEISS CEM - 902. A microscopia eletrônica de transmissão do TMV foi feita utilizando-se como contrastante negativo acetato de uranila 1%.

Utilizou-se grades de cobre revestidas com um filme de carbono, nas quais foram colocadas 5 µl de suspensão por grade, com amostras de soluções de TMV de cerca de 0,1 mg/ml. Após 4 minutos as grades foram tratadas com solução de acetato de uranila 1% (Raghavendra e cols., 1986).

5-Estudos de Fluorescência Sob Pressão.

Os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro SLM AMINCO SPF - 500C. Este tipo de fluorímetro não permite a adaptação da câmara de pressão no seu interior. Assim, foram utilizados cabos de fibras ópticas de quartzo para permitir a excitação e leitura da fluorescência emitida pela amostra contida no interior da câmara. Além disso, o fluorímetro e a câmara de pressão foram cobertos com feltro preto

com o objetivo de isolar o caminho óptico, entre o fluorímetro e a amostra, do meio externo e impedir a entrada de luz espúria no interior do aparelho.

De modo geral o estado de agregação de uma proteína pode ser monitorizado acompanhando-se fluorescência intrínseca devido a resíduos aromáticos, principalmente triptofano. A exposição desses aminoácidos ao solvente polar no processo de dissociação desvia o espectro de emissão para o vermelho (Silva & Weber, 1988). Nos experimentos realizados utilizou-se $\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$ e λ_{em} entre 300 e 400 nm.

Os espectros de fluorescência à pressão p são processados para obtenção do centro de massa ν_p do espectro (Silva e cols., 1986). É fundamental a conversão do espectro de comprimento de onda para número de ondas, pois o último é diretamente proporcional à energia associada ao fóton.

A importância em caracterizar os desvios espectrais através do centro de massa, e não às mudanças na emissão máxima se deve ao fato de que em sistemas heterogêneos, como os vários fluoróforos intrínsecos de uma proteína, deslocamentos consideráveis de centro de massa podem ocorrer com mudanças na emissão máxima muito pequenas.

As medidas de espalhamento de luz objetivaram a monitorização do estado de agregação do TMV sobre pressão. O espalhamento de luz Rayleigh é uma técnica excelente para detectar a dissociação de agregados de alta massa molecular. Como mencionado anteriormente, pode-se assumir que a intensidade de luz espalhada é proporcional à massa molecular média (M_d) para soluções diluídas de proteína (Silva e cols., 1989), equação (13) e (14). Nos experimentos o comprimento de onda utilizado foi de 350 nm.

6- Espectros de Fluorescência do Bis-ANS.

Para monitorização de fluorescência extrínseca utilizou-se o fluoróforo bis-ANS (bis-(8-anilinaftaleno-1-sulfonato)), cuja estrutura é mostrada na Fig. 4. Esta sonda é muito utilizada para observar mudanças conformacionais em proteínas (Horowitz e cols., 1984). Ela se liga não covalentemente a bolsões hidrofóbicos de segmentos apolares em proteínas, e nas proximidades de cargas positivas devido aos seus grupos sulfonatos. Esta interação pode ser acompanhada através de grande aumento na intensidade de fluorescência (Rosen & Weber, 1969; Silva e cols., 1992; Da Poian e cols., 1994). Nos experimentos realizados utilizou-se $\lambda_{exc} = 360$ nm e λ_{em} entre 420 e 650 nm.

7- Gel Filtração em Cromatografia Líquida de Alta Performance.

Foi utilizada essa técnica para avaliar o estado de agregação do TMV incubado em alta pressão em várias condições experimentais. Utilizou-se coluna Synchropak, Inc. (Linden, IN), GPC 1000, com fluxo de 0,3 ml/min, monitorizando a eluição da amostra com absorbância a 280 nm. Considerou-se o volume de exclusão da coluna (V_0) como o volume de eluição do TMV nativo, e o volume total (V_t) foi determinado utilizando ADP.

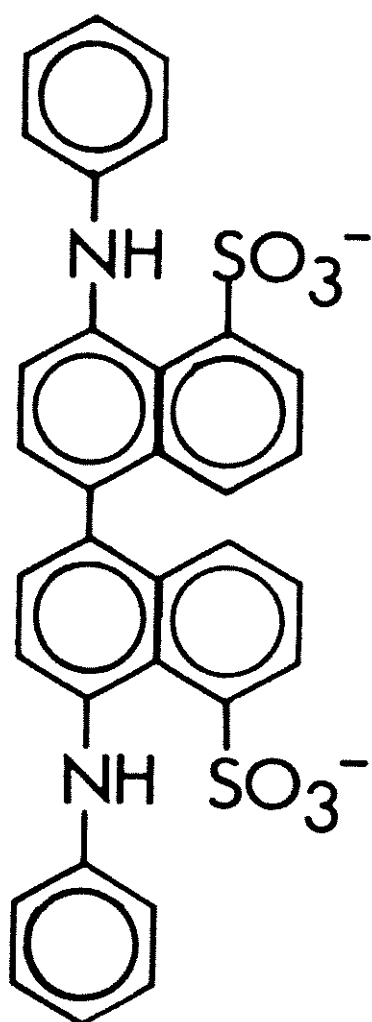


Figura 4 : Sonda de Fluorescência Bis-(8-anilino-1-naftaleno-1-sulfonato) (Bis-ANS).

RESULTADOS

Realizou-se três purificações distintas de TMV, obtendo-se vírus cuja concentração variou entre 25 e 50 mg/ml. A Fig. 5 mostra imagens de microscopia eletrônica dessas preparações. Observa-se que o TMV manteve seu aspecto cilíndrico normal e não houve fragmentação significativa do vírus. Posteriormente será mostrado controle da amostra por gel filtração (Fig. 13A).

- Efeito de pressão hidrostática e baixa temperatura sobre o TMV.

Estudou-se o efeito da pressão sobre o TMV (concentração de 1 mg/ml em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) através de incubação em valores crescentes de pressão (até 2,5 kbar) por 10 minutos antes das medidas espectroscópicas.

O espalhamento de luz a 90° (Rayleigh) apresentou pequeno decréscimo de intensidade com a pressão (cerca de 18%), indicando discreto processo de dissociação da partícula viral até 2,5 kbar. Nesta pressão a solução se mantém no estado líquido até cerca de -20°C (Silva e cols., 1996). O abaixamento de temperatura da amostra até -18°C levou a adicional queda de 54%, correspondente, portanto, a processo de dissociação bem maior, com o máximo ocorrendo abaixo de -5°C . O retorno da temperatura a 25°C e o subsequente retorno à pressão atmosférica não promoveu recuperação na intensidade de espalhamento, indicando reassociação não significativa nessas condições experimentais (Fig 6). O grau de dissociação máximo em baixa temperatura pode ser considerado 72% ($\alpha = 0,72$) baseando-se em experimentos utilizando alta pressão em presença de uréia, onde ocorre uma diminuição de espalhamento de luz bem menor, como será mostrado posteriormente (Fig. 18). A obtenção do valor de α em baixa temperatura foi, portanto, relacionada a esses resultados, através de normalização em uma cubeta de quartzo convencional em relação à intensidade de espalhamento de luz, experimento mostrado na Fig. 18, inclusão. A utilização cubeta convencional, e não a cubeta cilíndrica que fica dentro da câmara de pressão, é necessária para a comparação das intensidades de espalhamento de luz (ou de fluorescência), pois o último sistema é sujeito a variações de posição da câmara de pressão e da cubeta dentro da câmara, visto que o fluorímetro

utilizado não permite a adaptação da câmara de pressão no seu interior, o que inviabiliza essa comparação.

O estudo do espectro de emissão de fluorescência (Fig. 7) indicou desvio pequeno para o vermelho tanto no aumento de pressão quanto na fase de abaixamento da temperatura até -18°C . Esse comportamento indica que embora a dissociação observada por espalhamento de luz tenha sido acentuada, não ocorreu processo de desnaturação importante.

A Fig. 8 mostra que a intensidade de fluorescência apresentou diminuição expressiva com a pressão, e posterior aumento em função do abaixamento de temperatura. No retorno à temperatura ambiente e, então, à pressão atmosférica, observou-se reversibilidade desse comportamento. Esses resultados sugerem que já no início do processo de dissociação ocorre supressão de fluorescência de resíduos aromáticos devido a colisões e perdas de energia por processos não radiativos, fenômeno este revertido no abaixamento de temperatura quando diminui a frequência de colisões.

O único método que permitiu o cálculo do grau de dissociação α foi o espalhamento de luz, através da equação (14). Considerando o TMV como o conjunto material genético G mais capsídeo proteico P , podemos representá-lo como $P_{2130}G$, e sua dissociação total como:



portanto ordem de dissociação de 2130. Embora a reversibilidade representada no processo possa ser contestada observando a Fig. 6, veremos posteriormente que ocorre reassociação após meses (dados de gel filtração e microscopia eletrônica, Figs. 13 e 16). Baseando-se na dissociação do TMV induzida predominantemente pelo abaixamento de temperatura na pressão de 2,5 kbar, é possível o cálculo da constante de dissociação e energia livre de dissociação nessa pressão utilizando-se, respectivamente, as equações (10) e (1), e através da equação (3), $\Delta G/T = \Delta H (1/T) - \Delta S$, a construção do gráfico de van't Hoff e cálculo da entalpia e entropia de dissociação. A Tabela 1 mostra esses cálculos baseando-se nos dados de espalhamento de luz referentes à Fig. 6, e o gráfico de van't Hoff, $\Delta G/T$ em função de $1/T$, é mostrado na Fig. 9. Considerou-se a ordem de

dissociação $n = 2130$, conforme (15), e dissociação incompleta (mencionado anteriormente), de acordo com experimentos utilizando uréia.

Tabela 1 - Cálculo dos parâmetros termodinâmicos de dissociação de TMV a 2,5 kbar induzida por abaixamento de temperatura (referente à Fig. 6).

P (kbar)	$I.LS$ (U.A.)	T (°C)	T (K)	α	$\ln kd$	ΔG (kcal K/mol)	$\Delta G/T$ (kcal/mol)	$1/T$ (1/K)
0	23329	25	298	0,000				
2,47	18307	25	298	0,217	-24193	14334,0	48,077	0,00335
2,47	17667	20	293	0,245	-23938	13944,8	47,569	0,00341
2,47	15797	15	288	0,326	-23329	13358,6	46,360	0,00347
2,47	12655	10	283	0,462	-22587	12708,9	44,884	0,00353
2,47	8987	5	278	0,621	-21957	12136,5	43,633	0,00360
2,47	7421	0	273	0,689	-21736	11798,4	43,194	0,00366
2,47	6959	-5	268	0,709	-21675	11550,0	43,073	0,00373
2,47	6771	-10	263	0,717	-21651	11321,8	43,024	0,00380
2,47	6671	-15	258	0,721	-21638	11100,2	42,999	0,00387
2,47	6649	-18	255	0,722	-21635	10969,7	42,993	0,00392

OBS: (1) $n = 2130$

(2) $C = [TMV] = 1 \text{ mg/ml} = 2,5 \times 10^{-8} \text{ M}$

(3) $\ln K_d = n \ln (n) + n \ln (\alpha) + (n-1) \ln (C) - \ln (1-\alpha)$

(4) $\Delta G = -RT \ln K_d$, onde $R = 0,0019872 \text{ kcal/K mol}$

A regressão linear do gráfico de van't Hoff resulta na reta $\Delta G/T = -17532 \text{ } 1/T + 107,05$, portanto ΔH de $-17532 \text{ kcal / mol TMV}$, e ΔS de $-107,05 \text{ kcal / (K mol TMV)}$. O cálculo por mol de subunidade dissociante resulta em ΔH de $-8,23 \text{ kcal / mol}$ e ΔS de $-50,26 \text{ cal / K mol}$. Os valores de ΔH e ΔS por subunidade são mais adequados para expressar esses parâmetros, pois a partícula viral possivelmente não se dissocia por completo, e mesmo em presença de uréia isso pode ainda ocorrer, correspondendo a valor de n menor. Supondo por exemplo um caso “extremo” de $n = 1000$, embora os valores das constantes termodinâmicas sejam bem diferentes para a partícula total, os valores de ΔH e ΔS por subunidade são muito próximos aos encontrados considerando como dissociação completa. Outro cálculo foi realizado considerando que apenas a alta pressão e baixa temperatura, Fig. 6, leva a dissociação completa do TMV, com $\alpha = 1$ a 2,5 kbar e $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Os valores de ΔH e ΔS por subunidade dissociante novamente foram muito

próximos aos obtidos considerando α máximo de 0,72. É importante enfatizar que essas duas situações não alteram praticamente os valores desses parâmetros termodinâmicos, pois se relacionam a interpretações diferentes em relação à dissociação do TMV.

Analisando mais detalhadamente os valores de ΔG obtidos para cada temperatura (Tabela 1), foi considerada a relação entre $\ln k_d$ e o grau de dissociação. Utilizando a relação (10), temos que

$$\ln K_{p,t} = n \ln n + n \ln \alpha_{p,t} + (n-1) \ln C - \ln (1 - \alpha_{p,t}) \quad (16)$$

considerando $k_{p,t}$ a constante de dissociação a determinada pressão e temperatura, e o respectivo grau de dissociação $\alpha_{p,t}$. Podemos também expressar:

$$\ln K_d = n \ln n + n \ln \alpha + (n-1) \ln C - \ln (1 - \alpha) \quad (17)$$

A Tabela 2 mostra as diferentes contribuições de cada parcela da relação (17), que contribuem para $\ln k_d$.

Tabela 2 - Cálculo de $\ln K_d$ a partir da relação
 $\ln K_d = n \ln (n) + n \ln (\alpha) + (n-1) \ln (C) - \ln (1-\alpha)$

T (°C)	T (K)	α	$n \ln (n)$	$n \ln (\alpha)$	$(n-1) \ln C$	$-\ln (1-\alpha)$	$\ln K_d$	ΔG (kcal K/mol)
25	298	0,000						
25	298	0,217	16324	-3250	-37267	0,245	-24193	14334
20	293	0,245	16324	-2995	-37267	0,281	-23938	13945
15	288	0,326	16324	-2386	-37267	0,395	-23329	13359
10	283	0,462	16324	-1644	-37267	0,620	-22587	12709
5	278	0,620	16324	-1015	-37267	0,970	-21957	12137
0	273	0,689	16324	-794	-37267	1,167	-21736	11798
-5	268	0,709	16324	-733	-37267	1,233	-21675	11550
-10	263	0,717	16324	-709	-37267	1,262	-21651	11322
-15	258	0,721	16324	-696	-37267	1,277	-21638	11100
-18	255	0,722	16324	-693	-37267	1,281	-21635	10970

OBS: (1) $C = [\text{TMV}] = 1 \text{ mg/ml} = 2,5 \times 10^{-8} \text{ M}$

(2) $\Delta G = -RT \ln K_d$, onde $R = 0,0019872 \text{ kcal/K mol}$

Como podemos observar, o valor $(n-1) \ln C$, que não varia com o grau de dissociação, é da ordem de -37.300, explicando os valores de $\ln K_d$ bastante negativos, entre -24.193 e -21.635. Finalmente, o fato da concentração molar de TMV ser extremamente reduzida, $2,5 \times 10^{-8} \text{ M}$, explica o baixo valor de $(n-1) \ln C$. Assim, apesar do grau de dissociação $\alpha = 0,722$, o ΔG é altamente não favorável, e o equilíbrio é deslocado no sentido da dissociação pelo fato da concentração ser tão baixa.

A variação de $\ln K_d$ com a pressão à temperatura constante, que pode ser denominada $\ln K_p$ indicando que é em função da pressão, pode ser calculada a partir dos resultados obtidos na Fig. 6, baseando-se na relação (16) e (5), apesar de ocorrer dissociação parcial. Do mesmo modo que se calculou o α para construção do gráfico de van't Hoff, a estimativa foi baseada através do espalhamento de luz, considerando-se 100% de dissociação em presença de uréia 6,0 M, a 2,5 kbar, Fig. 18. O valor máximo a 25 °C foi de 0,18, em 2,5 kbar. A Fig. 10 mostra esses cálculos, cujo coeficiente angular e coeficiente linear correspondem, respectivamente, a $\Delta V^0/RT$ e $\ln K_{atm}$. Assim, o cálculo de ΔV^0 (variação de volume de associação) foi de $+34.784 \text{ ml / mol TMV}$ ($R = 1,9872 \text{ cal/K mol}$, e $1 \text{ cal} = 41,2917 \text{ ml atm}$), ou $16,3 \text{ ml / mol subunidades}$, e o $\ln K_{atm}$ correspondeu a -28.026 (ou $\log K_{atm} = -12.171$, por multiplicação por $\log e$ na mudança

de base). O valor de α a 2,5 kbar de 0,22 no gráfico de Van't Hoff (2,5 kbar e 25 °C), com dissociação 4% acima, sendo mesma condição de temperatura e pressão, foi devido a uma incubação adicional de 30 minutos antes do abaixamento de temperatura.

Para melhor estudar a conformação do TMV em alta pressão e baixa temperatura, foi realizado experimento na presença da sonda fluorescente Bis-ANS (Rosen & Weber, 1969; Horowitz e cols., 1984; Da Poian e cols., 1995). Nesse caso, utilizou-se menor concentração de vírus (0,1 mg/ml). Na Fig. 11 observa-se o espectro de emissão de fluorescência do Bis-ANS em água, em solução de TMV à pressão atmosférica, e a 2,5 kbar e -15 °C. Esses espectros são referentes à Fig. 12, que mostra que a alta pressão não altera a intensidade de fluorescência do Bis-ANS. O abaixamento de temperatura de 25 °C até -15 °C, sob alta pressão, levou a maior área do espectro de emissão de fluorescência portanto, a um estado de maior interação Bis-ANS - proteína. Em temperatura ainda menor, e no retorno da temperatura até 15 °C, ocorreu menor interação Bis-ANS - proteína a níveis semelhantes ao que aconteceu no retorno à pressão atmosférica. A menor interação Bis-ANS - proteína se apresentou para a amostra nas condições iniciais a 25 °C e em níveis de pressão de até 2,5 kbar. Uma possível interpretação para esses dados é que o abaixamento de temperatura, que aumentou a interação da sonda com o TMV, pode ter promovido uma conformação mais semelhante a "molten globule", e provável interação do Bis-ANS com resíduos positivos do capsídeo que, na partícula nativa, se liga ao RNA (Rosen & Weber, 1969; Klug, 1972; Hirth & Richards, 1981).

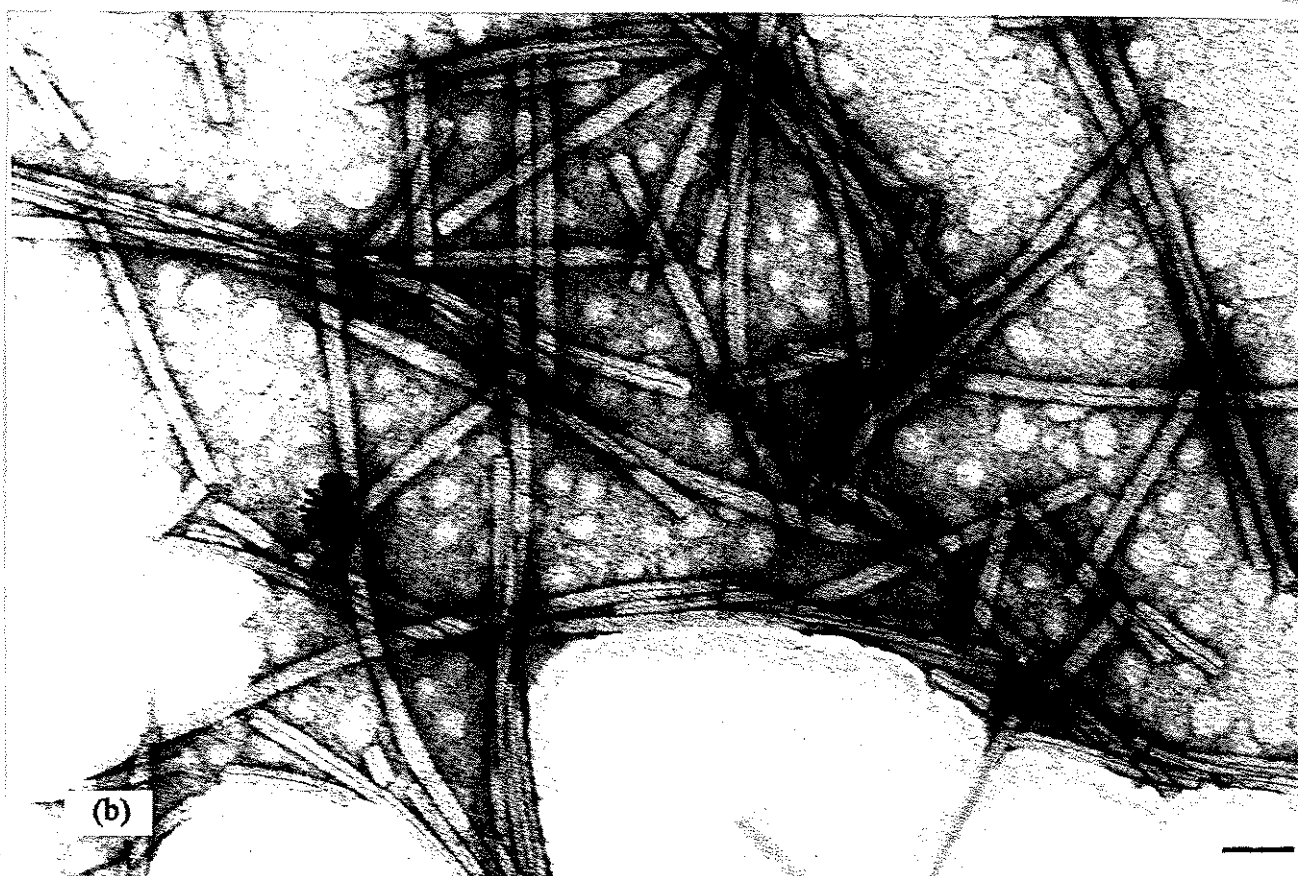
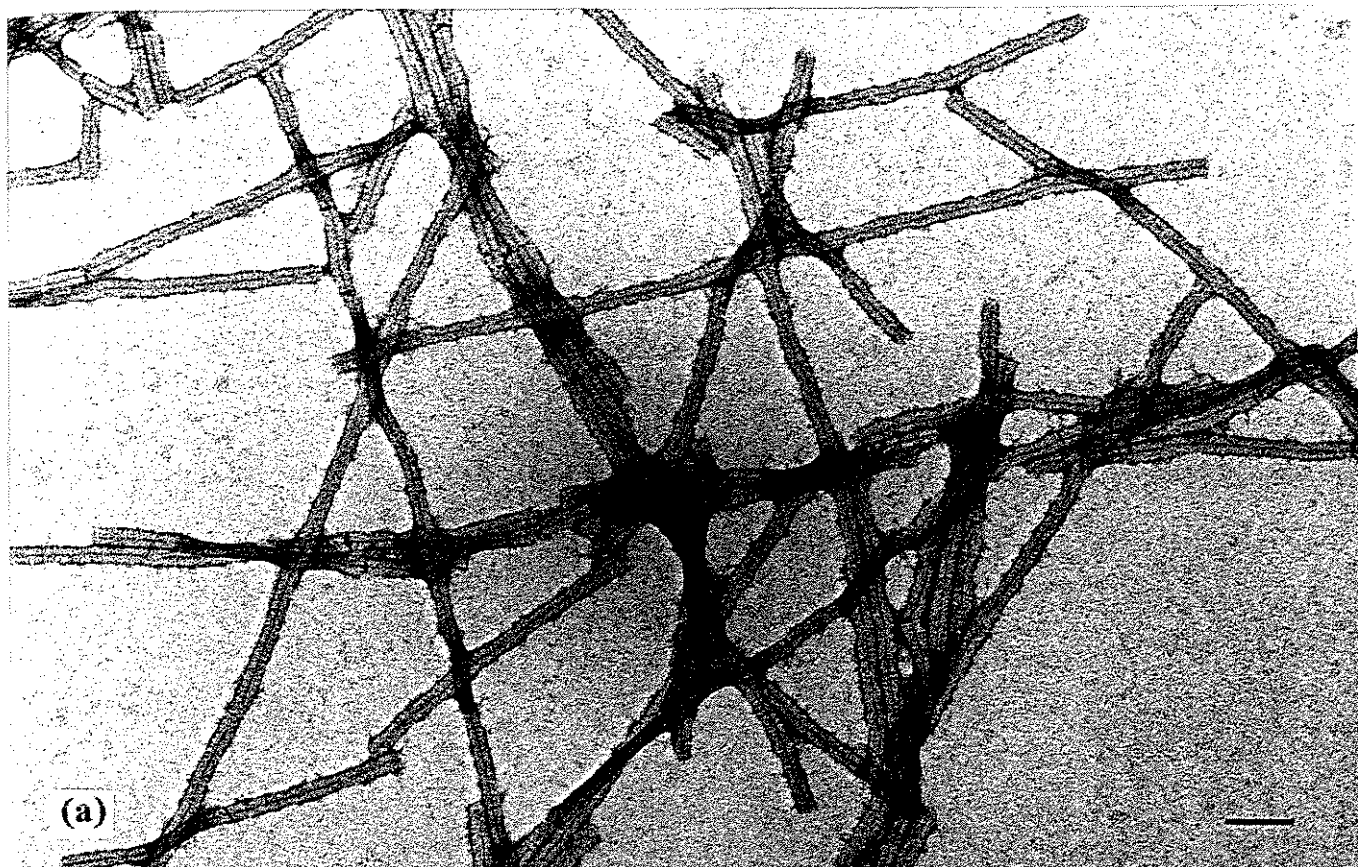


Figura 5: (A) (B) Imagens de microscopia eletrônica do TMV nativo de duas diferentes purificações.

(A) Concentração final da forma purificada de 25,8 mg/ml, e (B) de 50,9 mg/ml. Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

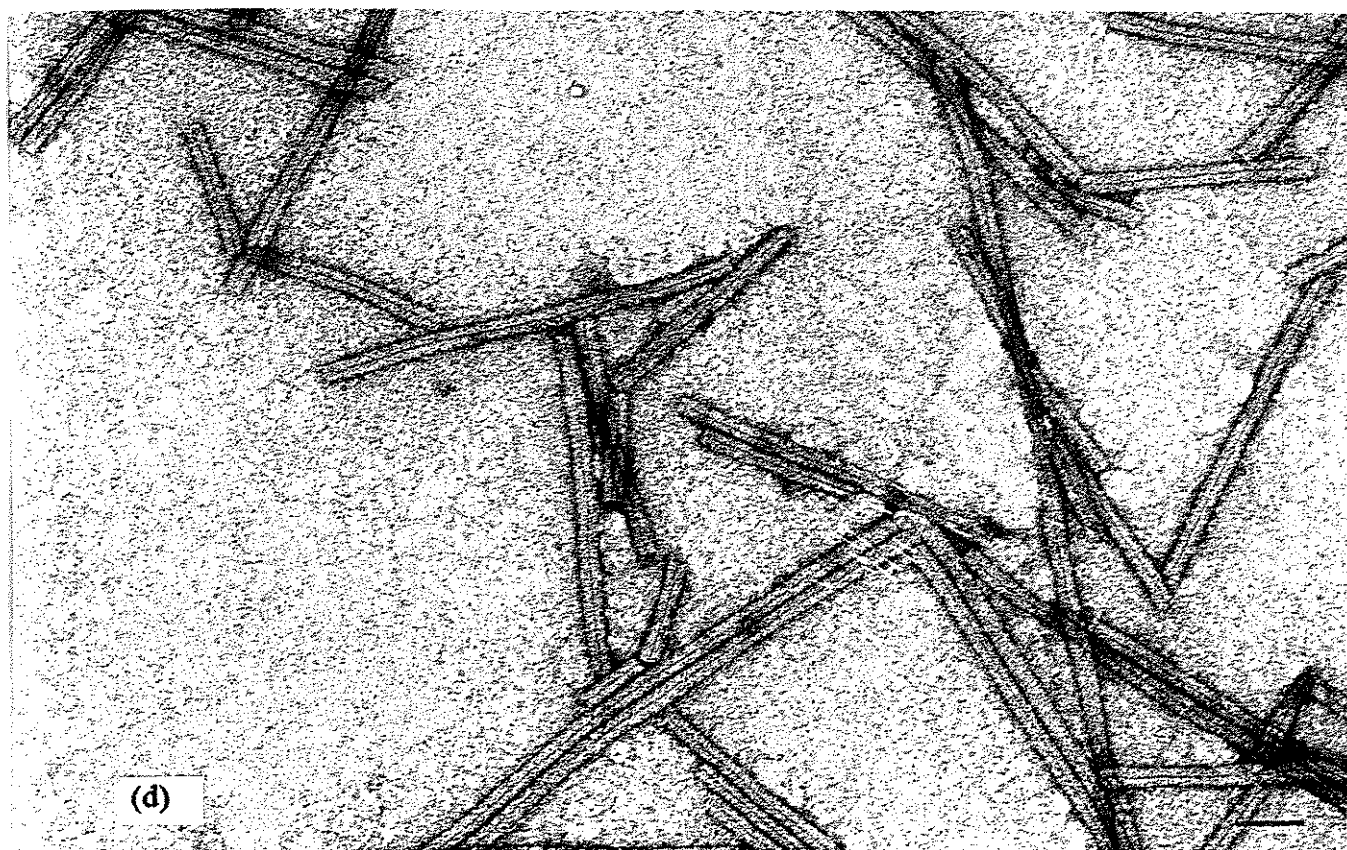
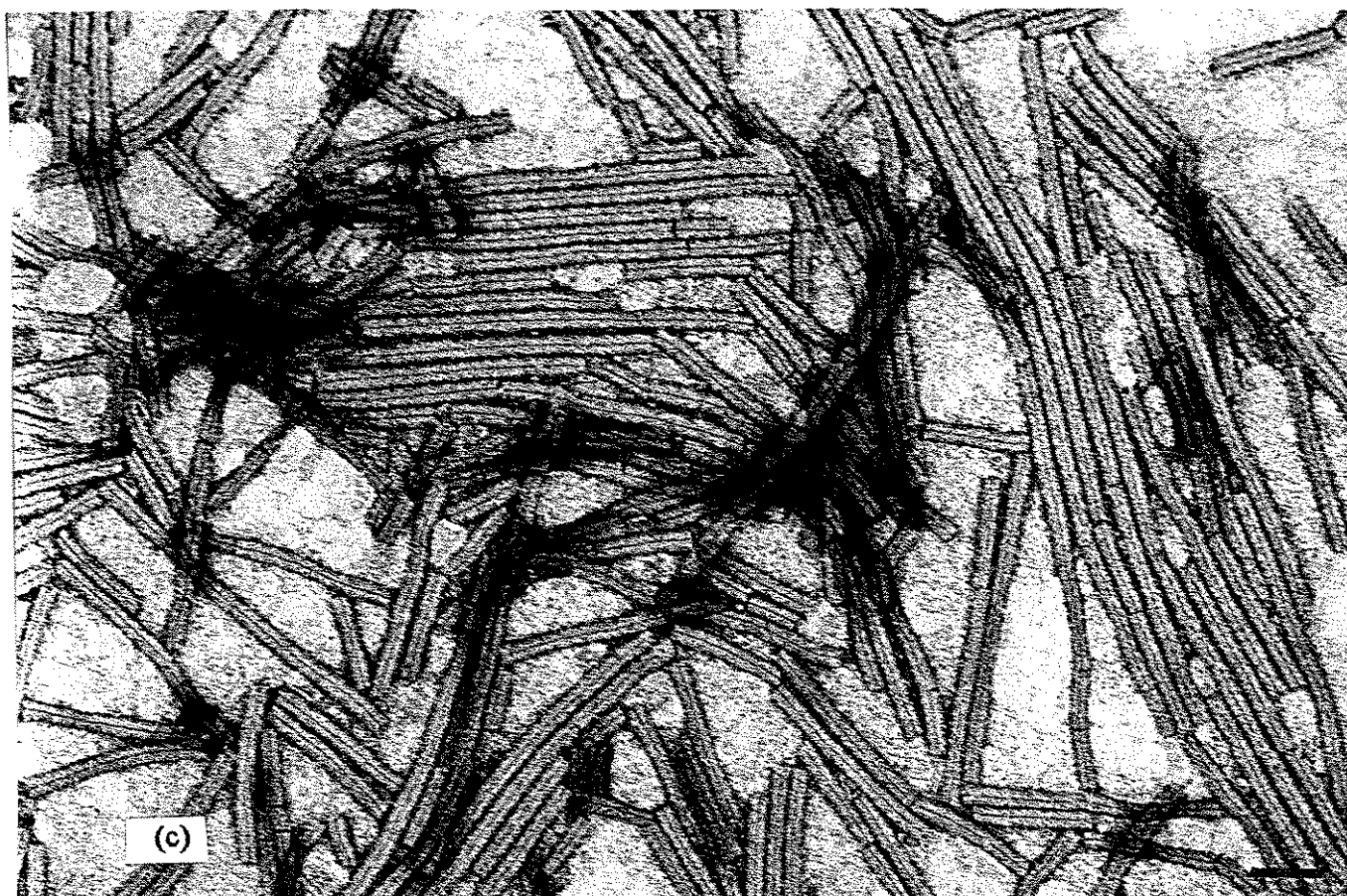


Figura 5: (C) (D) Imagens de microscopia eletrônica do TMV nativo de purificação diferente de (A) e (B). Concentração final da forma purificada de 25,2 mg/ml. Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

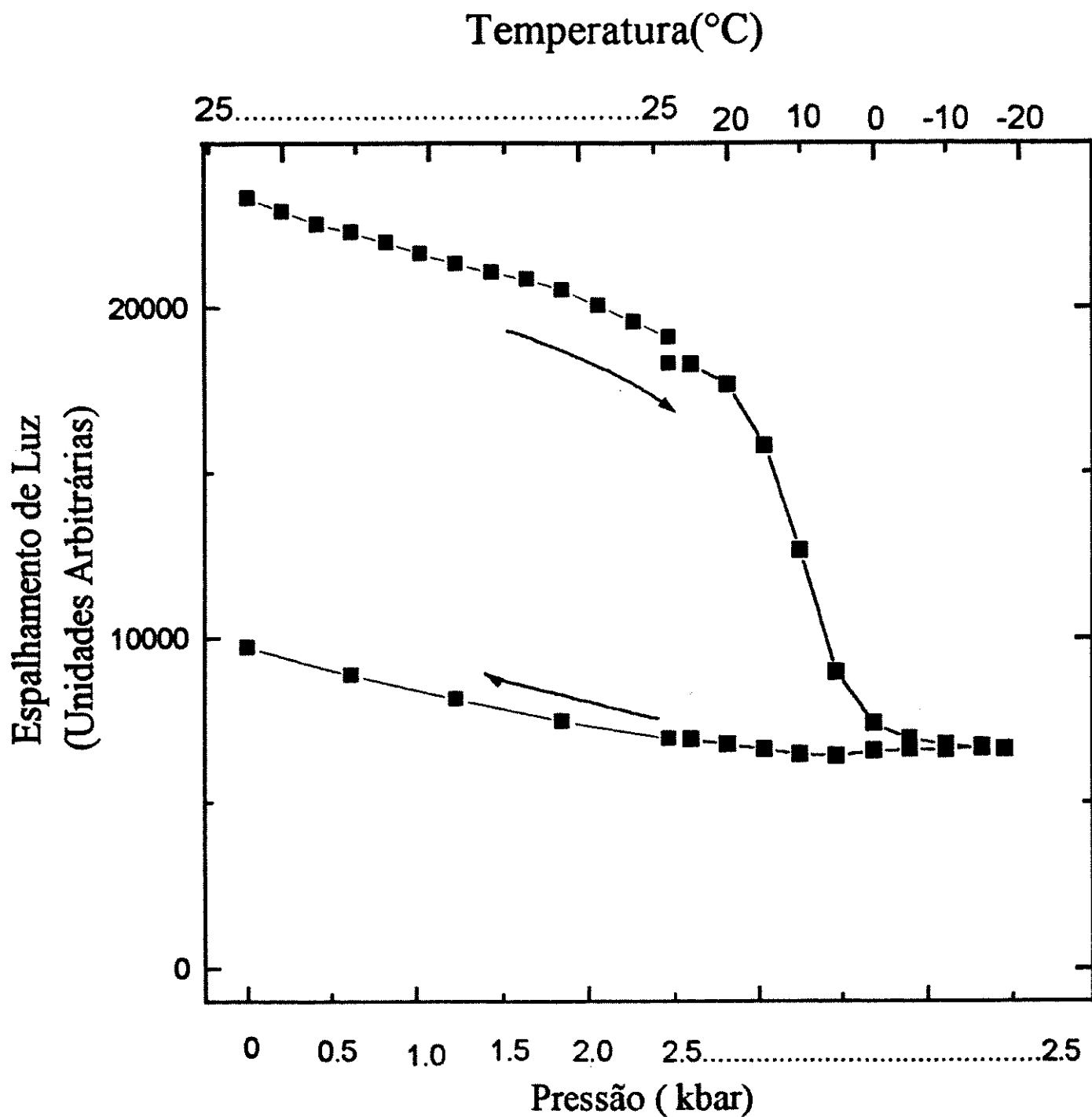


Figura 6: Efeito de pressão e baixa temperatura no espalhamento de luz do TMV. A intensidade do espalhamento de luz a 90° foi medida entre 345 e 355 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm). Foi utilizada solução de TMV 1 mg/ml em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

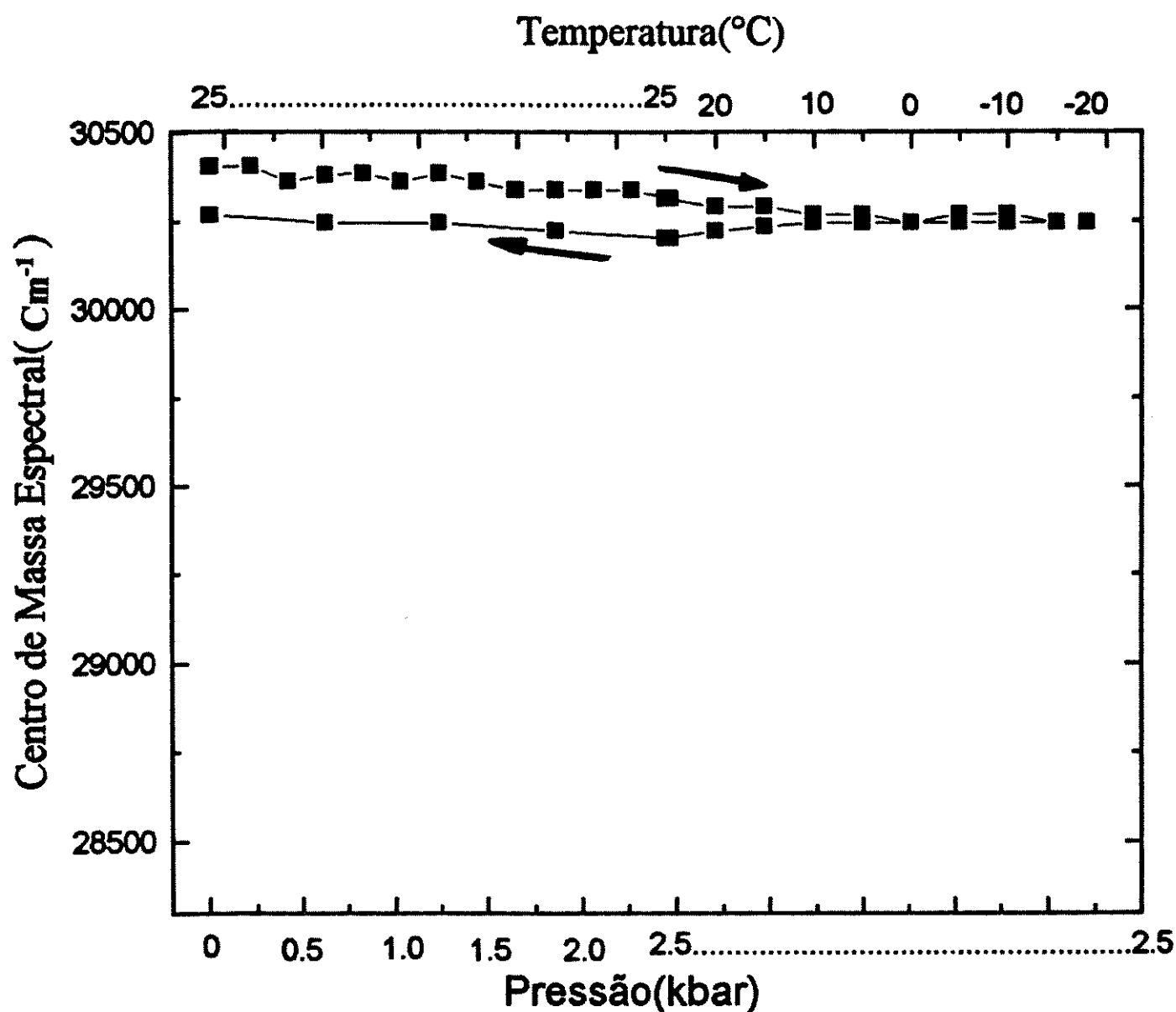


Figura 7: Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV.

Espectro de emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm), convertido para número de ondas. As demais condições são as mesmas da Fig. 6.

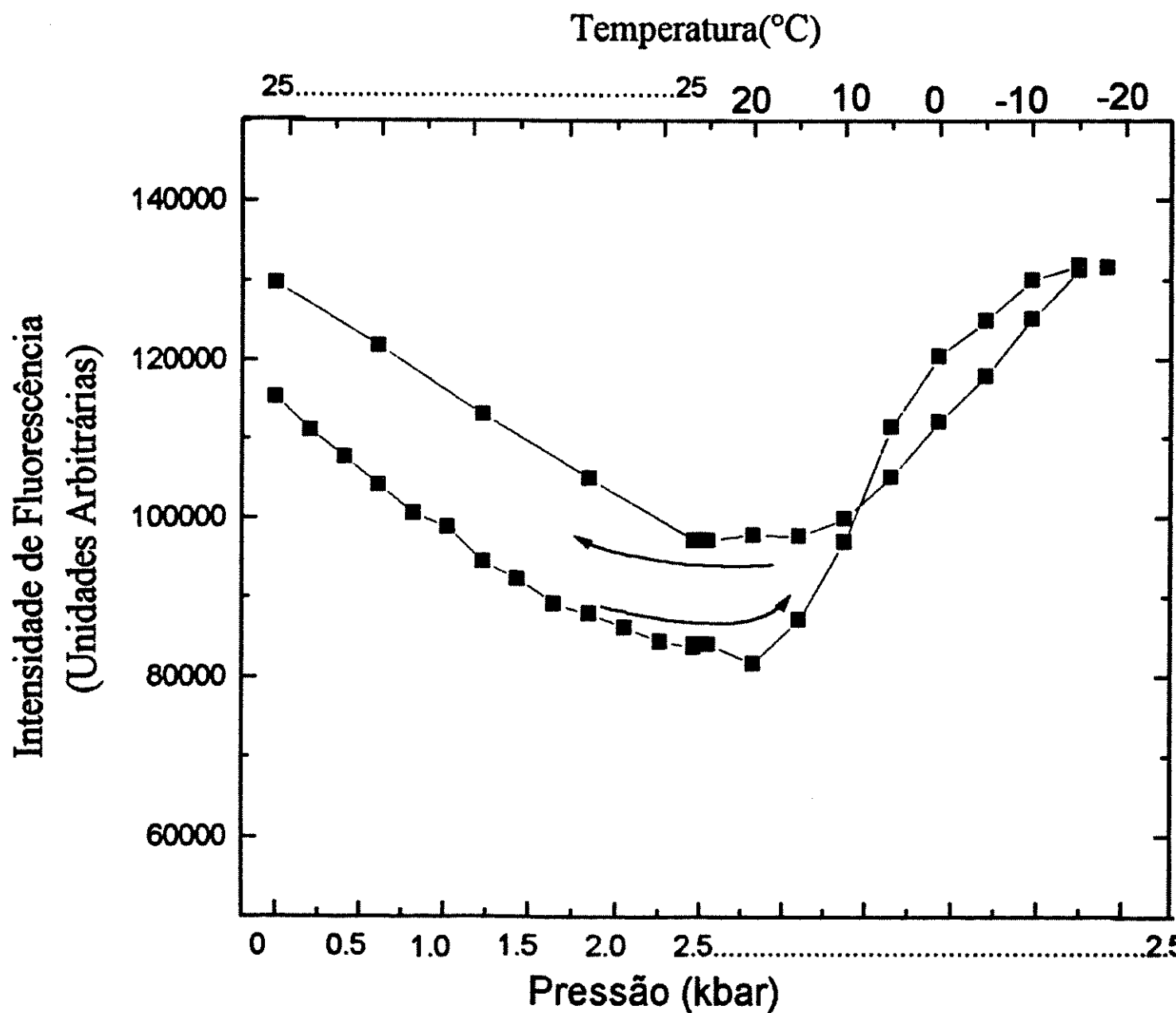


Figura 8: Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de emissão de fluorescência do TMV.

Intensidade de fluorescência entre 300 a 400 nm ($\lambda_{exc} = 285\text{nm}$). As demais condições são as mesmas da Fig. 6.

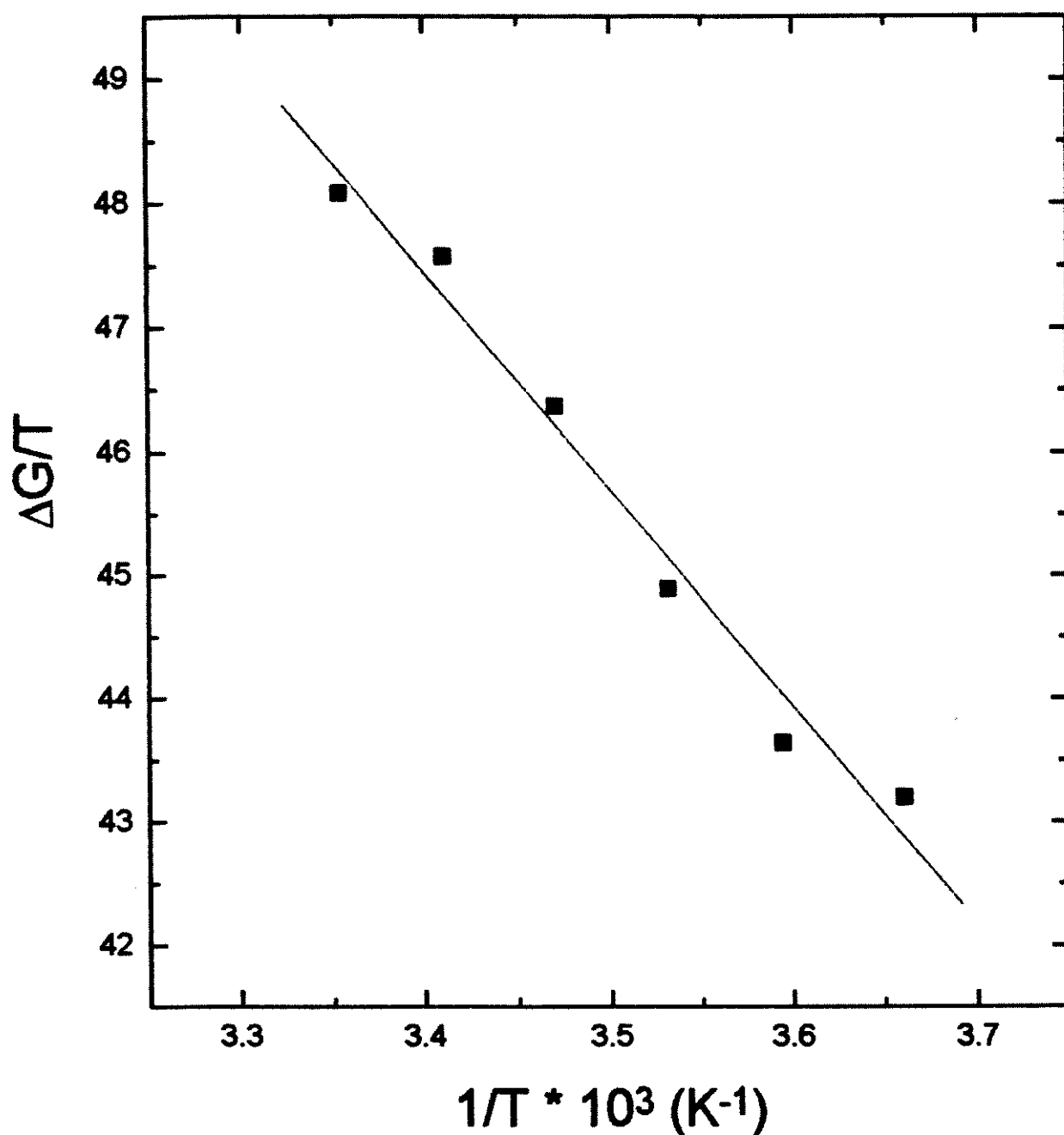


Figura 9: Gráfico de van't Hoff do TMV a 2,5 kbar (dados referentes à Fig. 6 e Tabela 1). Os valores foram baseados nos dados de espalhamento de luz, considerando α a 2,5 kbar de 0,22, Fig. 6, considerando $\alpha = 1$ em presença de uréia 6,0 M e 2,5 kbar, Fig. 18.

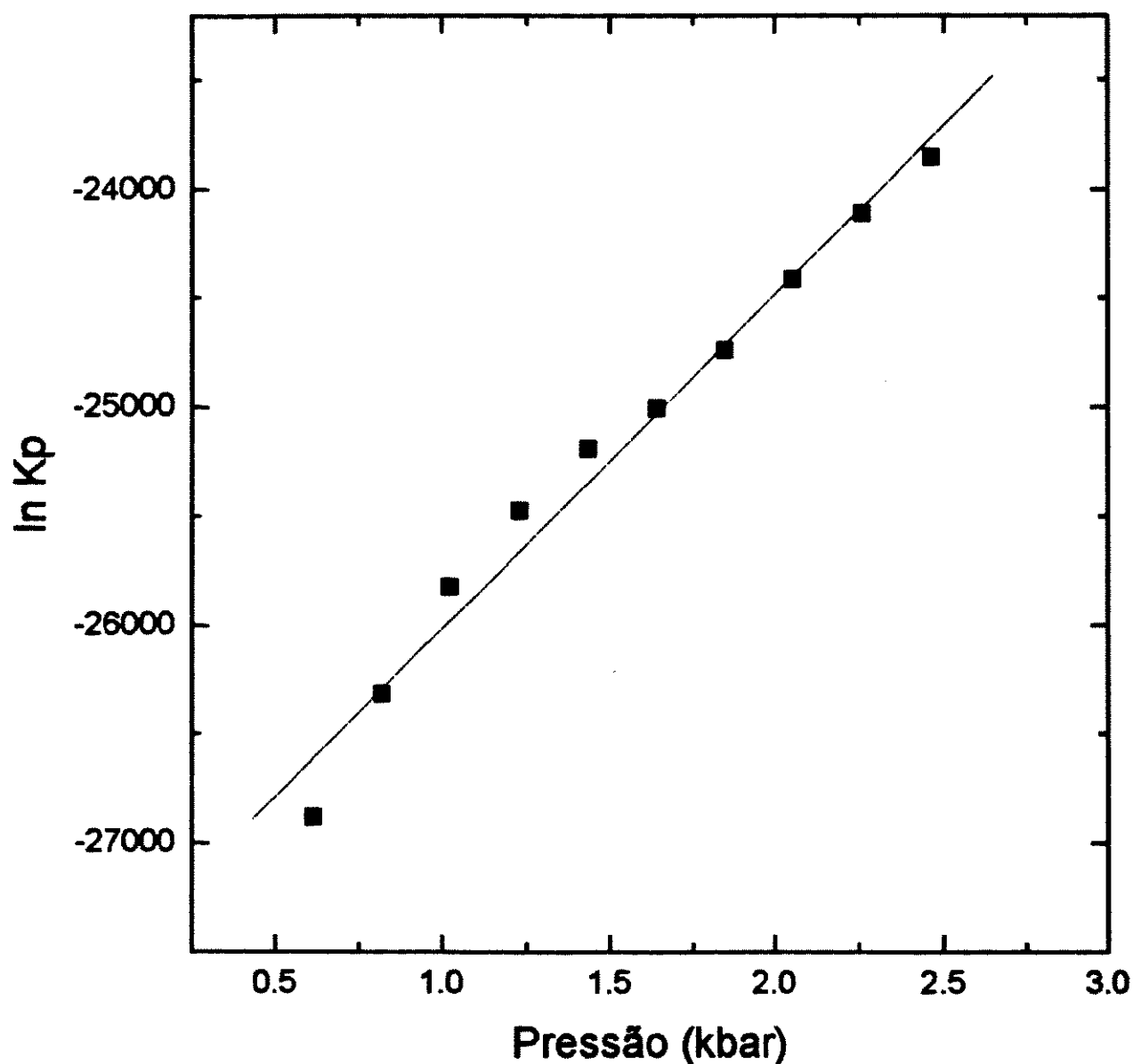


Figura 10: Efeito da pressão na dissociação do TMV expresso na forma logarítmica $\ln K_d$, ou $\ln K_p$ (utilizando a equação (5)). Os valores foram baseados nos dados de espalhamento de luz, considerando α a 2,5 kbar de 0,18, Fig. 6, considerando $\alpha = 1$ em presença de uréia 6,0 M e 2,5 kbar, Fig. 12.

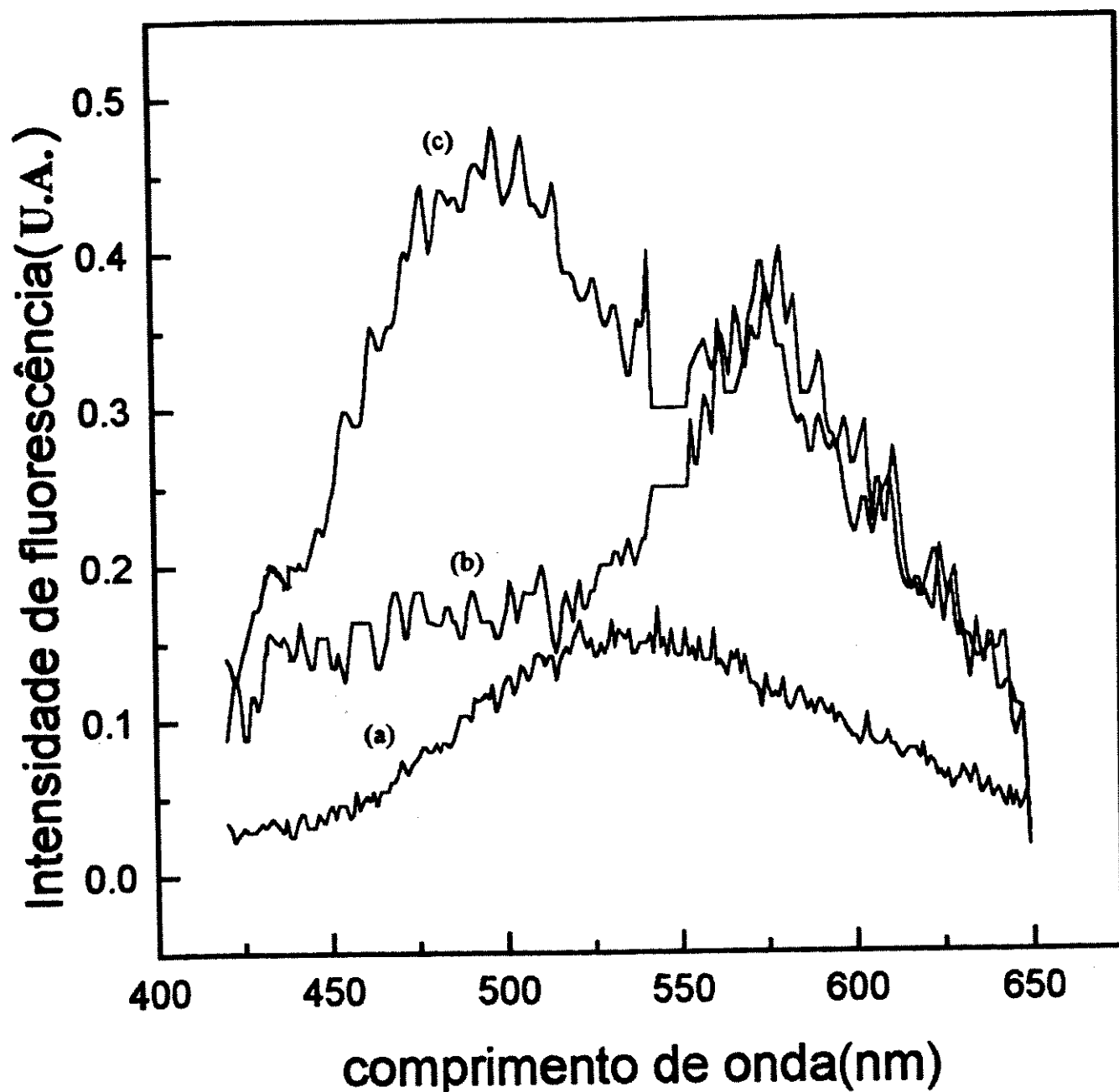


Figura 11: Espectros de emissão de fluorescência do Bis-ANS.

(a) Bis-ANS em água, (b) incubado com o TMV nativo e (c) incubado com o TMV a 2,5 kbar e -15 °C. A intensidade de fluorescência foi medida entre 420 e 650 nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm). Foi utilizada solução de TMV 0,1 mg/ml incubado com Bis-ANS a 2 μ M em tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

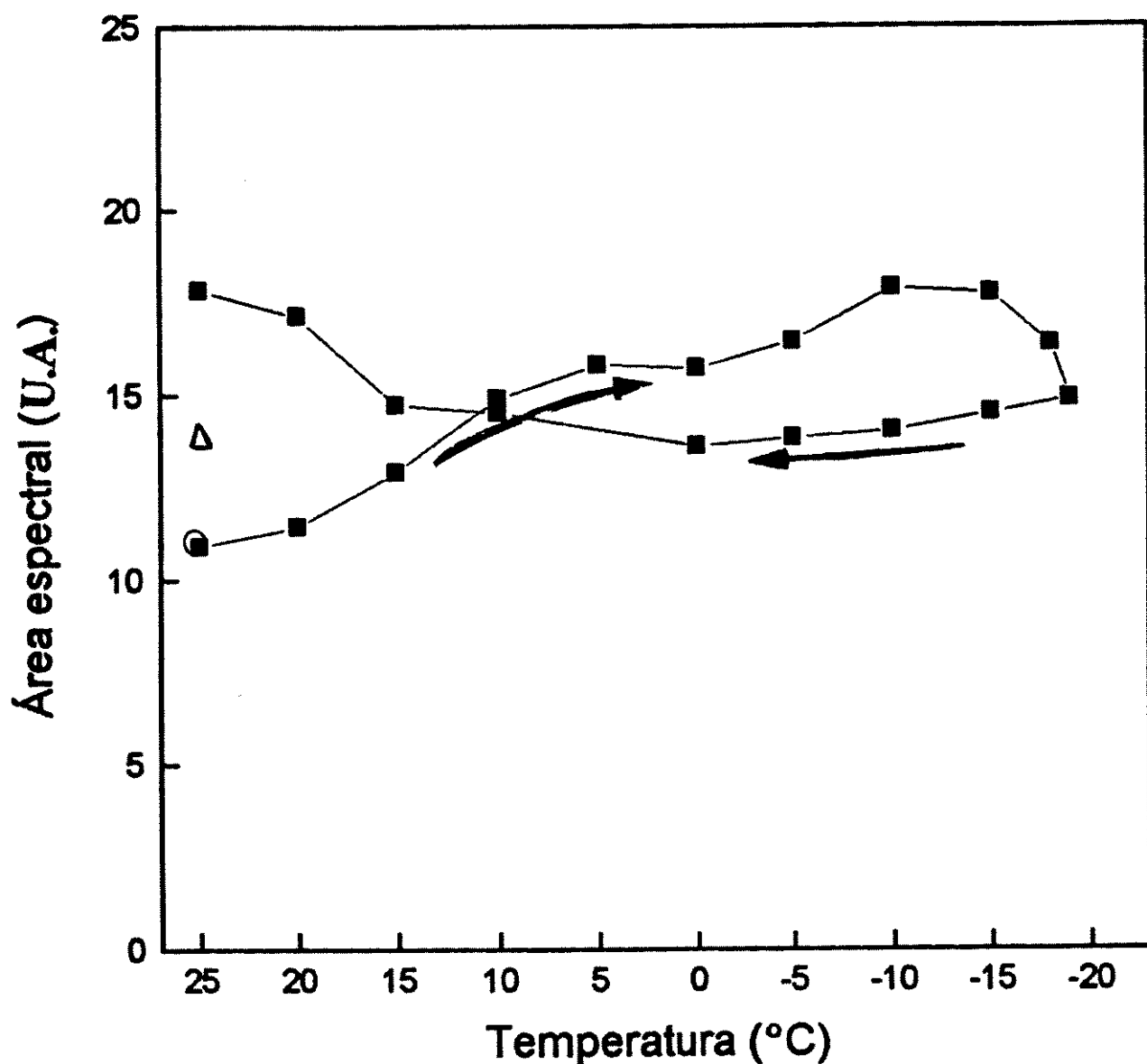


Figura 12: Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de emissão de fluorescência do Bis-ANS no TMV.

Símbolos cheios: TMV a 2,5 kbar; (O) TMV antes da pressurização e (Δ) retorno à pressão atmosférica. A intensidade de fluorescência foi medida entre 420 e 650 nm ($\lambda_{exc} = 360$ nm). As demais condições são as mesmas da Fig. 11.

Análises por gel filtração em HPLC do TMV nativo (Fig. 13A) mostram um único pico de absorção no volume de exclusão, que corresponde à massa molecular acima de 10^7 Da., não sendo detectado material incluído na coluna. Após incubação do TMV em alta pressão e baixa temperatura (Fig. 13B) a amostra eluiu em posição correspondente a baixo peso molecular, resultado concordante com os obtidos por espalhamento de luz. Imagens de microscopia eletrônica também indicam ausência de estruturas virais nos vários campos pesquisados (Fig. 14 e 15). Gel filtração em HPLC do TMV 6,5 meses após incubação a -18°C e retorno à pressão atmosférica (Fig. 13C) indicou significativo processo de reassociação viral, com eluição dessa amostra no volume de exclusão da coluna (acima de 10.000 kDa). Imagem de microscopia eletrônica desse material (Fig. 16) mostra partículas virais compatíveis com a forma nativa, confirmando processo de reassociação em intervalo de tempo mais longo como meses.

A incubação do TMV a 2,5 kbar sem posterior abaixamento de temperatura, por outro lado, não parece alterar significativamente a estrutura do TMV. Análise através de microscopia eletrônica após retorno à pressão atmosférica (Fig. 17) mostra a presença de grande número de partículas compatíveis com a forma nativa, em concordância com os resultados de espalhamento de luz (Fig. 6) que mostrou dissociação pouco significativa.

A seguir são mostrados os resultados de experimentos sobre o efeito de pressão e uréia em concentrações subdesnaturantes ou mais altas no TMV.

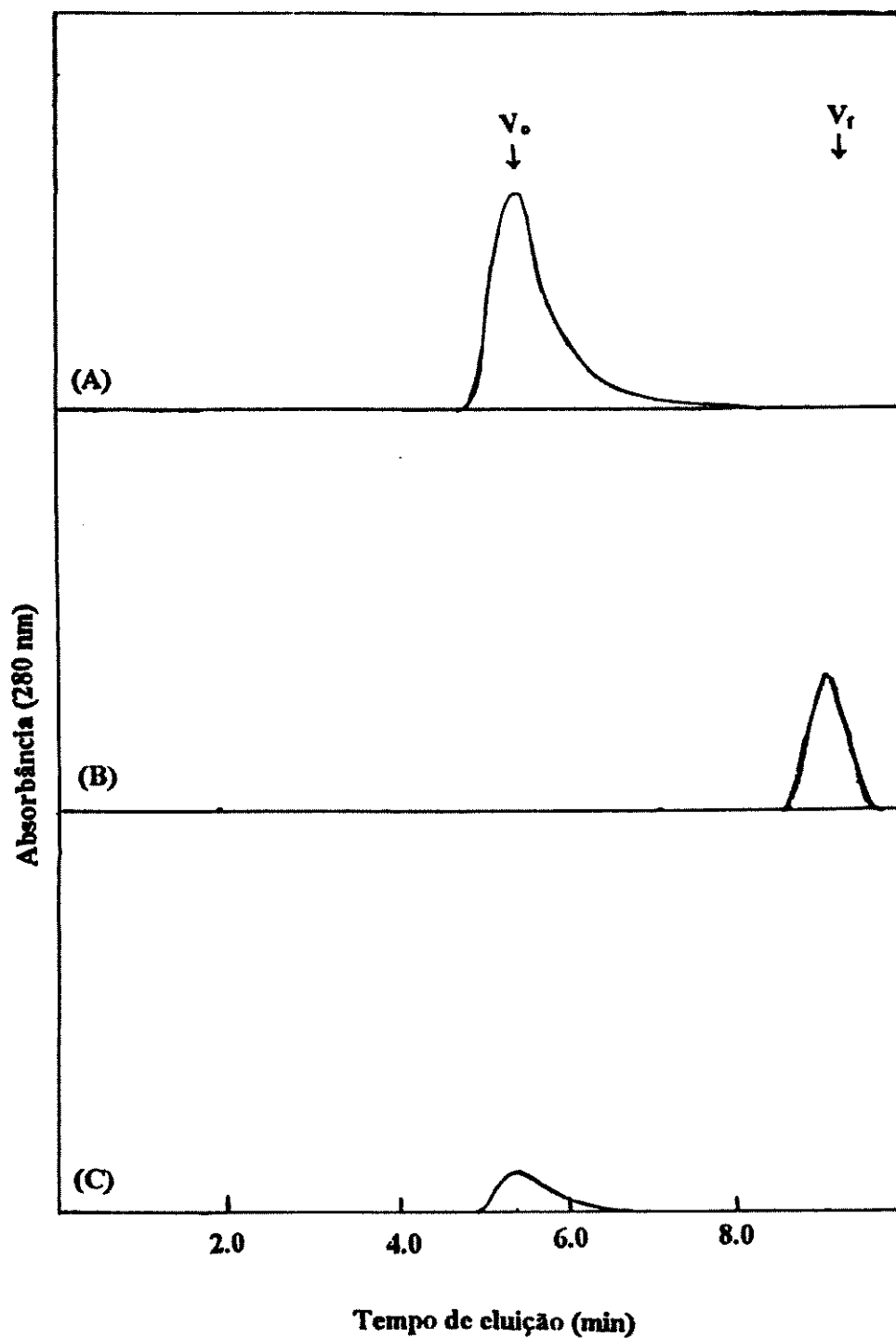


Figura 13 : Gel filtração do TMV.

HPLC em coluna GPC 1000 (A) à pressão atmosférica (1,0 mg/ml), (B) 1 e 20 dias após incubação a 2,5 kbar e -19°C (0,1 mg/ml) e (C) 6,5 meses após incubação a 2,5 kbar e -18°C (1 mg/ml). Fluxo de 0,3 ml/min.

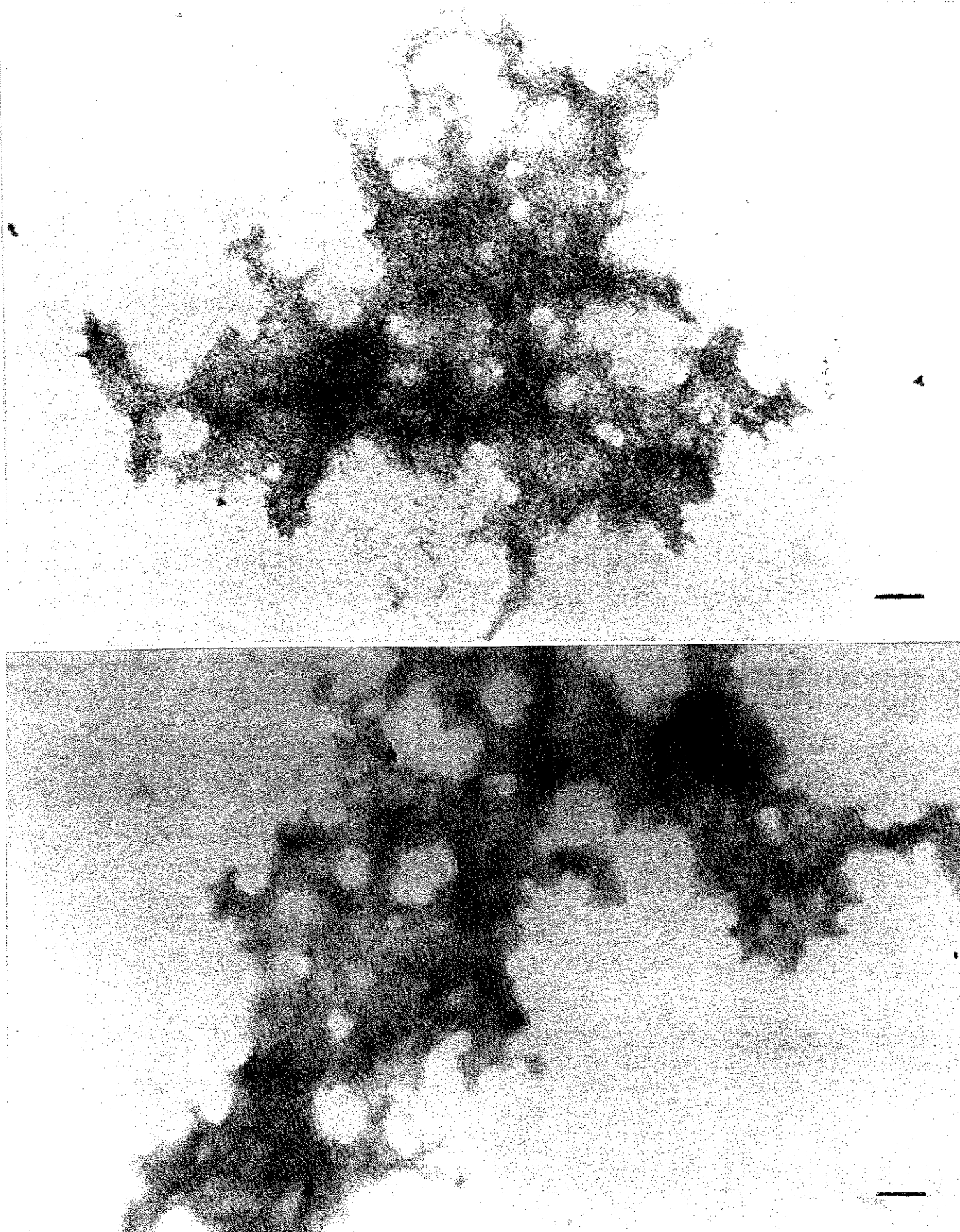


Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica do TMV aproximadamente 24 horas depois de incubado a 2,5 kbar e -18°C .

Amostra nas condições experimentais correspondentes às Figs. 6, 7 e 8.

Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

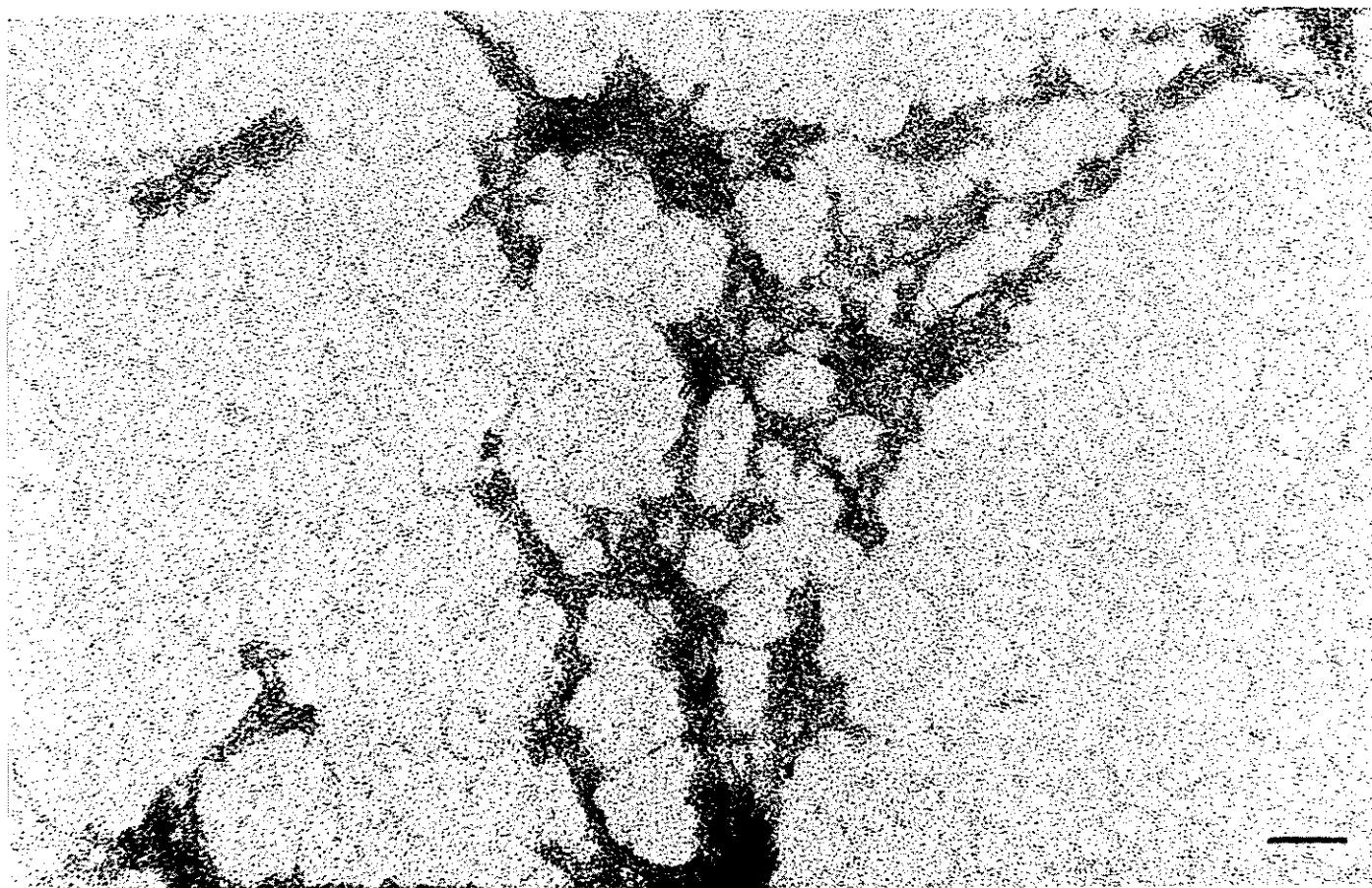


Figura 15: Imagem de microscopia eletrônica do TMV 4 dias após incubação a 2,5 kbar e -19 °C.

Amostra nas condições experimentais correspondentes às Figs. 11 e 12.

Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

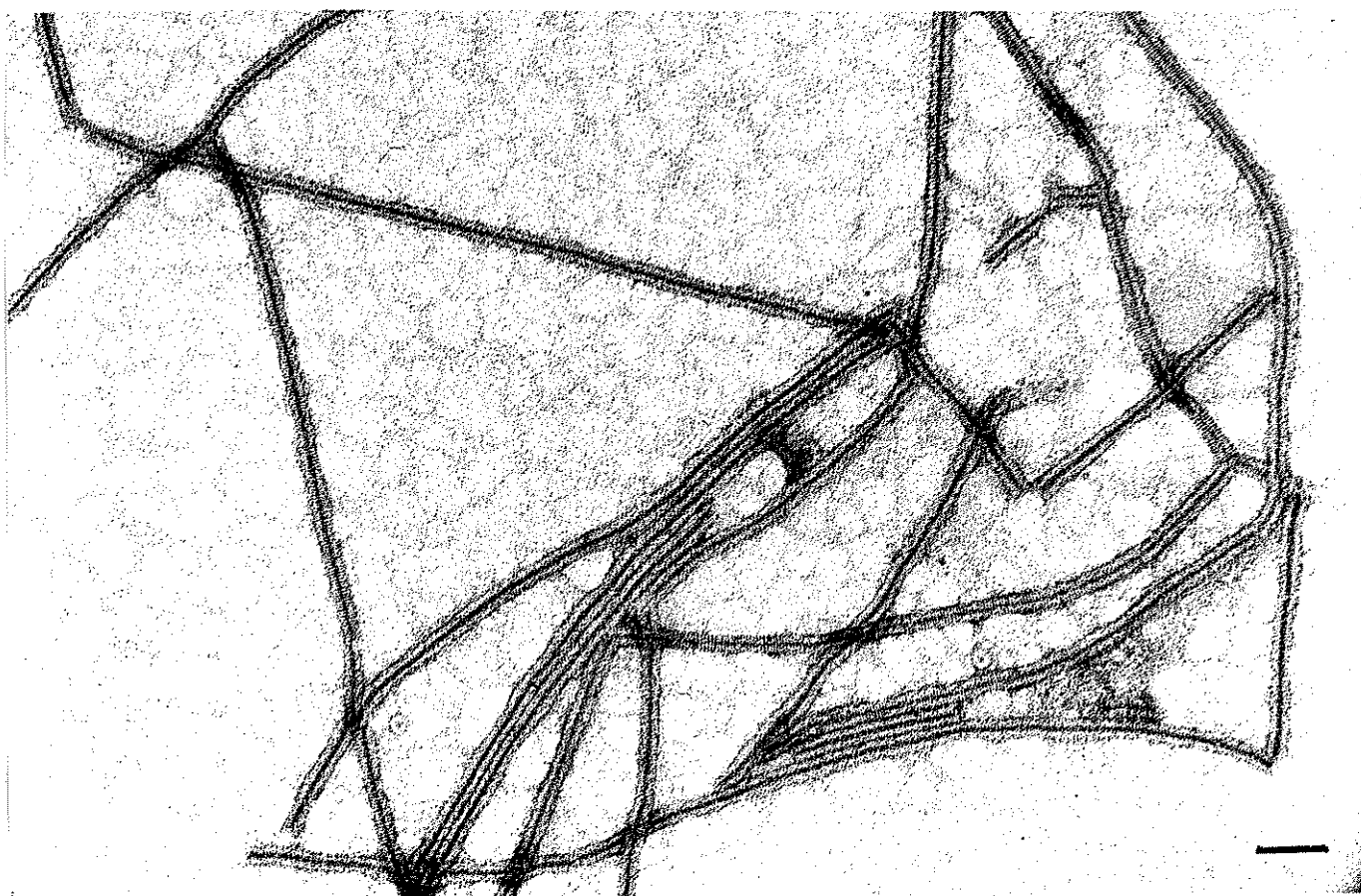


Figura 16: Imagem de microscopia eletrônica do TMV 6,5 meses após incubação a 2,5 kbar e -18°C .

Amostra correspondente ao retorno nas condições experimentais das Figs. 6, 7, 8.
Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

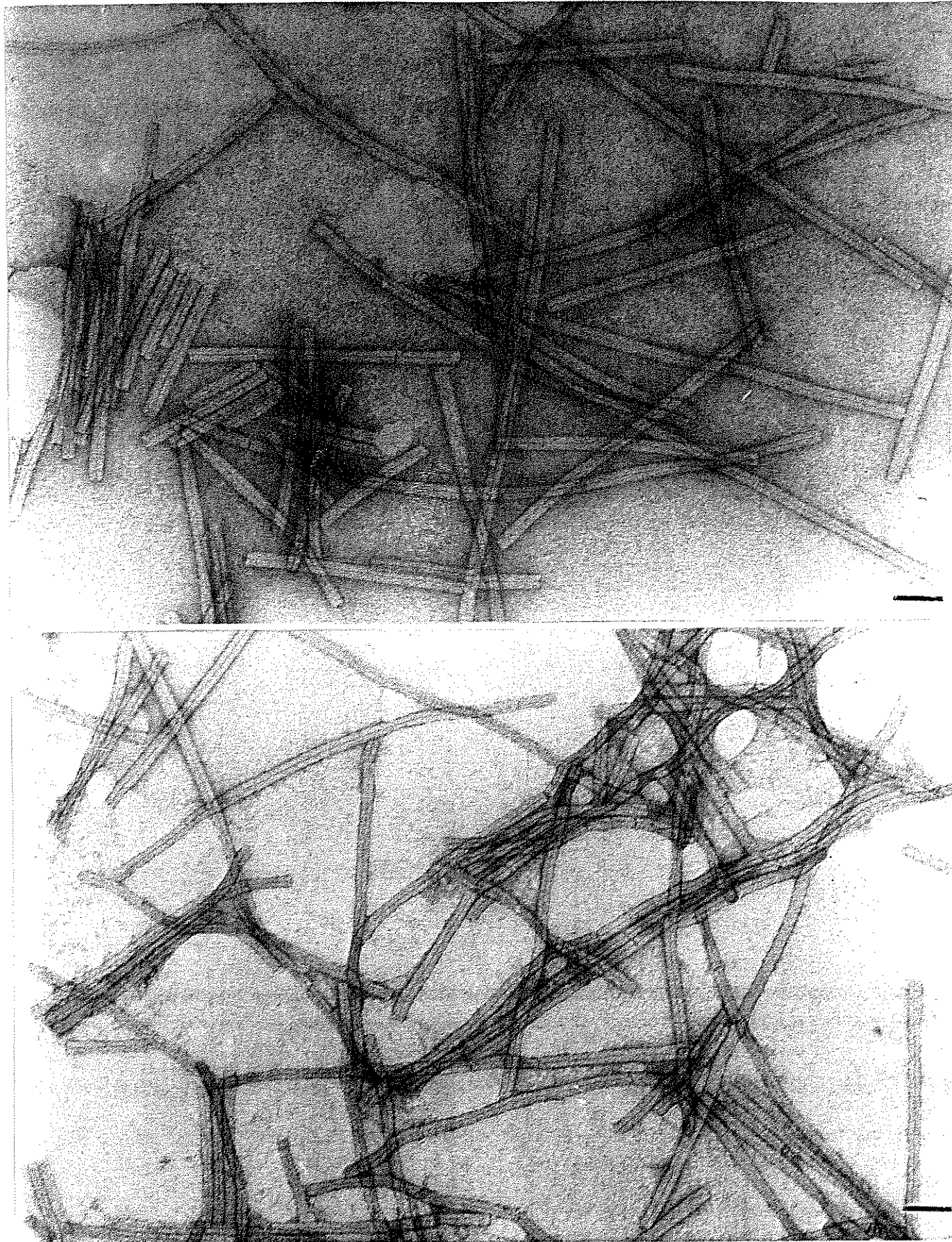


Figura 17: Imagens de microscopia eletrônica do TMV aproximadamente 6 horas depois de incubado a 2,5 kbar e 25 °C.

Condições experimentais da amostra correspondentes às Figs. 18 e 19.

Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

- Efeito de pressão e diferentes concentrações de uréia sobre o TMV.

A presença de uréia, em concentrações próximas a 1,0 M (Fig. 18, inclusão) induziu a diminuição significativa de intensidade de luz espalhada, sugerindo desagregação mesmo em concentrações subdesnaturantes. A partir de solução de uréia 4,0 M já se alcançou intensidade de espalhamento de luz mínima, correspondente a grande desagregação.

A alta pressão hidrostática induziu a diminuição de intensidade de espalhamento de luz semelhante nas diversas concentrações de uréia estudadas, comparando-se com a intensidade inicial de espalhamento de luz (Fig.18). A partir de solução de uréia 4,0 M, como a intensidade de espalhamento de luz à pressão atmosférica foi muito pequena, correspondendo a elevado grau de dissociação, não se detectou decréscimo adicional. Imediatamente após o retorno à pressão atmosférica verificou-se recuperação de aproximadamente 50% na intensidade de luz espalhada nas diferentes concentrações de uréia (símbolos abertos), assim como no controle (dado não mostrado). Na concentração de 4,0 M ou acima não tem sentido referir-se a “retorno”, pois o espalhamento já correspondeu a nível de dissociação perto de 100%.

Em pressão atmosférica, o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV em presença de diferentes concentrações de uréia não apresentou desvio significativo para o vermelho até 2,5 M, como mostra a Fig. 19, inclusão. Esse resultado é previsto, pois essa concentração de uréia é classicamente subdesnaturante. Em valores de 4,0 a 6,0 M de uréia, esse desvio torna-se importante (1.500 a 2.000 cm^{-1}), demonstrando elevado processo de desnaturação. A Fig. 19 mostra que a pressão não induz desvio expressivo para o vermelho no controle sem uréia (já descrito anteriormente, Fig. 7) e mesmo em concentração de uréia até 1,0 M. Em presença de uréia 2,5 M, no entanto, observou-se um acentuado desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência (1.900 cm^{-1}) com a pressão. À pressão atmosférica, o valor de número de ondas é semelhante ao valor na ausência de uréia (30.400 cm^{-1}), e o aumento de pressão, até 2,5 kbar, promoveu diminuição a um valor comparável àquele em presença de uréia 6,0 M (28.500 cm^{-1}), resultado compatível então com acentuada desnaturação. Em concentração de uréia de 4,0 M, já à pressão atmosférica ocorreu grande desvio (1.400 cm^{-1}) para o vermelho em relação ao controle sem uréia, correspondendo a cerca de

75%, que significa desnaturação importante, que a partir de 1,0 kbar atingiu desvio adicional de 500 cm^{-1} , praticamente correspondente ao nível máximo de desnaturação. Em concentração de uréia 6,0 M, a pressão não levou a desvio significativo para o vermelho, uma vez que a desnaturação já foi intensa à pressão atmosférica.

O retorno de 2,5 kbar à pressão atmosférica mostrou recuperação parcial nos valores de centro de massa espectral, principalmente em menores concentrações de uréia. A reversibilidade do processo de desnaturação por pressão e uréia (símbolos abertos) parece ocorrer para soluções com menores concentrações de uréia.

O desvio do centro de massa do espectro de emissão de fluorescência para o vermelho não acompanhou a dissociação viral, pois mostrou perfil diferente do apresentado pelo espalhamento de luz. Assim, o cálculo do grau de dissociação foi utilizando essa última técnica, que também permitiu o cálculo de $\ln K_d$ (relação (16) e (5)) em função da pressão, Fig. 20, e assim do $\ln K_{atm}$ e ΔV° de associação, como calculado na Fig. 10. Os valores encontrados foram colocados na Tabela 3.

Tabela 3: Cálculo da constante de dissociação na forma logarítmica e variação do volume de associação do TMV em diferentes concentrações de uréia.

[URÉIA] (M)	$\ln K_d$	$\log K_d$	ΔV° (ASSOCIAÇÃO) (ml / mol subun. diss.)
-	-28.025	-12.171	16,3
1,0	-24.357	-10.578	6,77
2,5	-21.592	-9.377	3,07

Como podemos observar, $\ln K_d$ aumenta com a concentração de uréia, sendo seu valor sempre extremamente baixo. É interessante observar que o ΔV° varia significativamente com a concentração de uréia nessas condições experimentais.

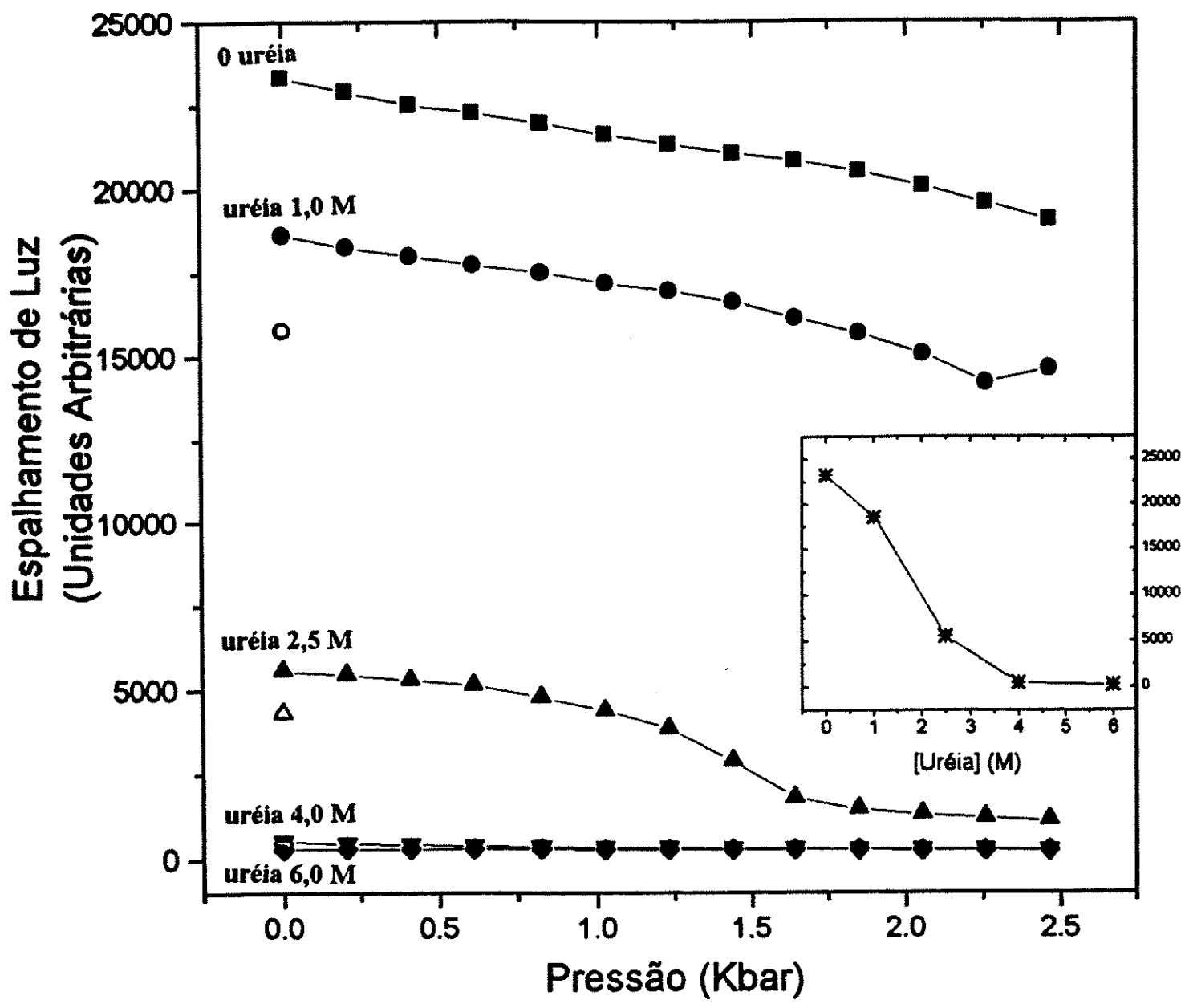


Figura 18: Efeito de pressão e uréia no espalhamento de luz do TMV.

As intensidades de luz espalhada foram corrigidas através da comparação (em uma cubeta) das intensidades de espalhamento de soluções de TMV nas diversas concentrações de uréia. As demais condições são as mesmas da Fig. 6. Os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica.

Inclusão: Efeito da concentração de uréia à pressão atmosférica na intensidade de luz espalhada.

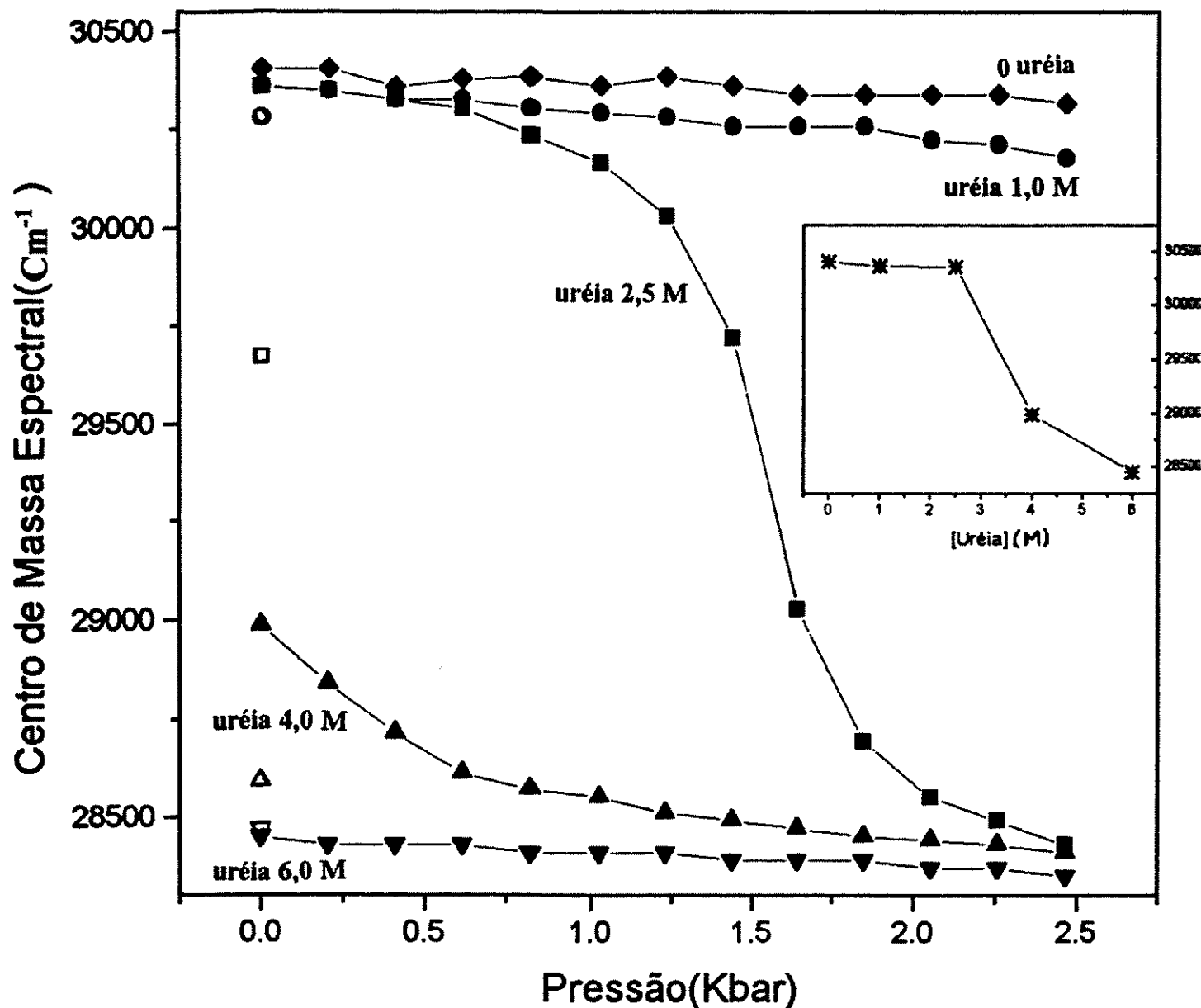


Figura 19: Efeito de pressão e uréia no espectro de emissão de fluorescência do TMV. Espectro baseado na emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285\text{nm}$), convertido para número de ondas. As demais condições são as mesmas da Fig. 6. Os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica.

Inclusão: Efeito da concentração de uréia à pressão atmosférica no centro de massa espectral.

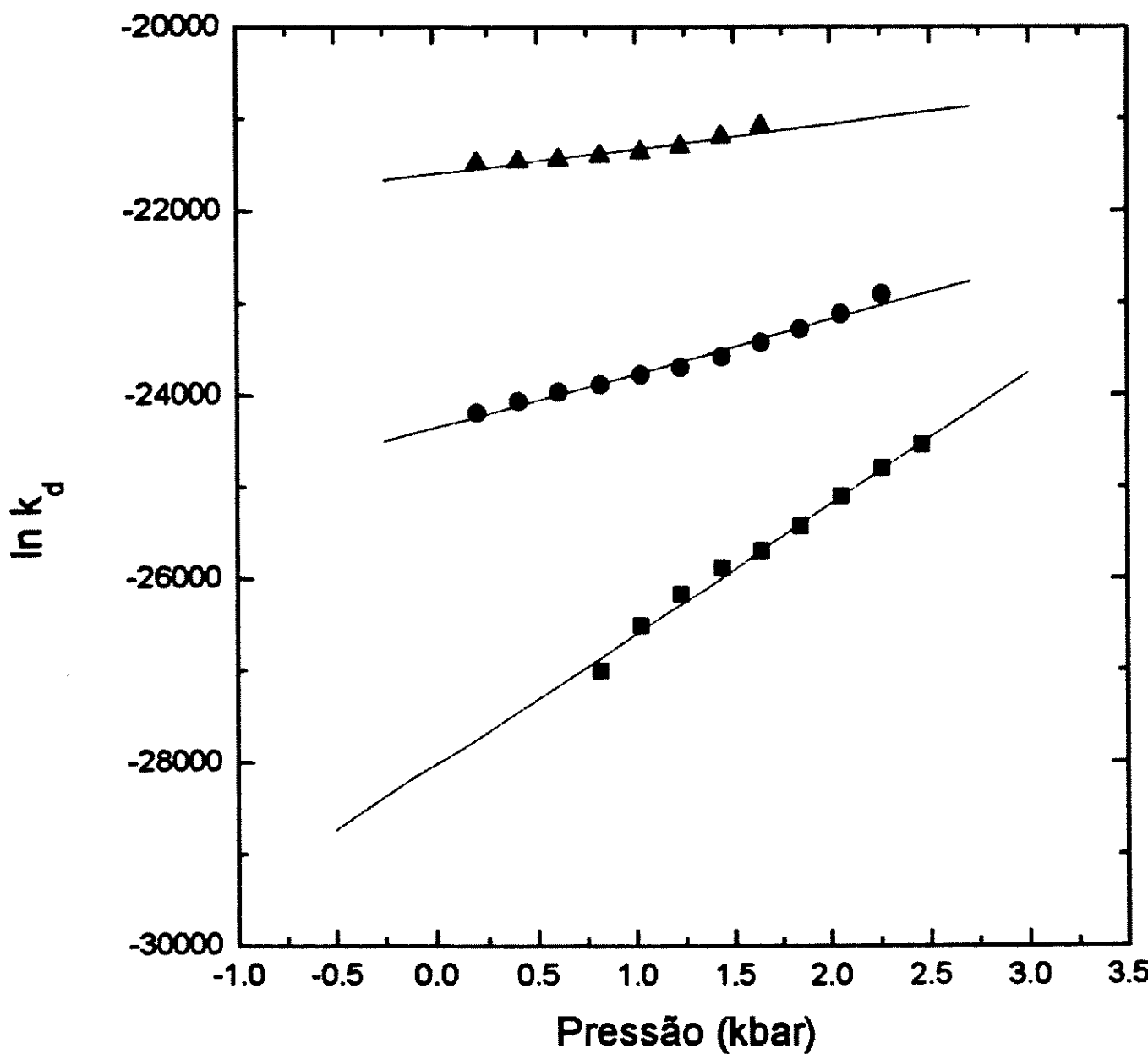


Figura 20: Efeito da pressão na dissociação do TMV em diferentes concentrações de uréia expresso na forma logarítmica $\ln K_d$, ou $\ln K_p$ (utilizando os dados de espalhamento de luz, Fig. 18, e a equação (5)).
 (■) Controle sem uréia; (●) 1,0 M uréia e (▲) 2,5 M uréia.

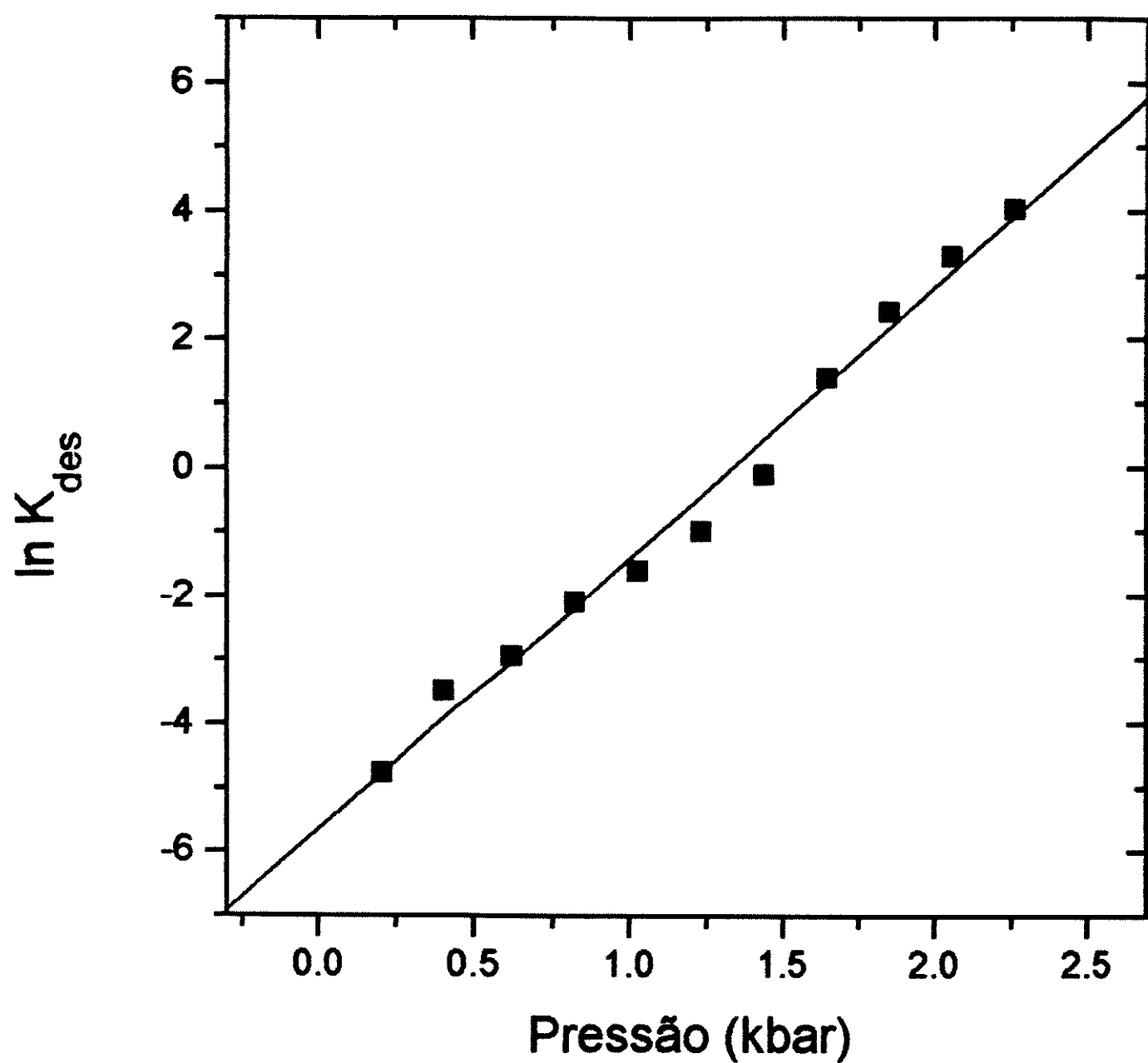


Figura 21: Efeito da pressão na desnaturação do TMV em uréia 2,5 M expresso na forma logarítmica $\ln K_{des}$ (utilizando os dados de centro de massa, e as equações (19 e 20)).

Outro aspecto interessante comparando os dados de espalhamento de luz e desvio do centro de massa do espectro de emissão de fluorescência, é que apesar da dissociação elevada (77%) em concentração de uréia 2,5 M, nessas condições ocorre desnaturação apenas em pressão superior à pressão atmosférica. Assim, o espalhamento de luz mostra dissociação de 77 a 100%, e o centro de massa a desnaturação praticamente de 0 a 100%. A relação (11) continua válida para o processo de desnaturação, permitindo o cálculo de ΔV_{des} (variação de volume de desnaturação):

$$\ln (n^n (\alpha_p)^n / (1 - \alpha_p)) = p \Delta V_{des} / RT + \ln (K_{atm} / C^{n-1}) \quad (18)$$

com $n = 1$, pois representa um processo de primeira ordem. Essa relação, portanto, fica

$$\ln ((\alpha_p) / (1 - \alpha_p)) = p \Delta V_{des} / RT + \ln K_{atm} \quad (19)$$

sendo que $\ln ((\alpha_p) / (1 - \alpha_p)) = K_{des}$. A forma gráfica $\ln ((\alpha_p) / (1 - \alpha_p))$ em função de p leva ao ΔV_{des} . A Fig. 21 mostra essa representação, que leva a uma variação de volume de desnaturação por uréia e pressão. Os dados de centro de massa foram utilizados para cálculo da constante de desnaturação à pressão p , α_p , mas com correção de acordo com o rendimento quântico, utilizando a relação (12), porém com notação correspondente ao processo de desnaturação:

$$\alpha_p = (1 + Q (<v_p> - <v_{des}>) / (<v_n> - <v_p>))^{-1} \quad (20)$$

onde Q é a razão de rendimento quântico entre a molécula desnaturada e a nativa, v_{des} é o centro de massa espectral da forma desnaturada, v_n é o correspondente valor para a forma nativa e v_p para a proteína na pressão p (Silva & Weber, 1986). O valor calculado de Q foi 0,55 (dados não mostrados). O valor de ΔV_{des} foi de 103,5 ml/mol subunidade desnaturada.

Gel filtração em HPLC do TMV incubado em presença de uréia 2,5 M (Fig. 22B) mostra eluição da amostra no volume de exclusão da coluna, portanto acima de 10^7 Da, como observado para o TMV nativo (Fig. 22A). Incubação dessa amostra a 2,5 kbar (uréia 2,5 M), Fig. 22C, indica eluição em posição correspondente a baixo peso molecular.

Ambas as eluições foram feitas após 2 dias da incubação com uréia e alta pressão. Imagens de microscopia eletrônica do TMV após incubação a 2,5 M de uréia (Fig. 23) mostraram partículas compatíveis com a forma nativa, partículas de tamanhos menores e formas muito desagregadas. Após incubação em alta pressão (Fig. 24), a relação entre formas de alto grau de desagregação e partículas maiores aumentou significativamente. A reversibilidade parcial da desnaturação observada no cálculo do centro de massa do espectro de emissão de fluorescência parece presente também nessas imagens, representadas pelos fragmentos observados por microscopia eletrônica.

Microscopia eletrônica do TMV em presença de uréia 6,0 M e incubado a 2,5 kbar (Fig. 25) mostrou ausência total de partículas virais ou menores, visualizando-se apenas formas compatíveis com desagregação e desestruturação total. Este resultado é esperado baseando-se na desnaturação observada pelo desvio de centro de massa e dados sobre a intensidade de luz espalhada anteriormente discutidos.

A incubação da sonda fluorescente Bis-ANS com o TMV em presença de uréia à pressão atmosférica (Fig. 26) mostrou aumento de intensidade de emissão de fluorescência até concentração de uréia 4,0 M, e em 6,0 M a intensidade de emissão do Bis-ANS diminuiu a valor próximo ao controle sem uréia. Aparentemente a dissociação do TMV leva a esse aumento, e o processo de desnaturação contribui para a queda de intensidade de emissão do Bis-ANS.

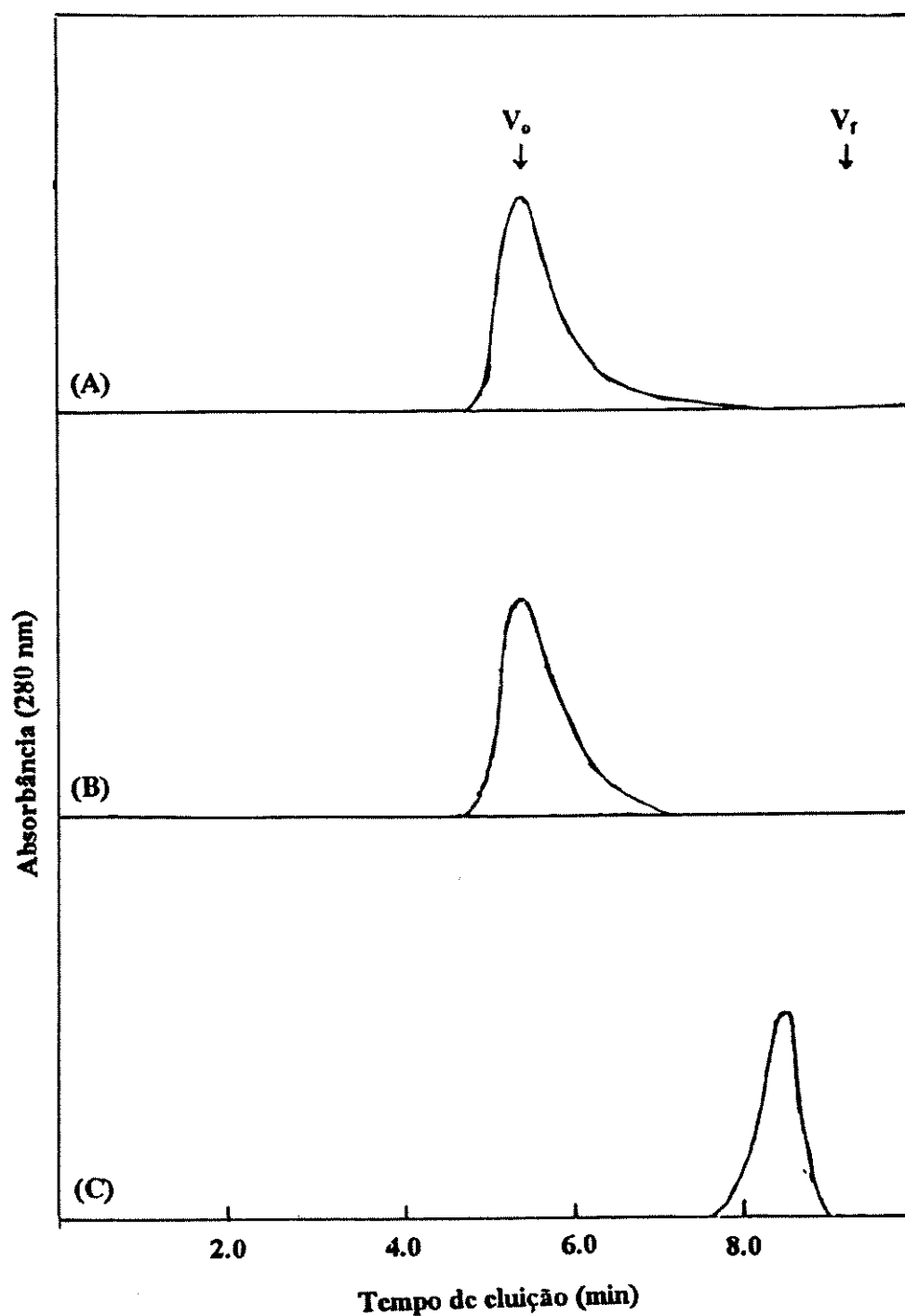


Figura 22: Gel filtração do TMV.

HPLC em coluna GPC 1000 (A) à pressão atmosférica (1,0 mg/ml), (B) 2 dias após incubação em uréia 2,5 M (0,1 mg/ml) e (C) 2 dias após incubação a 2,5 kbar em uréia 2,5 M (0,1 mg/ml). Fluxo de 0,3 ml/min.

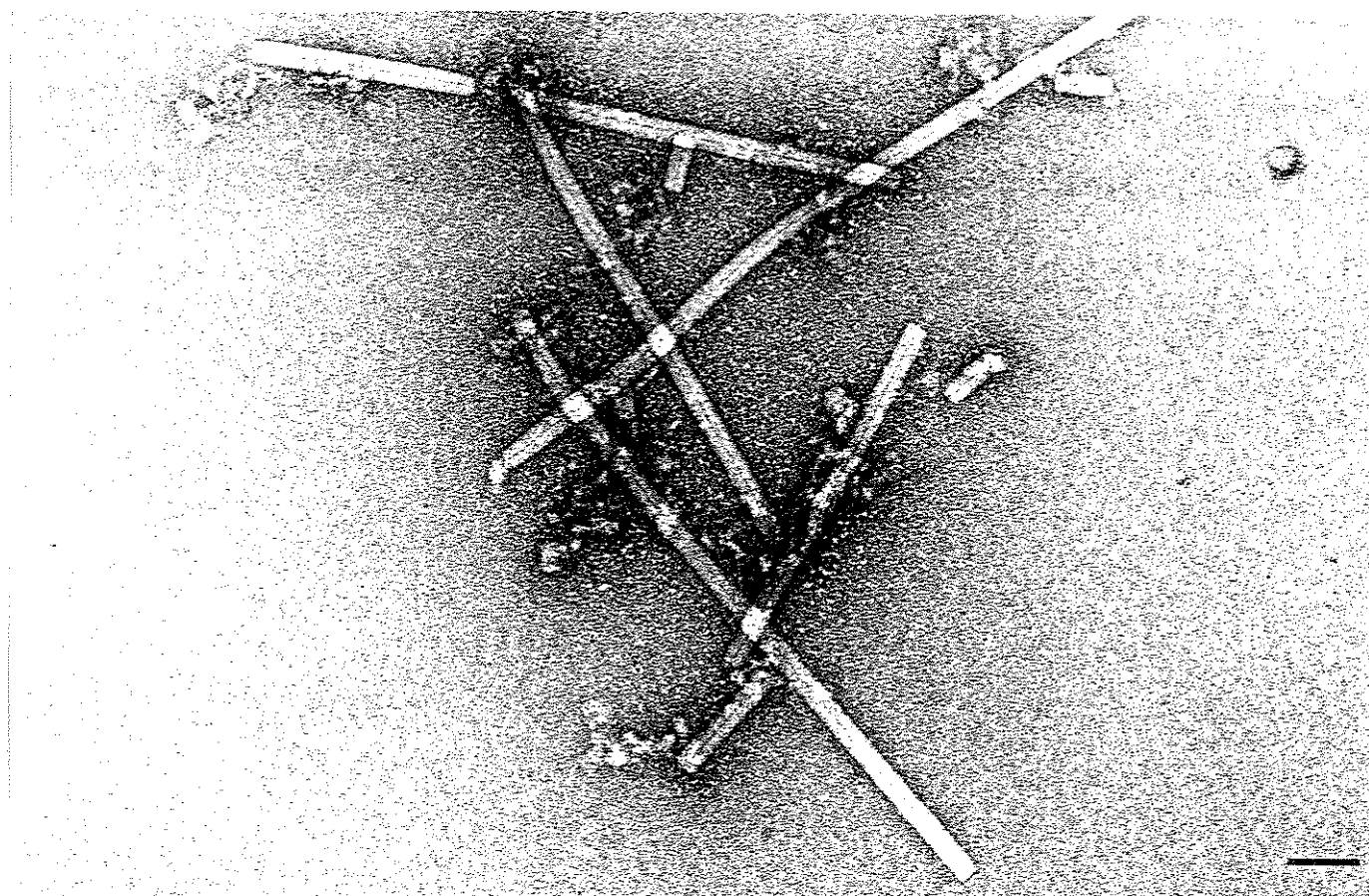
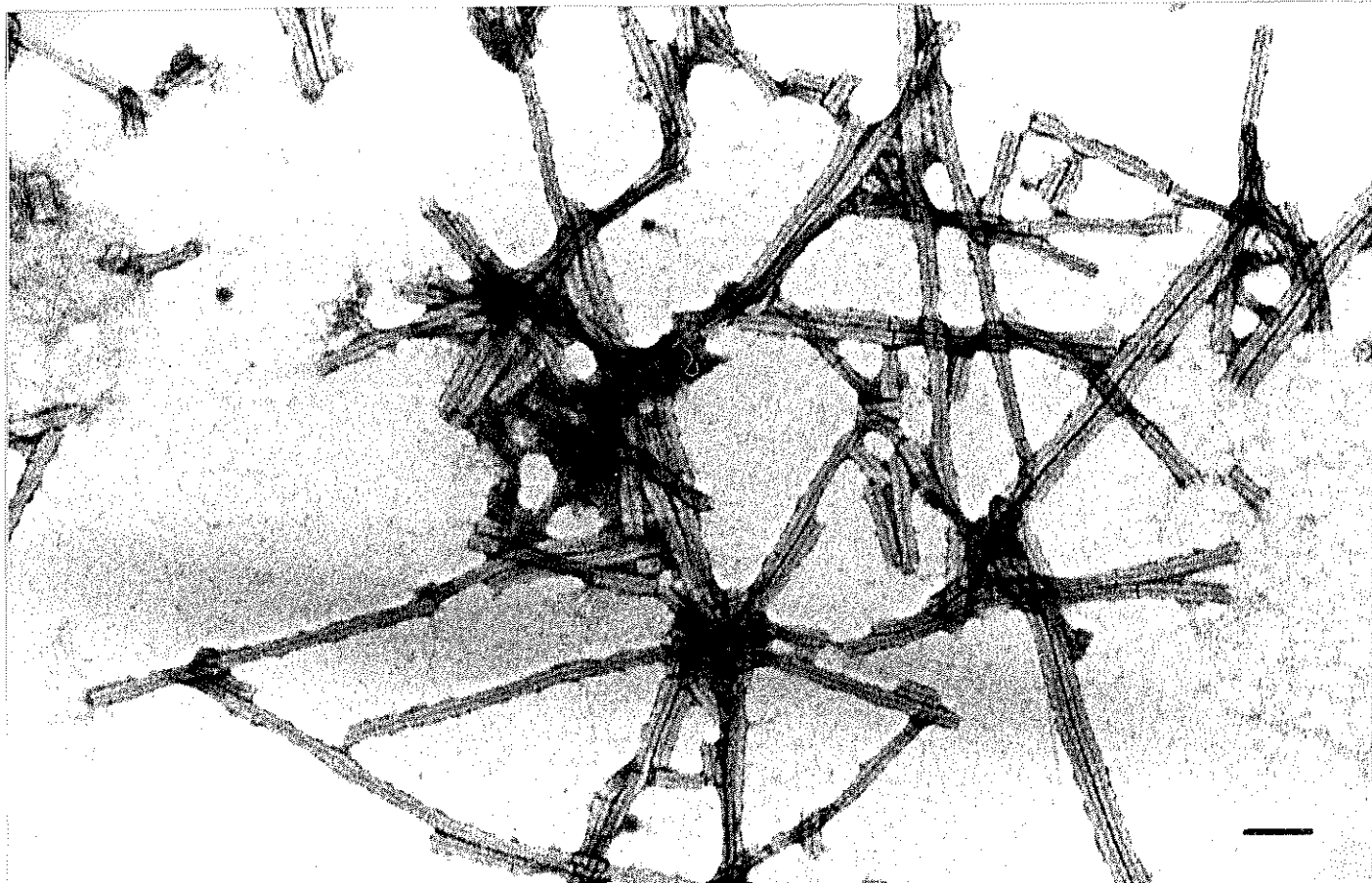


Figura 23: Imagens de Microscopia eletrônica do TMV em uréia 2,5 M à pressão atmosférica e 25 °C.
Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

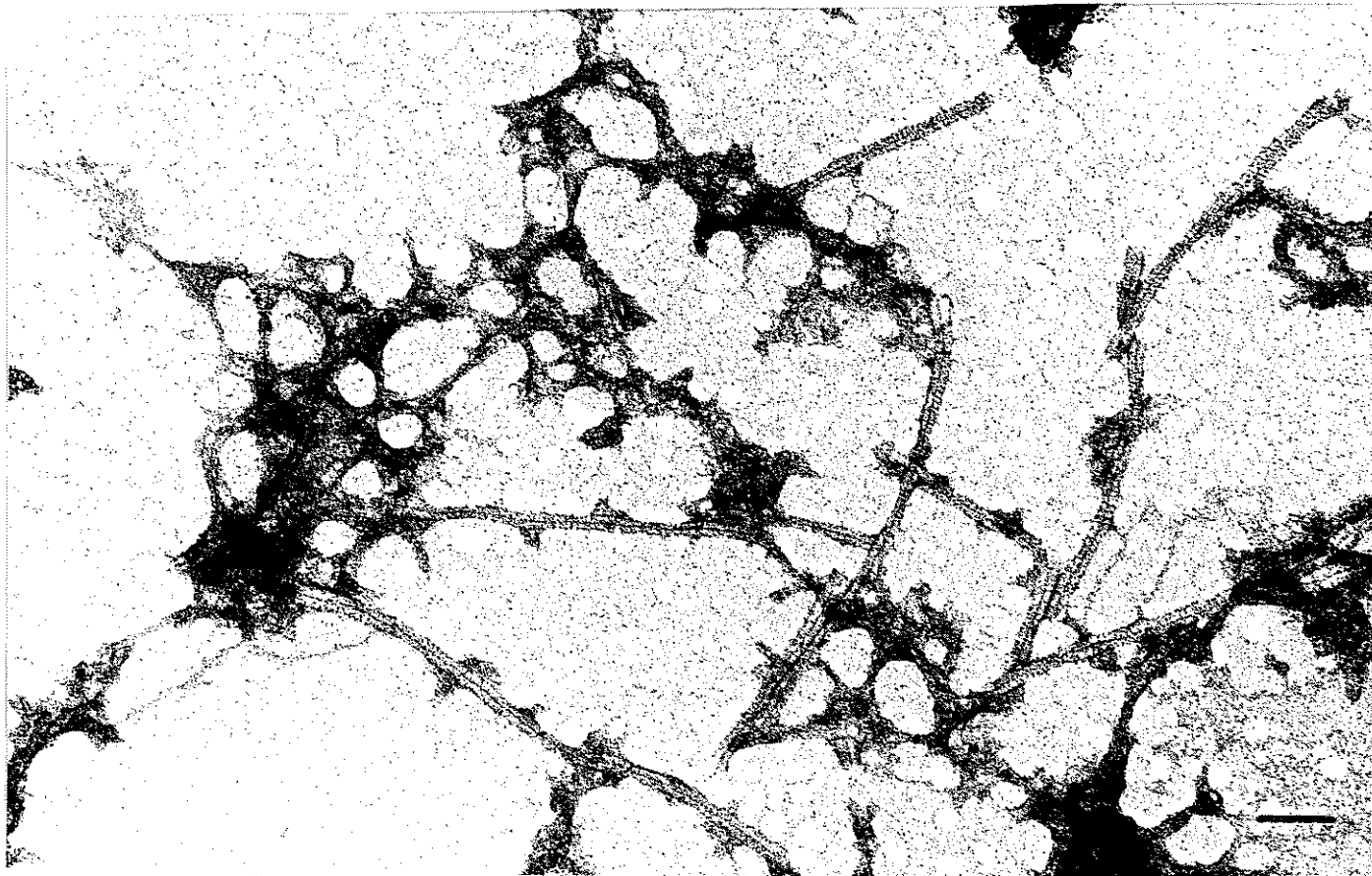


Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica do TMV em uréia 2,5 M, aproximadamente 5 dias após incubação a 2,5 kbar e 25 °C, em condições experimentais correspondentes às Figs. 18 e 19.

Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

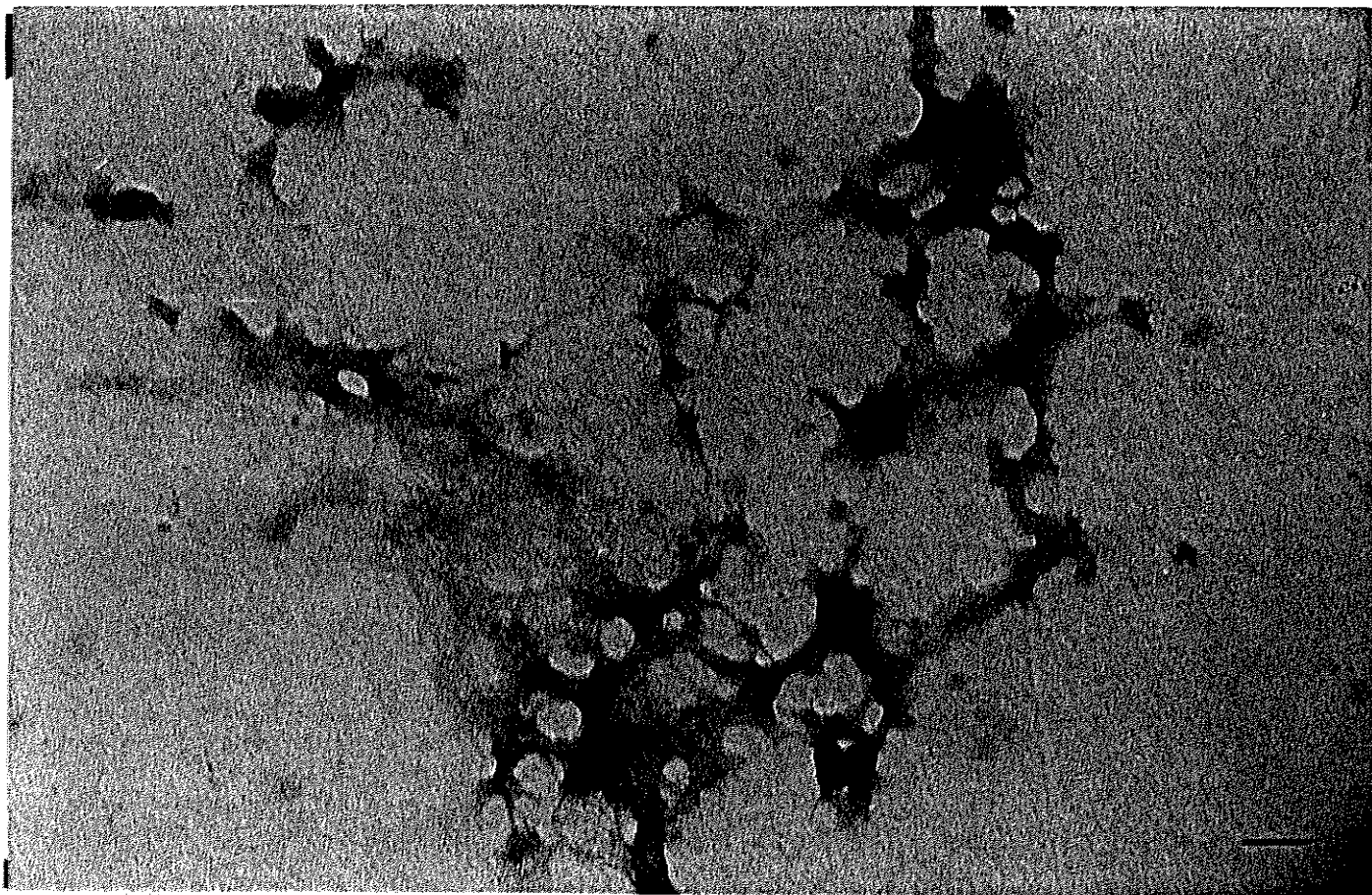


Figura 25: Imagem de microscopia eletrônica do TMV em uréia 6,0 M, aproximadamente 48 horas pós incubação a 2,5 kbar e 25 °C.

Amostra nas condições experimentais correspondentes às Figs. 18 e 19.

Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. Barra de calibração: 50 nm.

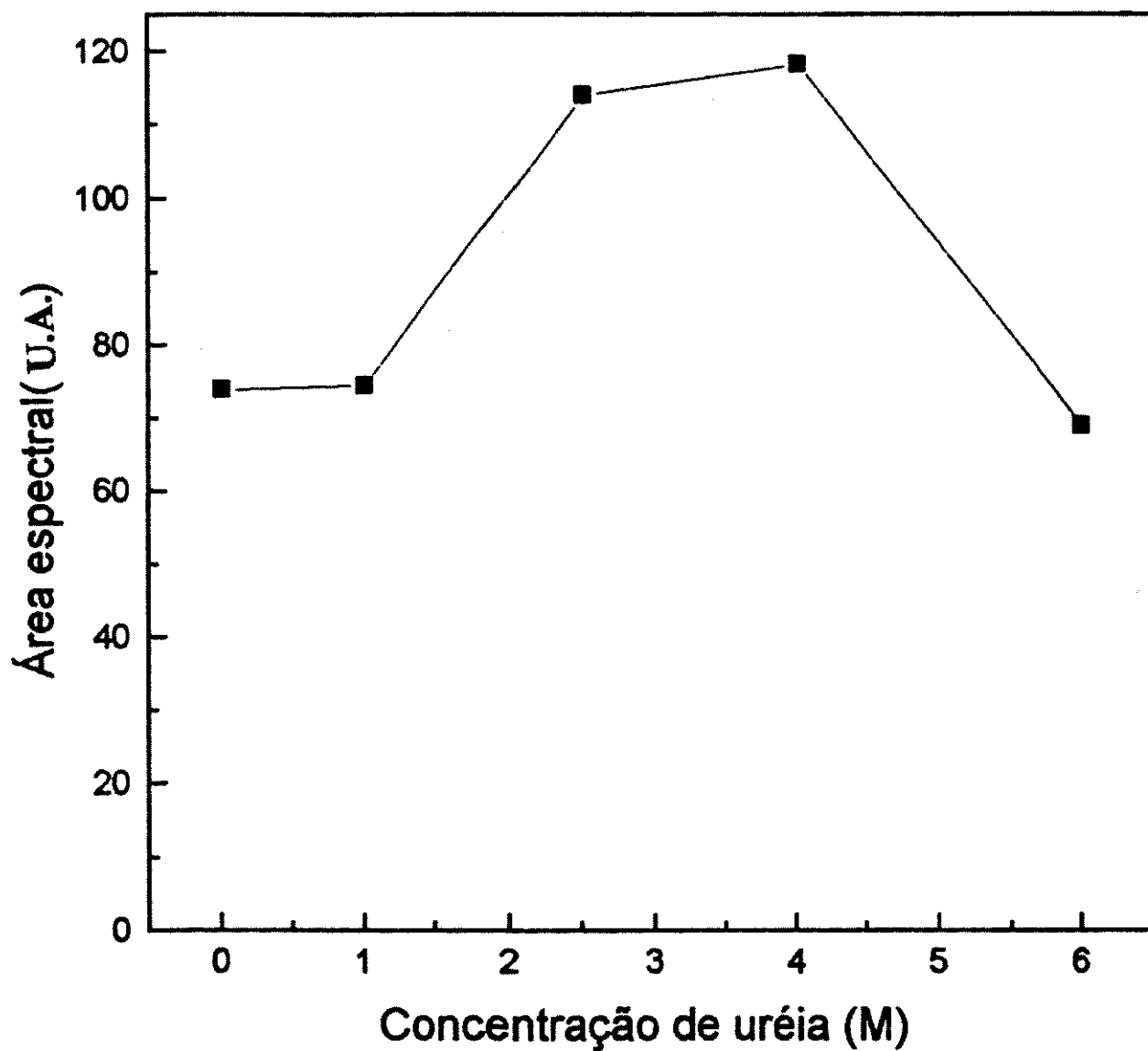


Figura 26: Efeito de uréia no espectro de emissão de fluorescência do Bis-ANS no TMV. As demais condições são as mesmas da Fig. 11.

DISCUSSÃO

- Alta pressão em TMV: pouca dissociação.

O objetivo principal dessa dissertação foi o estudo do efeito de pressão no TMV em diversas condições como baixa temperatura e presença de uréia. Apenas utilizando alta pressão, até 2,5 kbar não ocorreram mudanças significativas na intensidade de espalhamento de luz, sendo observada dissociação de no máximo 18% (Fig. 6). Além disso, praticamente não ocorreu desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência. A utilização da sonda de fluorescência Bis-ANS, Fig. 12, confirmou a ausência de mudanças importantes na proteína capsídica pois não ocorreu nenhuma modificação na intensidade de fluorescência a 2,5 kbar.

Silva & Weber (1988), por outro lado, observaram processo de dissociação mais significativo para o vírus icosaédrico BMV ("Brome Mosaic Virus"), mostrados através de imagens de microscopia eletrônica de amostras fixadas em alta pressão. Esse processo foi acompanhado de desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência de cerca de 300 cm^{-1} . A concentração de vírus nesses experimentos foi de 0,06 mg/ml. Nesse caso, o Bis-ANS apresentou aumento de intensidade no espectro de emissão de fluorescência de cerca de seis vezes quando em 2,5 kbar. Vírus icosaédricos como o bacteriófago R17 (Da Poian e cols., 1993) e o CPMV (Da Poian e cols., 1994) apresentaram maior estabilidade em alta pressão. Nesse último caso, a possibilidade de isolamento de capsídeos sem a presença do material genético através de ultracentrifugação permitiu observar dissociação importante por pressão, mostrando que o RNA estabiliza significativamente a partícula viral. Essa estabilização foi estimada através de experimentos em presença de uréia em concentrações subdesnaturantes, levando a um aumento na energia livre de 988 cal/mol subunidade dissociante de CPMV.

A relativa estabilidade do TMV à alta pressão pode também estar relacionada à presença do RNA. As diferenças da estrutura terciária da proteína capsídica entre a forma em presença de RNA ou ausência são bem conhecidas através de cristalografia de raios X, que conforme já visto, apresenta formação de uma α -hélice adicional na partícula viral (Fig. 1c e 1d) (Hitth & Richards, 1981). Na partícula viral ocorre interação de 3 nucleotídeos por subunidade de proteína capsídica. O efeito de alta pressão até 1,5 kbar

em proteína capsídica do TMV em diferentes estados de agregação foi analisada através de turbidimetria (Jaenicke e cols., 1981). Segundo esses achados, a 26,2 °C ocorreu dissociação completa à 0,6 kbar da forma hélice cilíndrica. A 29,7 °C essa dissociação ocorreu a 1,0 kbar. Por outro lado, os autores induziram associação da proteína capsídica até a forma hélice cilíndrica apenas com o aumento da temperatura de 20 a 32 °C em pressões até 0,9 kbar. Esse trabalho mostra que a ausência de RNA permite a dissociação do agregado proteico (hélice cilíndrica) em pressões relativamente baixas.

- Alta pressão e baixa temperatura em TMV: dissociação sem desnaturação.

O efeito de temperatura abaixo de 0 °C em proteínas em solução é pouco conhecido, pois apenas recentemente tem sido utilizada alta pressão como estratégia para evitar o congelamento da amostra. Outras estratégias incluem a introdução de solventes ou solutos para diminuir a temperatura de congelamento, processo que interfere diretamente na proteína, pois agem como agentes “protetores”, ou como caotrópicos. É de se esperar que o estudo da desnaturação de proteínas a baixa temperatura ofereça informações biofísicas muito ricas, porque a alta temperatura, que representa o procedimento clássico para o estudo de desnaturação, envolve ganho de energia na macromolécula de ordem de grandeza muito acima das forças envolvidas na manutenção da sua conformação, portanto sujeitas a interpretações muito complexas.

A utilização de baixa temperatura (-18 °C) combinada a alta pressão permitiu atingir níveis de dissociação mais altos (Fig. 6), que se manteve por pelo menos várias horas após retorno à temperatura ambiente e pressão atmosférica, conforme pode ser observado em estudos de gel filtração em HPLC (Fig. 13B), e através de análise por microscopia eletrônica (Fig. 14 e 15). Esse processo de dissociação permitiu, assim, o cálculo de parâmetros termodinâmicos da partícula viral a 2,5 kbar, mais precisamente relacionada à associação proteína-proteína. Ao mesmo tempo, os dados obtidos referentes ao centro de massa do espectro de emissão de fluorescência (Fig. 7) indicam que o ambiente de resíduos aromáticos praticamente não foram alterados (desvio para o vermelho de 100 cm^{-1}), portanto a estrutura das subunidades dissociadas mantiveram conformação próxima à forma nativa. Assim, o processo de dissociação observado não foi acompanhado de desnaturação significativa. Experimentos utilizando CPMV (Da Poian

e cols., 1995) indicam desnaturação na incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a 2,5 kbar, com desvio para o vermelho de cerca de 300 cm^{-1} . Nessas mesmas condições, mas em presença de uréia 1,0 M, ocorreu deslocamento mais significativo (700 cm^{-1}).

Poderíamos simplesmente considerar que, para quantificar o estado de agregação do TMV, não é adequado monitorar o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência, pois ocorreu grande discrepância comparando-se com os resultados obtidos de espalhamento de luz. Isso foi observado em várias condições experimentais, inclusive na presença de uréia. Outros agregados de muitas subunidades também apresentam esse problema. A hemoglobina gigante de *G. paulistus*, por exemplo, apresentou resultados mais confiáveis e repetitivos utilizando-se como parâmetro de dissociação o espalhamento de luz (Silva e cols., 1989; Bonafé e cols., 1991; Bonafé, comunicação pessoal). A hemocianina do gastrópode *M. ovatus*, embora tenha apresentado certa concordância entre as duas metodologias, após retorno à pressão atmosférica a recuperação do valor de centro de massa foi bem maior que do espalhamento de luz (Bonafé e cols., 1994), novamente se mostrando como parâmetro não confiável para avaliar a dissociação. Assim, sem uma avaliação rigorosa, pode ser arriscado considerar a fluorescência para avaliação quantitativa do processo de dissociação de partículas virais ou proteínas de grande número de subunidades, sendo no entanto importante para outros tipos de informações.

O gráfico de van't Hoff permitiu o cálculo de parâmetros termodinâmicos como ΔH e ΔS de dissociação por mol de subunidade dissociante, a 2,5 kbar (ΔH de $-8,23\text{ kcal/mol}$ e ΔS de $-49,60\text{ cal/K mol}$ ou $T\Delta S$ de $-14,2\text{ kcal/mol}$ a $12,5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esses dados são importantes para possibilitar uma melhor avaliação termodinâmica da dissociação do TMV. Como mencionado anteriormente, esses valores são calculados baseados na dissociação da partícula viral inteira, que pode não ocorrer, assim considerando-se processo de dissociação parcial (por exemplo 1.000 subunidades, e não as 2.130), os valores da entalpia e da entropia por mol de subunidade dissociante são praticamente coincidentes.

Seria bastante desejável a medida desses parâmetros em pressões menores para obtenção dos mesmos à pressão atmosférica através de extrapolação. Isso permitiria minimizar os efeitos da “deriva conformacional” das subunidades (Weber, 1993). Esses experimentos deverão ser realizados futuramente. Iremos, no entanto, nos basear nos valores já obtidos a 2,5 kbar. Considerando processo de associação, de modo análogo,

temos os valores de associação *por mol de subunidade* de $\Delta H = +8,23 \text{ kcal/mol}$ e $\Delta S = +49,60 \text{ cal / K mol}$ ou $T\Delta S$ de $+14,2 \text{ kcal/mol}$ a $12,5^\circ\text{C}$.

O valor de ΔS de associação positivo indica que a associação é um processo dirigido pela entropia. Esse comportamento tem sido estudado em diversos sistemas. Uma revisão de Weber (1993) mostra que para diversas proteínas oligoméricas já estudadas, a contribuição da variação de entalpia na variação de energia livre de associação é sempre menor que a contribuição de entropia, expressa como $T\Delta S$, e é mais frequentemente positiva (considerar a relação (2), $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Assim, as mudanças de entalpia quase sempre ocorrem em direção oposta à associação, e em contraste, as variações de entropia ($T\Delta S$) de associação são grandes e positivas, sendo sempre responsáveis pela predominância de agregados em relação a subunidades isoladas, em concentrações fisiológicas dos agregados. Weber nesse estudo interpreta o fenômeno a nível molecular, assumindo que a exposição da superfície apolar do contato proteína-proteína ao solvente resulta em grande diminuição da entropia do solvente, e que o processo reverso é promovido pelo aumento da entropia da água.

Da Poian e cols., 1995, em experimentos de dissociação de CPMV a 2,5 kbar e abaixamento de temperatura, e em concentrações de uréia de até 2,5 M, consideraram os parâmetros termodinâmicos ΔG , ΔH e $T\Delta S$ aparentes, ou ΔG^* , ΔH^* e $T\Delta S^*$, para expressar processos em “steady-state”, uma vez que observaram desnaturação irreversível subsequente à dissociação. Em ausência de uréia, esses parâmetros por mol de subunidade de associação foram, respectivamente, -10 , $+14$ e $+24 \text{ kcal / K mol}$, sugerindo que a manutenção da estrutura viral se deve a um processo dirigido pela entropia.

Embora α a 2,5 kbar e -18°C corresponda a 0,72, a estrutura desse agregado não foi definida em estudos com microscopia eletrônica, Fig. 14. É possível que essa estrutura envolva agregados de proteína capsídica (trimeros, hexâmeros, etc). A utilização da sonda Bis-ANS permitiu obter uma idéia sobre a conformação das subunidades na dissociação por pressão. O aumento da interação Bis-ANS e proteína capsídica com o abaixamento da temperatura, Fig. 12, indica exposição de sítios hidrofóbicos, e provável interação com resíduos positivamente carregados que normalmente se ligam ao RNA viral. A presença de uréia 6,0 M, por outro lado, levou à diminuição da interação sonda-proteína. Comportamento semelhante foi observado para o CPMV. Da Poian e cols., 1994 e 1995, mostraram que a desnaturação do CPMV por pressão (2,5 kbar) e à temperatura ambiente

foi obtida de maneira reversível apenas em presença de uréia 5,0 M, e o decréscimo da temperatura a -20 °C, mesmo em ausência de uréia (ou à -15 °C em presença de uréia 1,0 M) levou à desnaturação aparentemente irreversível. Experimentos utilizando Bis-ANS mostraram interação acentuada da sonda com o CPMV (aumento de intensidade de fluorescência de cerca de 5 vezes) a 2,5 kbar, -10 °C, e em presença de uréia 1,5 M, comparando-se com o controle (2,5 kbar a 20 °C). Em presença de uréia 5,0 M, 2,5 kbar e 20 °C ocorreu menor interação proteína- Bis-ANS que o controle sem uréia. A interpretação desse resultado é que, embora ambas as condições experimentais sejam desnaturantes, apenas no último caso ocorreria manutenção da interação proteína capsídica-RNA. No sistema alta pressão/baixa temperatura/uréia 1,5 M ocorreria separação proteína capsídica-RNA, possibilitando maior interação da proteína com o Bis-ANS, explicando o aumento de fluorescência. Esse modelo também explica a reversibilidade do processo de dissociação/ desnaturação apenas quando ainda é mantida a ligação com o RNA (presença de uréia 5,0 M e 2,5 kbar). No caso do TMV também deve ocorrer apenas dissociação parcial proteína capsídica-RNA (α máximo de 0,72, Tabela 1 e Fig. 6), sem processo de desnaturação (desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência desprezível, Fig. 7). Esses dois fatores devem estar relacionados com a reversibilidade em meses da dissociação por pressão e baixa temperatura. O abaixamento de temperatura também pode ter promovido uma conformação da proteína tipo “molten globule”, um estado intermediário entre a forma nativa e formas desnaturadas, na qual ocorrem exposição de sítios de hidrofobicidade ao Bis-ANS (Silva e cols., 1992).

- Alta pressão em presença de uréia: dissociação *versus* desnaturação .

O mecanismo da interação da uréia com proteínas não está totalmente esclarecido, mas pode se relacionar com interações do tipo uréia-cadeia polipeptídica, ou solubilização de grupamentos apolares da proteína, principalmente aromáticos (Scholtz, e cols., 1995). O efeito da uréia em concentrações subdesnaturantes, se considerarmos como agente inerte nessas condições, seria basicamente o aumento da osmolaridade do meio. Isso implicaria no aumento de estabilidade da partícula viral sobre pressão através da diminuição da água livre do meio (Weber e cols., 1996). A desestabilização do vírus sob pressão apenas em concentração de uréia 2,5 M demonstra que esse efeito é

insignificante, e que deve ocorrer interação direta da uréia com a proteína capsídica. Isso também foi observado para o CPMV (Da Poian e cols., 1994) e para o bacteriófago R17 (Da Poian e cols., 1993). Nesse último caso, a falta de dependência de concentração na curva de dissociação desse vírus por pressão foi parcialmente revertida em presença de uréia entre 2,5 e 5,0 M. Weber e cols., 1996, propuseram um modelo teórico que explica esse efeito da uréia através da ligação da mesma em vários sítios das subunidades, facilitando a dissociação. Assim, as diferentes populações de oligômeros, heterogêneas quanto à energia livre de associação, estariam igualmente suceptíveis à ligação com uréia, ocorrendo um equilíbrio rápido de ligação em cada sítio ligante de uréia. Isso promoveria um alargamento da curva de distribuição de energia livre de associação, e ao mesmo tempo seu aumento em média. O equilíbrio rápido de uréia nos sítios ligantes representariam uma homogeneização de energia livre de associação, explicando a restauração de dependência de concentração na dissociação por pressão.

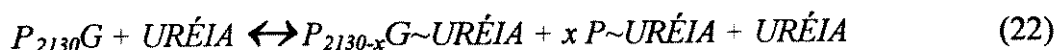
O estudo do efeito de concentração de TMV na curva de dissociação por pressão seria muito importante se considerarmos os atuais conhecimentos acima mencionados, mas infelizmente não existem ainda dados nesse sentido. Esse tema será objeto de estudo em futuro próximo.

A dissociação por pressão em presença de uréia induziu uma diminuição do volume de associação, calculado através da equação (5). Podemos reescrever essa relação como:

$$\ln K_p = \ln K_{am} + p\Delta V_p / RT \quad (21)$$

considerando ΔV_p como variação de volume de associação calculada pela dissociação induzida por pressão. É importante a utilização dessa notação, pois o ΔV^0 também pode ser calculado através da dependência de concentração na curva de dissociação por pressão, passando a se chamar ΔV_c . Como mostra a Tabela 3, uréia em concentração igual a 2,5 M diminuiu o ΔV_p de 16,3 a 3,1 ml / mol subunidade dissociante. Esse achado foi diferente do observado para o CPMV, componente “top” (desprovido de RNA), que apresentou ΔV_p constante com a concentração de uréia (33 ml / mol subunidade dissociante entre 0,75 e 2,25 M de uréia) (Da Poian e cols., 1994).

A diferença na variação de volume para o TMV pode estar relacionada com o efeito dissociativo da uréia à pressão atmosférica. Assim, como se mostrou na Fig. 18, ocorre uma dissociação parcial importante em presença de uréia 2,5 M, correspondente a 77% de dissociação, embora sem processo de desnaturação significativa, pois apresentou desvio para o vermelho desprezível (Fig. 19). Assim, a dissociação por pressão nessas condições pode estar relacionada a uma estrutura bastante diferente comparando-se com a dissociação por pressão em ausência de uréia, pois pode ter sofrido um processo da seguinte natureza:



que representa o TMV nativo, $P_{2130}G$, interagindo com uréia, ocorrendo dissociação parcial a $P_{2130-x}G$, onde x teria um valor na ordem de 1.640 (ou 77% de 2130) em uréia 2,5 M. Nesse processo não está sendo representada uréia de modo estequiométrico. Supondo que a dissociação ocorresse ao acaso considerando diversas regiões do vírus, haveria formação de uma estrutura relativamente homogênea, com certa manutenção da estrutura do TMV, mas com inúmeras “cavidades” no capsídeo proteico. Se por outro lado a dissociação por uréia ocorresse apenas em poucas regiões localizadas, haveria uma estrutura mais heterogênea, com destruição em certas partes do virion, com presença de parte da partícula viral intacta. Microscopia eletrônica do TMV em presença de uréia 2,5 M (Fig. 23) mostra imagens com “falhas” na superfície do capsídeo correspondentes à penetração do contrastante, e também mostra diferentes regiões apresentando conjuntos de fragmentos de TMV em certa continuidade, correspondendo possivelmente a partes subseqüentes de partículas virais individuais. Aparentemente corresponde a dissociações localizadas de muitas subunidades, que ocorrem em certas regiões do virion. Esse fenômeno é compreensível, pois a uréia está em contato com todo capsídeo, mas a dissociação deve ocorrer de maneira cooperativa, isto é, dissociação local induzindo mais dissociação na vizinhança.

Essa hipótese poderia também explicar a grande queda de ΔV_p calculado em presença de uréia. A significativa dissociação inicial induzida em diversos locais do virion poderia manter inúmeras microcavidades na superfície do capsídeo, expondo ao solvente parte das interfaces proteína-proteína das subunidades não dissociadas.

Posteriormente, a dissociação dessas subunidades pode apresentar valores de ΔV_p bem inferiores, correspondentes apenas à exposição ao solvente das áreas que não tinham contato com o mesmo. Supondo que a variação de volume tenha certa proporcionalidade com a área na qual ocorreu a exposição ao solvente, poderíamos estimar que a presença de uréia 2,5 M aumentaria em média 5 vezes (a relação de volumes, 16,3/3,1) a exposição de interfaces ao solvente, considerando evidentemente as subunidades ainda associadas. Seria interessante a obtenção do ΔV_c a partir do efeito de concentração na curva de dissociação por pressão, para melhor avaliar esse sistema. Outro processo relevante é a desnaturação por pressão em presença de uréia 2,5 M. É provável que ocorra um deslocamento de equilíbrio no sentido da dissociação através da diminuição da concentração de subunidades dissociadas com o aumento de pressão:



e uma conseqüente interferência no ΔV_p , aumentando seu valor calculado. Como vimos, o valor de ΔV_p obtido diminuiu com o aumento da concentração de uréia, sendo mantida a hipótese acima para essa diminuição.

O cálculo da variação de volume de desnaturação por pressão em presença de uréia 2,5 M obtido através do centro de massa do espectro de fluorescência, $103,5 \text{ ml} / \text{mol}$ subunidade desnaturada, foi baseado no mesmo experimento na qual se obteve a variação de volume de dissociação. Na literatura (Suarez, 1995, pag. 60), foi estudada a tropomiosina quanto a variação de volume de desnaturação por pressão (em ausência de uréia), que foi de $25,5 \text{ ml/mol}$. Considerando processo de dissociação, com $n = 2$, o valor calculado no mesmo experimento foi de $80,5 \text{ ml/mol}$.

A dissociação do TMV tendeu a preceder a desnaturação, sendo que a última só ocorreu na presença de uréia em concentrações a partir de 2,5 M. Parece existir, pelo menos, dois modos distintos de inclusão de uréia no TMV, um deles promovendo dissociação e, outro, desnaturação.

O retorno de 2,5 kbar à pressão atmosférica mostrou recuperação parcial nos valores de centro de massa espectral, principalmente em menores concentrações de uréia. A reversibilidade do processo de desnaturação por pressão e uréia (símbolos abertos) parece ocorrer mais significativamente em concentrações de uréia mais baixas.

A maior interação da sonda Bis-ANS com o TMV foi observada em concentrações de uréia entre 2,5 e 4,0 M, na qual já é observado elevado processo de dissociação e a desnaturação se torna significativa. Aparentemente deve ocorrer forte interação de resíduos de aminoácidos positivamente carregados nas formas parcialmente dissociadas/desnaturadas do TMV com o Bis-ANS, levando a um aumento de intensidade de fluorescência. Esses resíduos podem corresponder àqueles responsáveis pela interação capsídio-RNA, que devem sofrer exposição ao solvente nesse processo. Além disso deve ocorrer exposição de sítios hidrofóbicos nessas condições, que tendem a se desestruturarem na concentração de uréia 6.0 M..

BIBLIOGRAFIA

- 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 and disassembly. *J.Gen. Virol.* **61**, 137-141.
- Bonafé, C.F.S.; Villas-Boas M.; Suarez M.C. & Silva J.L.(1991). Reassembly of a large protein promoted by nonprotein factors. Effects of calcium and glycerol on the association of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13210- 13216.
- Bonafé, C.F.S.; Araujo, J.R. & Silva, J.L. (1994). Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry.* **33**, 2651-2660.
- Buzzell, A.(1960). Action of urea on tobacco mosaic virus. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1636.
- Creighton, T.E. (1990). Protein folding. *Review article. Biochem. J.* **270**, 1-16.
- Da Poian, A.T.; Oliveira, A.C.; Gaspar, L.P. & Silva, J.L. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *J.Mol.Biol.* **231**, 999-1008.
- 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. & Silva, J.L. (1995). Cold denaturation of an icosahedral virus. The role of entropy in virus assembly. *Biochemistry* **34**, 2672-2677.
- Foguel, D.; Teschke, C.M.; Prevelige Jr., P.E. & Silva, J.L. (1995). Role of entropic interactions in viral capsids: Single amino acid substitutions in P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability. *Biochemistry* **34**, 1120-1126.
- Franks, F. (1995). Protein destabilization at low temperature. *Adv. in Protein Chem* **26**, 105-139.
- Frossard, P. (1982). The erythrocrucorin of *Eisenia fetida* I. Properties and subunit structure. *Biochem. Biophys. Acta* **704**, 524-534.
- Giddings, N.J., Allard, H.A. & Hide, B.H. (1929). *Phytopathology*, **19**, 749, appud Lauffer, M.A. & Dow, R.B. (1941). The denaturation of tobacco mosaic virus at high pressures. *J. Biol. Chem.* **140**, 509-518.
- Goelet, P.; Lomonossoff, G.P.; Butler, P.J.G.; Akam, M.E.; Gait, M.J. & Karn, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**, 5818-5822.
- Hirth, L. & Richards, K.E. (1981). Tobacco mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **26**, 145-199.
- Horowitz, P.; Prasad, V & Luduena, R.F. (1984). Bis (1,8-anilinonaphthalenesulfonate). A novel and potent inhibitor of microtubule assembly. *J.Biol.Chem.* **259**, 14647-14650.
- Jaenicke, R.; Lüdemann, H.-D. & Schade, B.C. (1981). High pressure effects on the endothermic association of tobacco mosaic virus protein. *Biophys.Struct.Mech.* **7**, 195-203.

- King, L. & Weber, G. (1986a). Conformational drift and cryoinactivation of lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **25**, 3637-3640.
- King, L. & Weber, G. (1986b). Conformational drift of dissociated lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **25**, 3632-3637.
- Klug, A. (1972). Assembly of tobacco mosaic virus. *Fed. Proc.* **31**, 30-42.
- Lamy, J.N. & Maaroufi, H. (1993). The quaternary structure of *Scorpio maurus* hemocyanin: comparison with *Androctonus Australis* hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* **104B**, n° 2, 215-227.
- Lauffer, M.A. & Dow, R.B. (1941). The denaturation of tobacco mosaic virus at high pressures. *J. Biol. Chem.* **140**, 509-518.
- Lown, D.A.; Thirsk, H.R. & Lord Wynne-Jones (1968). Effect of pressure on ionization equilibria in water at 25°C. *Trans. Faraday Soc.* **64**, 2073-2080.
- Neuman, R.C.Jr.; Kauzmann, W. & Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionizations in aqueous buffers. *J. Phys.Chem.* **77**, 2687-2691.
- Noordam, D. (1973). In Identification of plant viruses. Methods & experiments. Centre for Agricultural and Documentation Wafeningen.
- Paladini, A.A. (1980). Enolase dissociation induced by high pressure. A study by fluorescence polarization. Ph.D. Thesis. University of Illinois, USA.
- Paladini, A.A. & Weber, G. (1981). Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* **52(3)**, 419-427.

- Raghavendra, K.; Salunke, D.M.; Caspar, D.L.D. & Schuster, T.M. (1986). Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: Electron microscopy observations. *Biochemistry* **25**, 6276-6279.
- 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.
- Rosen, C.G. & Weber, G. (1969). Dimer formation from 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate catalyzed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. *Biochemistry* **8**, 3915-3920.
- Ruan, K. & Weber, G. (1988). Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic pressure. *Biochemistry* **27**, 3295-3301.
- Ruan, K. & Weber, G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **28**, 2144-2153.
- Scholtz, J.M.; Barrick D.; York E.J., Stewart J.M. & Baldwin R.L. (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 185-189.
- Silva, J.L.(1993) . The drifted and molten-globule state of proteins dissociated by pressure. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **26**, 383-393.
- Silva, J.L. & Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **199**, 149-159.

- Silva, J.L. & Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113.
- 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.
- 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.* **262**, 15863-15868.
- Silva, J.L.; Silveira, C.F.; Correia Jr., A.; Pontes, L. (1992). Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of Arc Repressor. *J. Mol. Biol.* **223**, 545-555.
- Silva, J.L.; Foguel, D.; Da Poian, A.T.; Prevelige, P.E. (1996). The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 166-175.
- Stanley, W.M. & Lauffer, M.A. (1939). Desintegration of Tobacco Mosaic Virus in urea solution. *Science* **89**, 345-347.
- Suarez, M.C. (1995). Estados conformacionais do domínio N-terminal recombinante da troponina C e da tropomiosina induzidos por alta pressão hidrostática e baixas temperaturas. Tese de mestrado. Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- 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. (1991). Pressure and low-temperature stability of oligomeric enzymes. *New Trends in Biol. Chem.* Ozawa, T., ed., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. 225-238.
- Weber, G. (1993). Thermodynamics of the association and the pressure dissociation of oligomeric proteins. *J.Phys.Chem.* , **97**, 7108-7115.
- Weber, G. (1995). Van't Hoff revisited: enthalpy of association of protein subunits. *J.Phys.Chem.* , **99**, 1052-1059.
- Weber, G. & Drickamer, H.G. (1983). The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 89-112.
- Weber, G.; Da Poian, A.T. & Silva, J.L. (1996). Concentration dependence of the subunit association of oligomers and viruses and modification of the latter by urea binding. *Biophys. J.* **70**, 167-173.
- Xu, G.J. & Weber, G. (1982). Dynamics and time-averaged chemical potential of proteins: Importance in oligomer association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5268.