

C1  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

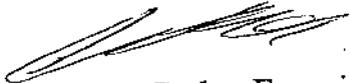


JOSÉ LUIS DA ROCHA SANTOS

EFEITO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E AGENTES  
DESNATURANTES NA ESTABILIDADE DO VÍRUS DO  
MOSAICO DO TABACO (TMV)

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
JOSÉ LUIS DA ROCHA SANTOS  
aprovada pela Comissão Julgadora.

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

  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

Campinas, 2008

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA \_\_\_\_\_  
Sa 59e  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BOCL MM594  
PROC 16-129-08  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO 11,00  
DATA 08-07-08  
BIB-ID 439687

ii

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

**Sa59e** Santos, José Luis da Rocha  
Efeito de alta pressão hidrostática e agentes  
desnaturantes na estabilidade do Vírus do Mosaico do  
Tabaco (TMV) / José Luis da Rocha Santos. – Campinas,  
SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Carlos Francisco Sampaio Bonafé.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Alta pressão hidrostática. 2. ~~Uréia~~. 3. Vírus do  
mosaico do tabaco. I. Bonafé, Carlos Francisco Sampaio.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Effect of high hydrostatic pressure and desnaturants agents in the stability of Tobacco Mosaic Virus (TMV).

**Palavras-chave em inglês:** High hydrostatic pressure; Urea; Tobacco mosaic virus.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Carlos Francisco Sampaio Bonafé, Julio Roberto Mignaco, Maria Goreti de Almeida Oliveira, Carlos Henrique Inácio Ramos, Ricardo Aparício.

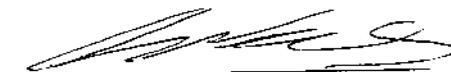
**Data da defesa:** 18/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 18 de Fevereiro de 2008.

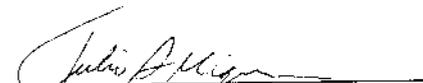
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. CARLOS F. S. BONAFÉ (ORIENTADOR)



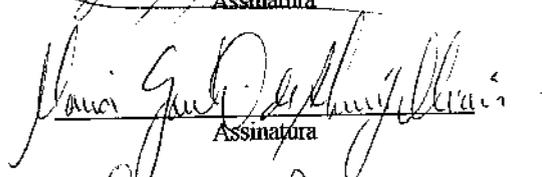
Assinatura

Prof. Dr. JULIO ALBERTO MIGNACO



Assinatura

Profª. Dra. MARIA GORETI DE ALMEIDA OLIVEIRA



Assinatura

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE INÁCIO RAMOS



Assinatura

Prof. Dr. RICARDO APARICIO



Assinatura

Prof. Dr. JERSON LIMA DA SILVA

Assinatura

Profª. Dra. IONE SALGADO

Assinatura

Prof. Dr. CLAUDIO C. WERNECK

Assinatura

2008150122

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

## AGRADECIMENTOS

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

À Prof. Dra. Ione Salgado, pelo apoio e incentivo no ingresso deste curso, em 2002.

Ao Prof. Dr. Ricardo Aparicio, pelas estimulantes discussões envolvendo dinâmica de fluorescência e estrutura de proteínas.

Ao laboratório de LNLS por permitir a realização de experimentos.

Aos meus grandes amigos, Gustavo e Juliana, presentes em todos os momentos ao longo destes anos.

Aos amigos do Laboratório de Termodinâmica de Proteínas, Bispo, Douglas e Joelma, pelas agradáveis discussões de bioquímica.

Aos meus pais, Joaquim e Maria Aparecida, ao meu irmão Eron e sua esposa Sílvia, e a filha deles, minha afilhada, Maria Clara, pelo incentivo.

Dedico este trabalho especialmente à minha esposa Gisele, pelo seu amor, carinho, paciência, apoio e sacrifícios ao longo destes anos, e aos nossos filhos, Lucas e Gabriel, que hoje são minha razão de viver.

A todos os meus familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

E acima de tudo a Deus, por estar sempre presente, dando-me forças e guiando meu caminho.

*"A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte."*

Mahatma Gandhi

*Dedico este trabalho aos meus pais e, em especial, a minha esposa Gisele e aos nossos filhos Lucas e Gabriel.*

## ÍNDICE

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 – Aplicação de alta pressão hidrostática: dissociação de proteínas.....	01
1.2 – Uso de alta pressão hidrostática: dissociação e inativação de vírus .....	03
1.3 – Uso de alta pressão hidrostática combinada com agentes desnaturantes: desnaturação de proteínas e vírus .....	05
1.4 - Estrutura do TMV .....	08
1.5 - Dissociação do TMV dentro da célula hospedeira.....	12
<b>2 - OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 – Objetivo geral .....	13
1.5 – Objetivos específicos.....	13
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
3.1 - Reagentes .....	15
3.2 - Purificação do TMV.....	15
3.3 - Equipamento de alta pressão hidrostática .....	16
3.4 – Estudos espectroscópicos: espalhamento de luz e fluorescência.....	19
3.5 - Estudos de espalhamento de luz e fluorescência no TMV sob Pressão .....	21
3.6 - Dicroísmo circular .....	22
3.7 - Gel filtração em cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	23
3.8 - Microscopia eletrônica .....	23
3.9 - Considerações teóricas: Termodinâmica da dissociação do TMV.....	24
3.10 - Termodinâmica da dissociação e desnaturação do TMV em presença de uréia .....	24
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	31

4.1 - Efeito da uréia sobre o TMV em pressão atmosférica .....	31
4.2 - Efeito da alta pressão hidrostática combinada com uréia sobre o TMV .....	36
4.3 - Efeito do hidrocloreto de guanidina (GnHCl) sobre o TMV: comparação do processo de desnaturação com uréia .....	50
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1 - Efeito da uréia e pressão sobre o TMV nos processos de dissociação e desnaturação .....	59
5.2 - Espectro de fluorescência na estrutura do TMV .....	64
5.3 - Comparação da estequiometria de uréia nos processos de dissociação e desnaturação encontrada em outros vírus.....	71
5.4 - Efeito do hidrocloreto de guanidina (GnHCl) sobre o TMV: comparação do processo de desnaturação com a uréia.....	78
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>8 - ANEXOS</b>	

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Representação da estrutura molecular do GndHCl e da uréia.
- FIGURA 2. Desenho do TMV e dos grupos carboxílicos existentes entre suas subunidades.
- FIGURA 3. Representação dos tipos de arranjos da proteína capsídica do TMV.
- FIGURA 4. Foto do gerador de pressão, do fluorímetro, das cubetas e da câmara de alta pressão.
- FIGURA 5. Efeito da uréia sobre a intensidade de espalhamento de luz e sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV.
- FIGURA 6. Microscopia eletrônica do TMV em diferentes concentrações de uréia a pressão atmosférica.
- FIGURA 7. Espectros de dicroísmo circular do TMV em diferentes concentrações de uréia a pressão atmosférica.
- FIGURA 8. Efeito da pressão em combinação com uréia (2,5 M) sobre as propriedades espectroscópicas do TMV incubado em dois diferentes tempos, em 17 e 180 minutos.
- FIGURA 9. Efeito do tempo sobre o TMV em presença de 2,5 M de uréia pressurizado de 0,1 a 220 MPa em 90 segundos.
- FIGURA 10. Efeito da pressão em combinação com uréia sobre as propriedades espectroscópicas do TMV.
- FIGURA 11. Grau de dissociação e desnaturação do TMV.
- FIGURA 12. Gráfico de  $\ln K_{[U],p}$  e  $\ln K_{den,[U],p}$ .
- FIGURA 13. Efeito da uréia sobre a energia livre de Gibbs e variação de volume de dissociação e desnaturação do TMV.
- FIGURA 14. Efeito da uréia sobre o grau de dissociação e desnaturação do TMV em diferentes pressões (0,1 MPa, 110 MPa e 220 MPa).
- FIGURA 15. Cromatografia de gel filtração em HPLC do TMV em diferentes valores de uréia e pressão.
- FIGURA 16. Efeito do GndHCl sobre as propriedades espectroscópicas do TMV.
- FIGURA 17. Microscopia eletrônica do TMV a pressão atmosférica em diferentes concentrações de GndHCl.

FIGURA 18. Efeito da pressão e GndHCl sobre os desvios de centro de massa espectral da emissão de fluorescência do triptofano do TMV e grau de desnaturação do TMV.

FIGURA 19. Gráfico de  $\ln K_{den,[U],p}$  e energia livre de Gibbs de desnaturação do TMV, em presença de GndHCl.

FIGURA 20. Cromatografia de gel filtração em HPLC do TMV em diferentes valores de GndHCl e pressão.

FIGURA 21. Efeito da uréia e do GndHCl sobre o grau de desnaturação do TMV em pressão atmosférica e sob pressão de 220 MPa e efeito da pressão, uréia e GndHCl sobre os desvios de centro de massa espectral da emissão de fluorescência do triptofano do TMV em pH ácido.

FIGURA 22. Esquema dos processos de dissociação e desnaturação do TMV induzidos por agentes físicos (temperatura e pressão) e químicos (pH e uréia).

FIGURA 23. Representação da estrutura do TMV.

FIGURA 24. Detalhes dos triptofanos na proteína capsídica do TMV.

Tabela 1 – Cálculo da estequiometria de uréia nos processos de dissociação e desnaturação de diversos vírus da literatura.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

BMV	“Brome mosaic vírus” (vírus do mosaico do bromo)
C	Concentração
CMV	“Cowpea mosaic vírus”
C-terminal	Terminal carboxila
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxiribonucléico
FMDV	“Foot-and-Moth-Disease Vírus” (Vírus da febre aftosa)
FHV	“Flock House Virus”
GndHCl	Hidrocloreto de Guanidina

HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
K	Constante de equilíbrio de dissociação a pressão atmosférica
$K_{den}$	Constante de equilíbrio de desnaturação a pressão atmosférica
M	Molar
MPa	Mega Pascal
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
RNA	Ácido ribonucléico
TMV	Vírus do mosaico do tabaco
VSV	Vírus da estomatite vesicular
$S_p$	Intensidade de espalhamento de luz sob pressão
$S_r$	Intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada
$S_i$	Intensidade de espalhamento de luz da forma associada
R	Constante universal dos gases
R 17	Bacteriófago R 17
Trp	Triptofano
U.A.	Unidade arbitrária
$\alpha$	Grau de dissociação
$\Delta G_U$	Varição de energia livre de dissociação
$\Delta G_{den,U}$	Varição de energia livre de desnaturação
$\Delta V$	Varição de volume de dissociação e desnaturação
$\nu$	Coefficiente estequiométrico (de uréia no processo de dissociação)
$\lambda$	Coefficiente estequiométrico (de uréia no processo de desnaturação)
$\mu\text{L}$	Microlitro

## RESUMO

Os vírus são estruturas auto-associáveis muito eficientes, porém, pouco é conhecido sobre a termodinâmica que governa essa associação dirigida. Em altos níveis de pressão ocorre dissociação do TMV ou desnaturação quando a pressão é combinada com uréia. Para um melhor entendimento de tais processos nós calculamos os parâmetros termodinâmicos aparentes de dissociação e desnaturação do TMV, assumindo uma condição de estado estacionário "steady-state condition". Esses processos podem ser monitorados pela diminuição de espalhamento de luz da solução viral devido ao processo de dissociação e pelo desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência, que ocorre com o processo de desnaturação. Nós determinamos a estequiometria aparente de uréia considerando a reação de equilíbrio de dissociação e desnaturação das subunidades do TMV, as quais forneceram, respectivamente, 1,53 e 11,1 mols de uréia/mol de subunidade de TMV. As condições de dissociação e desnaturação foram atingidas em uma via próxima da reversível, permitindo a determinação de parâmetros termodinâmicos. Análises de gel filtração em HPLC, microscopia eletrônica e dicroísmo circular confirmaram os processos de dissociação e desnaturação. Os cálculos das estequiometrias aparentes de uréia de vários vírus baseados em resultados espectroscópicos de artigos recentes mostraram que os processos de dissociação e desnaturação seguem uma estequiometria similar, sugerindo uma interação similar uréia-vírus entre estes sistemas. A desnaturação do TMV utilizando GndHCl foi mais eficiente que a uréia, apresentando estequiometria de 7,50 mols de GndHCl /mol de subunidade de TMV.

**ABSTRACT**

Viruses are very efficient self-assembly structures, but little is understood about the thermodynamics governing this directed assembly. At higher levels of pressure occurs dissociation of TMV or when pressure is combined with urea, denaturation occurs. For a better understanding of such processes, we investigated the apparent thermodynamic parameters of dissociation and denaturation by assuming a steady-state condition. These processes can be measured considering the decrease of light scattering of a viral solution due to the dissociation process, and the red shift of the fluorescence emission spectra, that occurs with the denaturation process. We determined the urea stoichiometry considering the equilibrium reaction of TMV dissociation and subunit denaturation, which furnished, respectively, 1.53 and 11.1 mols of urea/mol of TMV subunit. The denaturation and dissociation conditions were arrived in a near reversible pathway, allowing the determination of thermodynamic parameters. Gel filtration HPLC, electron microscopy and circular dichroism confirmed the dissociation and denaturation processes. The calculation of apparent urea stoichiometry of several other viruses based on spectroscopic results from earlier papers showed that dissociation and denaturation processes follow similar stoichiometries, suggesting a similar virus-urea interaction among these systems. The TMV denaturation was more efficient in the presence of GndHCl, with stoichiometry of 7.50 mols of GndHCl /mol of TMV subunit.

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Aplicação de alta pressão hidrostática: dissociação de proteínas

A maioria das funções biológicas é executada por proteínas multiméricas de menor ou maior complexidade como ribossomos, nucleoproteínas, enzimas alostéricas, entre outras. Entretanto pouco se conhece sobre detalhes que governam as interações entre as subunidades destes agregados. A termodinâmica de interação proteína-proteína é uma área de fundamental importância na compreensão de sistemas biológicos.

Nos últimos anos, progressos nessa área têm sido realizados através da utilização de alta pressão hidrostática, ferramenta que promove dissociação de proteínas sem significantes efeitos na estrutura terciária das mesmas ou ligações covalentes presentes (Silva & Weber, 1993). Esta poderosa ferramenta, assim, torna possível o estudo de detalhes no equilíbrio entre monômeros e oligômero, bem como o entendimento sobre as forças que determinam as interações entre as subunidades (Weber & Drickamer, 1983, Silva & Weber, 1993).

A dissociação por alta pressão ocorre devido à contração de volume nesse processo. As subunidades expõem a interface proteína-proteína ao solvente, e esta nova interação promove organização do solvente, que tende a ocupar menor espaço (Weber & Drickamer, 1983). Fatores que devem contribuir para a contração de volume correspondem à liberação de espaços não preenchidos na interface devido às “imperfeições” no contato entre subunidades, e a interação do solvente com resíduos polares e apolares expostos na dissociação (Silva *et al.*, 2001).

Segundo o princípio de Le Chatelier, a pressão desloca o equilíbrio da reação para o sentido da formação dos componentes que ocupam o menor volume, ou seja, para a forma

dissociada. Com a despressurização, a reassociação pode ocorrer com aumento de volume no processo. Estudos utilizando dissociação por pressão mostram que as subunidades muitas vezes se reorganizam diferentemente das subunidades da proteína nativa, fenômeno denominado “deriva conformacional”, com a proteína podendo permanecer em sua nova conformação após o processo de dissociação/associação (Silva & Weber, 1993).

Em muitos dímeros e tetrâmeros foram observados na forma reassociada pós pressão uma perda da capacidade de associação e perda da função, como por exemplo, diminuição de atividade enzimática (Weber, 1986). Outra propriedade descoberta utilizando alta pressão é a heterogeneidade quanto à energia livre de associação em proteínas com número de subunidades maior que dois. Isso foi verificado através de experimentos nos quais se observou pouca ou nenhuma dependência de concentração na curva de dissociação de proteínas por pressão. (Silva & Weber, 1988, Silva *et al.*, 1989, Bonafe *et al.*, 1994). A hemoglobina extracelular do anelídeo *Glossoscolex paulistus* (3300 kDa, 108 subunidades) foi a primeira proteína descrita na literatura que apresentou total independência de concentração na curva de dissociação por pressão (Silva *et al.*, 1989, Bonafe *et al.*, 1991). Recentemente foi correlacionada a dissociação por pressão desta proteína com o aumento da susceptibilidade à oxidação da forma ferrosa à férrica. Em pH alcalino observou-se também aumento da susceptibilidade à oxidação desta hemoglobina, e isso provavelmente está relacionado à tendência que essa hemoglobina tem de dissociar nesta condição de pH (Bispo *et al.*, 2005). Recentemente observamos essa facilitação através das curvas de dissociação por pressão desta hemoglobina em diferentes condições de pH, e isso permitiu quantificar os prótons envolvidos nesse processo (Bispo *et al.*, 2007).

## 1.2 - Uso de alta pressão hidrostática: dissociação e inativação de vírus

Um modelo interessante de agregado protéico se relaciona às partículas virais. Os vírus possuem um capsídeo formado por inúmeras subunidades protéicas, sendo de particular interesse o estudo da dissociação por pressão e da deriva conformacional ocorrida neste processo (Silva, 1993). A interação proteína-proteína, sem dúvida, assume enorme importância em estruturas virais.

Um aspecto comum no ciclo de todos os vírus é a montagem do capsídeo viral a partir de suas subunidades protéicas constituintes. Os vírus são estruturas notavelmente estáveis, e sua estabilidade originou-se necessariamente dos contatos entre as subunidades. Essa interação entre subunidades deve ser delicadamente balanceada entre a habilidade de formar um capsídeo estável, para proteger por longos períodos de tempo o material genético do meio, e a capacidade de dissociar-se sob determinadas condições para liberar ou expor o ácido nucléico quando ligado ou dentro da célula hospedeira. Essa enorme mudança na energia da associação é uma propriedade essencial das estruturas virais, mas não foram ainda completamente compreendidas. A dissociação dos vírus utilizando alta pressão hidrostática é vista como uma nova ferramenta para compreensão desse tipo de processo (Silva *et al.*, 2002).

Silva e Weber, (1988), investigaram o efeito de diferentes níveis de pressão sobre o BMV, "*brome mosaic virus*", e observaram uma dissociação reversível do capsídeo deste vírus em pressão de 140 MPa, induzindo aproximadamente 75% de dissociação viral. Acima deste nível de pressão a organização do capsídeo protéico do BMV se altera bruscamente, com formação de agregados amorfos no retorno à pressão atmosférica. Isso deve acontecer devido à mudanças conformacionais apresentadas pelas subunidades

separadas do capsídeo protéico do vírus, diminuindo a energia livre de associação entre elas, levando-as a uma associação aparentemente randômica.

A forma associada do virion é bastante estabilizada pela presença do RNA viral, conforme observou-se para o vírus do mosaico do "cowpea" (CPMV) (Da Poian *et al.*, 1994) e o vírus do mosaico do tabaco (TMV) (Bonafe *et al.*, 1998). Os parâmetros termodinâmicos de dissociação por pressão calculados para o TMV demonstraram que o processo é dirigido predominantemente pela entropia (Bonafe *et al.*, 1998).

Recentemente determinamos a estequiometria de prótons através do estudo da dissociação por pressão do TMV em diferentes valores de pH (Santos *et al.*, 2004). Isso foi motivado pelo fato que já se conhece há várias décadas a dissociação alcalina deste vírus, o que significa ser o próton um importante estabilizador da forma associada do TMV. Como veremos adiante, a utilização dessa metodologia foi estendida para vários outros sistemas, inclusive na determinação estequiométrica de uréia nos processos de dissociação e desnaturação, e do hidrocloreto de guanidina (GndHCl) no processo de desnaturação.

A dissociação viral por pressão tem permitido investigar os mecanismos envolvidos nos processos de infecção viral em células hospedeiras, fornecendo informações termodinâmicas importantes a respeito destes sistemas (Da Poian *et al.*, 1995, Gomes *et al.*, 2003). Esses estudos são bastante relevantes em aplicações biotecnológicas e médicas, tais como as observadas em processos de esterilização e no desenvolvimento de vacinas antivirais. Neste caso, a compreensão dos mecanismos envolvidos durante a dissociação protéica pode conduzir ao melhoramento da imunogenicidade e a inativação viral (Heremans, 1982, Jurkiewicz *et al.*, 1995, Oliveira *et al.*, 1999, Bonafê *et al.*, 2000, Gaspar *et al.*, 2001, Pontes *et al.*, 2001, Gomes *et al.*, 2003, Ishimaru *et al.*, 2004).

### **1.3 - Uso de alta pressão hidrostática combinada com agentes desnaturantes: desnaturação de proteínas e vírus**

O enovelamento de proteínas e processos de agregação, por outro lado, representam fenômenos semelhantes, e são relacionados ao acesso de solvente em vários estados conformacionais. Esses processos podem ser caracterizados com auxílio de alta pressão hidrostática, como no caso de proteínas envolvidas com doenças neurodegenerativas e amiloidogênicas (Lima *et al.*, 2006). A desnaturação de proteínas, que envolve mudanças estruturais mais drásticas, é há muito tempo alvo de intenso estudo em sistemas biológicos, pois auxilia o entendimento de mecanismos e forças que influenciam na conformação e estabilidade dessas macromoléculas. A utilização de alta pressão hidrostática combinada com agentes químicos surge como um novo método para estudar e perturbar a estabilidade das proteínas (Balny, 2006).

Fenômenos relacionados à desnaturação são freqüentes em sistemas biológicos, como equilíbrio dinâmico entre estados nativos e conformações desnaturadas nas células, ou a conversão, muitas vezes enzimática, de algumas proteínas para estados “desenovelados” para possibilitar o transporte através de bicamadas lipídicas. O “turnover” de proteínas nas células, por outro lado, está muitas vezes relacionado com estados desnaturados (Dill & Shortle, 1991). Assim, o detalhamento termodinâmico do processo de desnaturação é essencial para a melhor compreensão desses fenômenos. Agentes desestabilizadores químicos, como uréia e GndHCl, são muito utilizados para esse tipo de estudo (Greene & Pace, 1974, Pace, 1986, Courtenay *et al.*, 2001).

O mecanismo de interação da uréia com a proteína não está totalmente esclarecido, mas pode ser através de interações desse composto com a cadeia polipeptídica, ou através

de solubilização de grupamentos apolares da proteína, principalmente resíduos aromáticos (Scholtz *et al.*, 1995). Uréia em concentrações subdesnaturantes (abaixo de 2,5 M) em combinação com alta pressão promove desestabilização de diferentes vírus em alta pressão, (Da Poian *et al.*, 1993, Da Poian *et al.*, 1994, Gaspar *et al.*, 1997, Bonafe *et al.*, 1998, Schwarcz, 2004). Uréia em concentrações entre 2,5 e 5,0 M promove reversão parcial da falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão do bacteriófago R17 (Da Poian *et al.*, 1993).

A alta pressão hidrostática tem auxiliado avaliar e quantificar o efeito de agentes desnaturantes na dissociação e desnaturação de agregados protéicos e em partículas virais, como no caso do TMV. Foi observado que a alta pressão induz desnaturação do TMV em presença de concentrações subdesnaturantes de uréia, como 2,5 M (Bonafe *et al.*, 1998).

Nos modelos de desnaturação por uréia propostos na literatura não é mencionado o processo de dissociação prévia à desnaturação, ou a estequiometria do agente desnaturante tanto em relação à dissociação quanto à desnaturação (Ferreon & Bolen, 2004, Makhataдзе, 1999, Scholtz *et al.*, 1995). Neste trabalho utilizou-se o TMV como modelo de interação proteína-agente desnaturante, e determinou-se a estequiometria de uréia nos processos de dissociação e desnaturação. Isso foi obtido de maneira análoga à estequiometria da participação de prótons na dissociação do TMV (Santos *et al.*, 2004), portanto através de estudos em diferentes concentrações desse agente desnaturante. O efeito do GndHCl no TMV também foi alvo de estudo no presente trabalho. A inclusão desse outro agente desnaturante foi principalmente devido à sua natureza bem diferente comparando-se com a uréia, que não possui carga, enquanto o GndHCl possui carga positiva (Figura 1). Isso é bastante conveniente para aplicar também o modelo aqui proposto, que envolve interação estequiométrica agente desnaturante-proteína. Será visto que, de modo semelhante à uréia,

a interação é prontamente quantificável. Embora, a uréia e o GndHCl serem utilizados amplamente na desnaturação de proteínas, poucos estudos comparativos e quantitativos da ação destes agentes em proteínas têm sido realizados, os resultados encontrados nesta tese mostram o efeito destes agentes sobre o TMV e fornecem tais dados comparativos. Nossos achados devem ainda contribuir para o entendimento das forças que mantêm a estabilidade da estrutura nativa do TMV e os mecanismos envolvidos nos processos de dissociação e desnaturação.

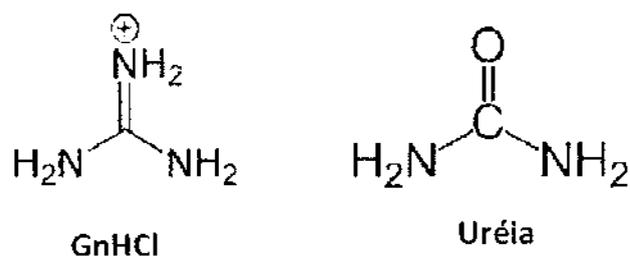


FIGURA 1. Representação da estrutura molecular do GndHCl e da uréia.

#### 1.4 - Estrutura do TMV

O TMV é um fitopatógeno bastante estudado que produz manchas e descolorações nas folhas do tabaco, conforme seu nome sugere. Esse vírus, cuja massa molecular é de 40.000 kDa, é um excelente modelo para estudo de montagem viral por seu fácil isolamento e manipulação. O TMV é constituído de um cilindro de cerca de 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro, que consiste de 2130 cópias de proteínas capsídica (17,5 kDa, 158 resíduos de aminoácidos), formando uma hélice de  $16 \frac{1}{3}$  de subunidades por volta, com um canal interno (Goelet *et al.*, 1982). O material genético deste vírus é uma fita simples positiva de RNA, com 6.400 nucleotídeos (2.000 kDa), enovelado internamente ao capsídeo protéico formando uma hélice na qual cada subunidade protéica se liga a 3 nucleotídeos (Hirth & Richards, 1981). A Figura 2A, mostra o desenho do TMV e suas partes constituintes.

Dependendo das condições de força iônica e pH, a proteína capsídica polimeriza-se de diferentes modos, Figura 3. Por exemplo, em pH 8,0 e alta força iônica, ocorre formação de partículas com coeficiente de sedimentação 27S, 37S ou mais. Em pH 7,0 e baixa força iônica, ocorre a formação de discos duplos de 20S, mas que não se agregam. Em pH acima de 7,0 e baixa força iônica, a proteína se encontra com polimerização bastante limitada, observando-se monômeros, talvez dímeros, trímeros e, em menor percentagem, associação em agregados maiores. Em pH abaixo de 7,0 e baixa força iônica, a proteína capsídica se associa formando longas hélices, semelhante à estrutura protéica do capsídeo do vírus nativo. Em pH 7,0 e média força iônica são observadas apenas proto-hélices, com  $39 \pm 2$  subunidades por volta, similares às estruturas das longas hélices mencionadas acima. Em pH neutro e baixa força iônica (condições que se assemelham às fisiológicas), a proteína

capsídica forma hélices somente na presença de RNA viral (Klug, 1972, Hith & Richards, 1981),

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

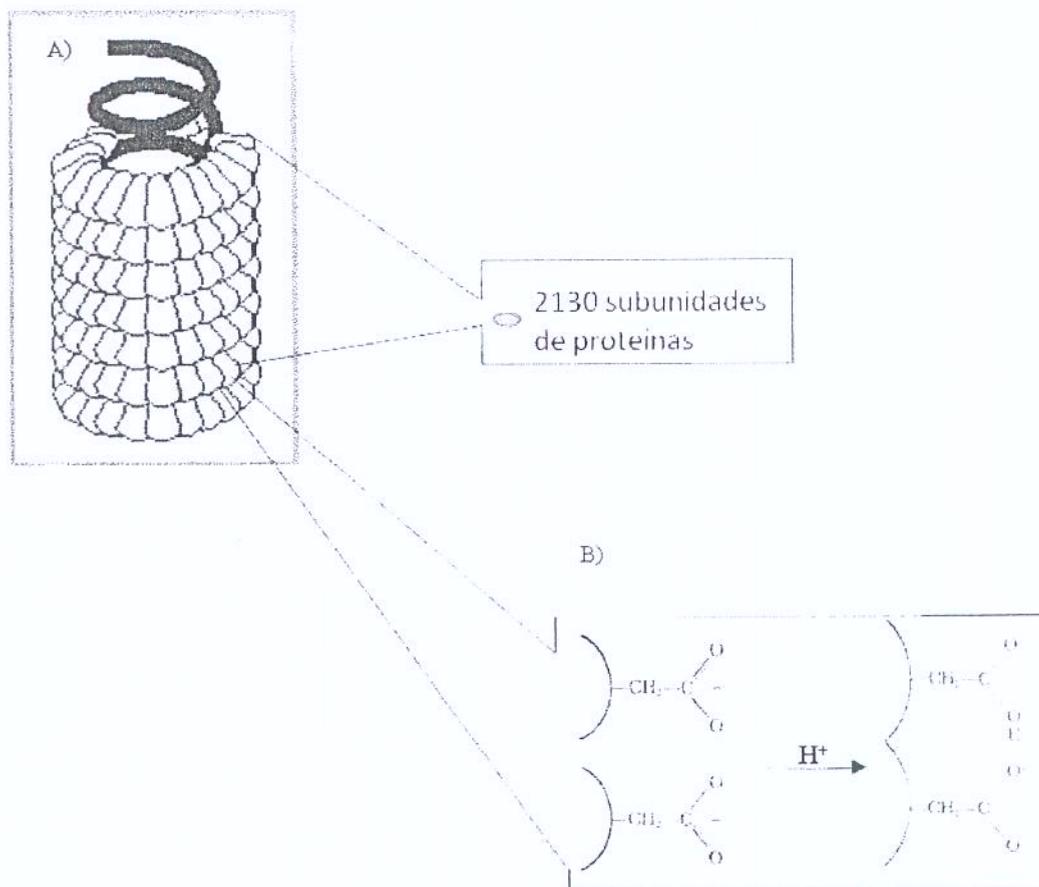


FIGURA 2. A) Desenho esquematizando o TMV e seus componentes, adaptado de Stubbs, 1999. B) grupos carboxílicos de resíduos de glutamato e/ou aspartato localizados entre as interfaces das subunidades do TMV, na ausência e presença de  $H^+$ , respectivamente, adaptado de Klug, 1972.

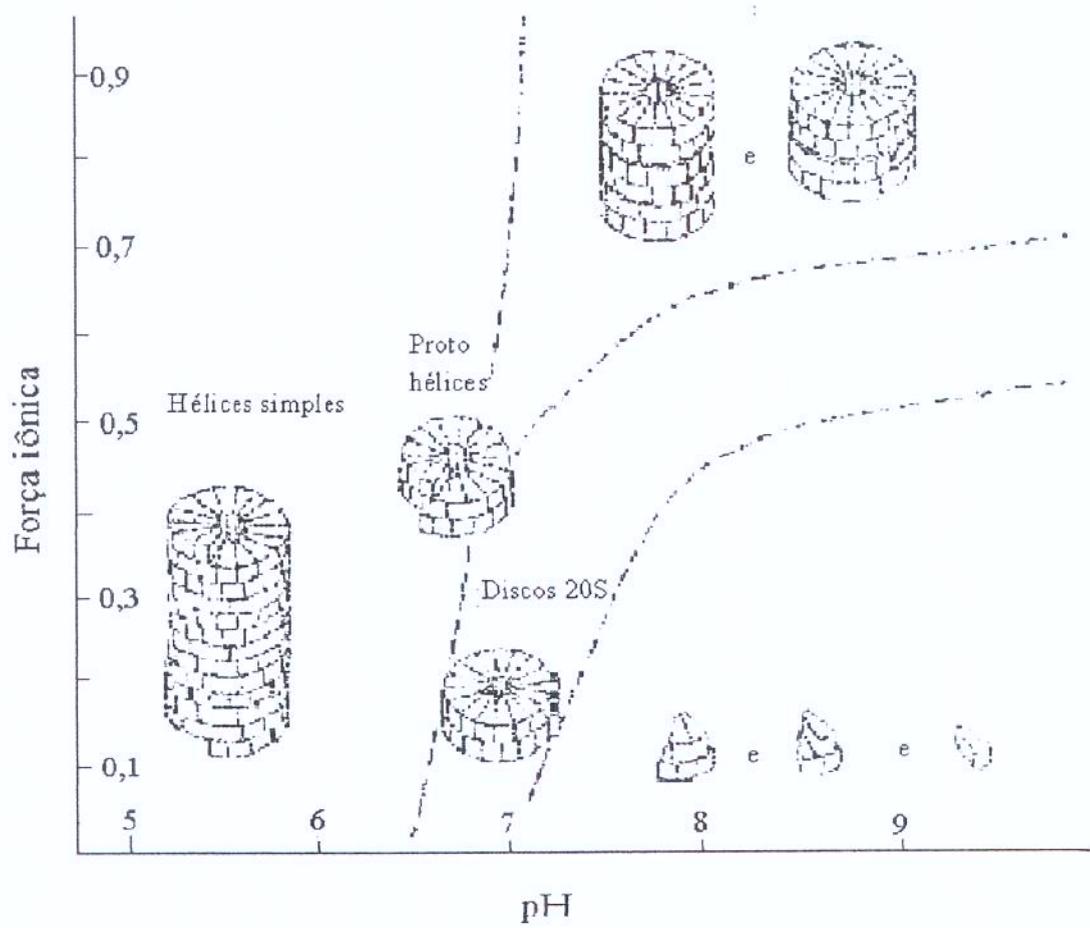


FIGURA 3. Tipos de arranjos da proteína capsídica do TMV, em diferentes condições de pH e força iônica. Esquema adaptado de Hirth & Richards, 1981.

### 1.5 - Dissociação do TMV dentro da célula hospedeira

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

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade do TMV frente à ação de agentes físicos (alta pressão e temperatura) e químicos (uréia e GndHCl), para melhor compreensão dos mecanismos de interações proteína-proteína e proteína-agente desnaturante.

### 2.2 – Objetivos específicos

- Acompanhar mudanças na estabilidade e dinâmica das partículas de TMV utilizando medidas espectroscópicas como fluorescência, espalhamento de luz, dicroísmo circular, e técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).
- Obtenção de parâmetros termodinâmicos da dissociação e desnaturação do TMV através da utilização de alta pressão hidrostática em diferentes concentrações de uréia. A partir dos dados de intensidade de espalhamento de luz e centro de massa do espectro de emissão de fluorescência pode-se quantificar o grau de dissociação e desnaturação.
- Determinação dos valores estequiométricos de uréia nos processos de dissociação e desnaturação do TMV, através das curvas de dissociação e desnaturação em diferentes condições de pressão e uréia.
- Comparação da estequiometria de dissociação e desnaturação do TMV por uréia com estequiometria calculada pela mesma metodologia proposta, para outros vírus descritos na literatura.
- Através dos dados de fluorescência (que indica mudanças estruturais), fazer uma classificação para os três triptofanos existentes no TMV quanto a sua exposição ao solvente, onde foram analisadas as contribuições de suas fluorescências para os processos de dissociação e desnaturação.

- Estudar o processo de desnaturação do TMV através de alta pressão hidrostática em diferentes concentrações de GndHCl e determinação da estequiometria deste agente envolvida nesse processo.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q. A uréia e o GndHCl usados para os experimentos foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os experimentos foram realizados a 5 °C com tampão Triz HCl 100 mM, pH 7,0. A escolha do tampão Triz HCl foi devido à baixa dependência de pKa em função da pressão.

A concentração de vírus utilizada nos experimentos foi de 0,25 mg/mL.

#### 3.2 - Purificação do TMV

A purificação do TMV foi obtida pela adaptação do método descrito por Asselin & Zaitlin (1978) (“Método PEG – Celite – Triton X-100 – fosfato”). As folhas de tabaco (“*Nicotiana tabacum*”) infectadas pelo vírus foram homogenizadas com solução de  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  0,5 M em ascorbato de sódio 0,5 % (m/v), na proporção de 1,3 mL/g de tecido fresco. Manteve-se o material à 4 °C. A suspensão foi filtrada em filtro de nylon, clarificando-se com celite (5g/100mL de solução), e centrifugada a 10.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi filtrado e o vírus precipitado por adição de polietilenoglicol 6.000 e NaCl, em concentrações finais de 3% e 1% em massa, respectivamente. Após 10 min sob agitação e repouso por 20 min em banho de gelo, a suspensão foi novamente centrifugada a 10.000 x g por 30 min. O precipitado foi ressuspenso em um quarto do volume original com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

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

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

### 3.3 - Equipamento de alta pressão hidrostática

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão "HIP" que é conectado à câmara de pressão hidrostática modelo "ISS HP", Figuras 4A e 4B, respectivamente. Essa câmara possui três janelas ópticas de safira, através das quais realizam-se medidas espectroscópicas das amostras a pressões de até 250 MPa, limite que essas janelas toleram. No interior da câmara coloca-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume de aproximadamente 1,2 mL que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. Para evitar contato da amostra com o fluido que transmite a pressão (etanol), a cubeta foi selada com um tubo de polietileno cuja extremidade foi fechada por aquecimento, Figura 4C. Esse tubo

colapsado permite a equalização da pressão entre o meio hidrostático e a amostra dentro da cubeta, evitando ao mesmo tempo a mistura dos líquidos. A cubeta é fixada em uma base cilíndrica metálica para evitar o movimento desta no interior da bomba. Utiliza-se etanol absoluto como meio líquido para a transmissão da pressão por possuir índice de refração próximo ao do quartzo, minimizando a perda de sinal nas medidas espectroscópicas. Através de um sistema adaptado a amostra permanece sob temperatura controlada através de um banho conectado à câmara. O sistema de pressão é automatizado e controlado por um software denominado “Automa”, escrito em linguagem Delphi 5.0 e compatível com Windows. Um computador (Figura 4D) controla uma série de dispositivos, incluindo (1) um servomotor conectado a um motor de indução, que é acoplado ao pistão gerador de pressão, (2) o monocromador de excitação e o de emissão do fluorímetro, (3) os motores de passo para as fendas de excitação e emissão. O software receberá dados de um medidor de pressão via uma interface analógica conectada à placa analógico-digital de 14 bits, que permite o controle da pressão em tempo real, enquanto os dados dos fotodetectores são obtidos através de uma porta serial RS232. Todos os dados são processados no formato ASCII e plotados em gráficos  $x-y$ . Esta automatização permite que os experimentos sejam feitos utilizando valores pré-programados de pressão em tempos de incubação determinados. As medidas de fluorescência e espalhamento de luz a cada valor de pressão são obtidas por controle programado dos monocromadores e ajuste das fendas de excitação e emissão. Este ajuste é necessário, pois o sinal de espalhamento de luz é muito mais intenso que o de fluorescência, assim precisa ser coletado em uma fenda de menor abertura (adaptado de Paladine & Weber, 1981).

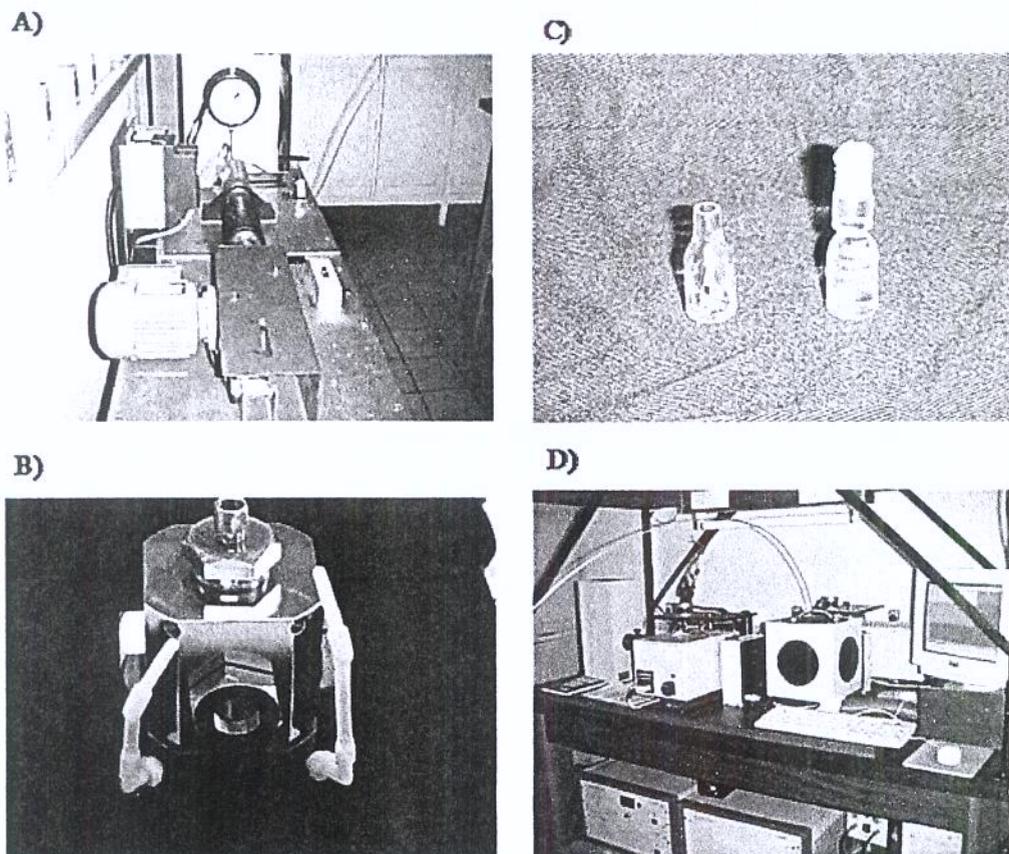


FIGURA 4. A) Gerador de pressão. B) Câmara de pressão onde são colocadas as cubetas para realização dos experimentos, mostrando as janelas por onde passam os feixes de luz para realização das medidas espectroscópicas e as mangueiras, que são conectadas ao banho com controle de temperatura. C) Cubetas de quartzo, sem ser selada (lado esquerdo) e selada com tubo plástico de polietileno usada nos experimentos. D) Fluorímetro e o computador acoplado.

### 3.4 – Estudos espectroscópicos: espalhamento de luz e fluorescência

O espalhamento de luz Rayleigh permite estimar o tamanho de partículas em solução. Uma vez que uma luz incide na partícula em determinado comprimento de onda e não é absorvida, esta espalha esta mesma luz dependendo do tamanho da mesma, ou seja, quanto maior a partícula, maior a quantidade de luz espalhada. A detecção da luz espalhada é feita a 90°, no mesmo comprimento da excitação.

O fenômeno de fluorescência consiste na propriedade que algumas moléculas possuem de absorverem luz de um determinado comprimento de onda e, após um intervalo de tempo, emitirem a luz em maior comprimento de onda. O fenômeno de fluorescência ocorre pela interação de fótons, com alto nível de energia, com moléculas transferindo sua energia para estas, levando-as para um estado excitado. Estas moléculas, posteriormente, passam por um processo espontâneo de relaxação para um estado fundamental com emissão de fótons de menor energia. O retorno das moléculas excitadas para o estado fundamental pode ocorrer com emissão luminosa, que é caracterizada como fluorescência.

O processo de absorção e decaimento de fluorescência e os inúmeros fenômenos biológicos ocorrem na mesma escala de tempo, da ordem de picosegundos (Lakowicz, 1999). Desta forma, a espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada para o estudo da dinâmica e para a obtenção de informações acerca das alterações conformacionais de proteínas submetidas a agentes perturbadores químicos (uréia ou GndHCl) e físicos (temperatura e pressão).

O fenômeno de fluorescência em proteínas pode ser aplicado de duas maneiras distintas. Em uma delas é utilizada a fluorescência de moléculas naturalmente presentes, ou

seja, os marcadores intrínsecos, como os aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina.

Em outra abordagem são usados marcadores extrínsecos, que são sondas fluorescentes que possuem a capacidade de se associar a componentes biológicos através de ligações não covalentes ou covalentes.

O principal marcador intrínseco utilizado para o monitoramento de medidas espectroscópicas de fluorescência em proteínas é o triptofano, pois este apresenta o maior rendimento quântico dos aminoácidos aromáticos e a emissão de fluorescência deste resíduo é extremamente dependente da polaridade do meio onde se encontra. Desta forma, o espectro de emissão de fluorescência de proteína é modificado conforme o microambiente experimentado pelos resíduos de triptofano. Assim, os processos de dissociação e desnaturação podem ser monitorados através das mudanças no espectro de emissão de fluorescência, e estas mudanças são analisadas através de desvio de centro de massa do espectro para comprimentos de ondas maiores. Este desvio no centro de massa é consequência da exposição dos resíduos de triptofano ao meio aquoso (Lakowicz, 1999).

Quando os resíduos de triptofanos se encontram em ambientes apolares, como por exemplo, no interior de proteínas, a emissão ocorre em comprimentos de ondas menores e portanto mais energéticos. Conforme a proteína é dissociada ou desnaturada os resíduos de triptofano passam a ser expostos ao solvente e consequentemente ocorre um desvio da emissão para comprimentos de ondas maiores, pois enquanto o fluoróforo estiver no estado excitado com a intensidade do seu momento de dipolo aumentada, parte da energia absorvida é desviada para reorientar as moléculas do solvente.

### 3.5 - Estudos de espalhamento de luz e fluorescência no TMV sob Pressão

As medidas de espalhamento de luz e os espectros de fluorescência foram registrados em um espectrofluorímetro "Edimburg FL 900", equipado com uma lâmpada fonte de xenônio.

Para obtenção dos espectros de espalhamento de luz utilizou-se comprimento de onda de 340 nm de excitação (região de pouca absorção) fazendo-se a varredura de 335 a 345 nm de emissão. A quantificação da medida de espalhamento de luz foi efetuada pela integração dos valores de intensidade obtidos durante a varredura, calculando-se portanto à área correspondente.

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

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

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

Para a obtenção dos espectros de fluorescência de triptofano as amostras virais foram excitadas com um comprimento de onda de 285 nm e a emissão foi varrida de 300 a 400 nm.

Os espectros de fluorescência à pressão  $p$  são processados para obtenção do centro de massa do espectro:

$$\nu_p = \frac{\sum \nu_i F_i}{F_i} \quad (2)$$

onde  $F_i$  se refere à fluorescência emitida em número de ondas  $\nu_i$  e a somatória é feita em intervalo abrangendo os valores aos quais  $F_i$  é significativo (Silva & Weber, 1988). 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 através de 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 poucas ou imperceptíveis mudanças na emissão máxima.

O grau de desnaturação a pressão  $p$ , se relaciona a  $\nu_i$  pela seguinte expressão:

$$\alpha_{den,p} = \left[ \frac{1 + Q(\langle \nu_p \rangle - \langle \nu_{des} \rangle)}{(\langle \nu_n \rangle - \langle \nu_p \rangle)} \right]^{-1} \quad (3)$$

sendo  $Q$  a razão de rendimento quântico entre a forma desnaturada e a forma nativa;  $\nu_p$ , o centro de massa espectral à pressão  $p$  e,  $\nu_{des}$  e  $\nu_n$ , os valores correspondentes para as formas desnaturada e nativas (Silva *et al.* 1989).

### 3.6 - Dicroísmo circular

Através da técnica de dicroísmo circular, pode-se acompanhar possíveis mudanças na estrutura secundária das proteínas capsídicas do TMV induzidas por uréia. O espectropolarímetro utilizado para os experimentos de dicroísmo circular foi "Jasco J-810 spectropolarimeter", modelo 1505 (Jasco Corp., Japan). As amostras de TMV foram

diluídas a uma concentração de proteína viral de 0,125 mg/mL em tampão Fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 e foram acondicionadas em um cubeta de quartzo de 2 milímetros de caminho óptico. As análises foram realizadas varrendo o espectro de 190 a 300 nm, com uma velocidade de 100 nm/minuto.

### 3.7 - Gel filtração em cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O estado de dissociação e desnaturação do TMV em diferentes condições de pressão, uréia e GndHCl foram monitorados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo modelo “Shimadzu HPLC system”, e a coluna de gel filtração foi a GPC 1000 (Synchropack, Inv., Linden, In). O sistema foi equilibrado em tampão Triz HCl 100 mM, pH 7,0, acetato de sódio 100 mM, pH7,0 que foi devidamente filtrado e deaerado em sistema Milipore. O fluxo empregado nos experimentos foi de 0,3 mL/min, com monitorização da absorbância a 280 nm. Considerou-se o volume de exclusão da coluna ( $V_o$ ) como o volume de eluição do TMV (40.000 kDa), e o volume total ( $V_t$ ) foi determinado utilizando-se hemoglobina humana (64 kDa). A hemoglobina extracelular do anelídeo *G. paulistus* (3300 kDa) foi utilizada para melhor avaliar os intermediários de dissociação do TMV (Santos *et al.*, 2004).

### 3.8 - Microscopia eletrônica

As microscopias eletrônicas foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão modelo “LEO 902”. As amostras foram colocadas em grades de cobre revestidas com filme de carbono, nas quais foram colocadas 5  $\mu$ L de suspensão da amostra

viral (0,25 mg/mL) por grade nas diferentes condições experimentais. Após 4 minutos as grades foram tratadas com solução contrastante de acetato de uranila 1 % (Raghavendra *et al.*, 1988, Bonafé *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2004).

### 3.9 - Considerações teóricas: Termodinâmica da dissociação do TMV

Recentemente nosso laboratório propôs o seguinte equilíbrio para descrever a dissociação do TMV, conhecidamente dependente do pH:

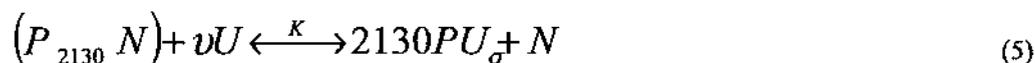


onde  $P$  é a subunidade protéica do vírus (proteína capsídica);  $N$ , o material genético (RNA);  $P_{2130}N$  representa a molécula viral;  $K_{atm}^0$  corresponde à constante de equilíbrio de dissociação a pressão atmosférica e pH de referência igual a zero, e  $\nu_H$  é o número total de prótons liberados ou absorvidos durante a dissociação (Santos *et al.*, 2004). Essa proposta permitiu o cálculo de diversos parâmetros termodinâmicos de dissociação, inclusive mostrou a estequiometria da liberação de prótons, correspondente a 0,584 mols  $H^+$ /mol de subunidade capsídica na dissociação do TMV.

### 3.10 - Termodinâmica da dissociação e desnaturação do TMV em presença de uréia

Em presença de uréia o TMV exhibe dissociação em baixas concentrações e desnaturação em altas concentrações de uréia (Bonafe *et al.*, 1998). Analogamente ao efeito

do pH sobre a dissociação do TMV, em presença de uréia o processo de dissociação pode ser considerado como:



onde  $U$  é a uréia,  $P$  é a subunidade protéica do vírus (proteína capsídica),  $N$  o material genético (RNA),  $P_{2130}N$  representa a molécula viral,  $v$  é o coeficiente estequiométrico (de uréia no processo de dissociação) e corresponde a  $v = 2130\sigma$  e  $K$  é a constante de equilíbrio de dissociação a pressão atmosférica, que corresponde a relação entre as constantes de formação de produtos e reagentes,  $k_{+1}/k_{-1}$ . Mesmo que o número de subunidades que se dissociam nestas condições experimentais fosse bem menor que 2130, os valores de energia e de variação de volume de dissociação e desnaturação por mol de subunidade, bem como os coeficientes estequiométricos de uréia nestes processos não variariam (Eqs. 21 a 23). Tal conclusão também foi observada na estequiometria de prótons na dissociação do TMV (Santos *et al.*, 2004) e na dissociação da hemoglobina extracelular de anelídeo (Bispo *et al.*, 2007). De acordo com os dados de HPLC (Figura 15), a estabilização dos produtos dissociados sugeriu uma condição de estado estacionário (*steady-state*), com aparente irreversibilidade devido a significantes mudanças conformacionais apresentadas pelas subunidades livres do TMV, ocorrendo a reação  $P \xrightleftharpoons{k_2} P^*$ , onde  $k_2$  corresponde a razão da constante deste processo. Os parâmetros termodinâmicos obtidos nesta tese foram considerados como parâmetros aparentes, os quais foram expressos com o sobrescrito “\*”. A constante aparente de dissociação corresponde a  $k^* = k_{+1}/(k_{-1} + k_2)$ . Esta condição também foi considerada para o processo de desnaturação.

O processo de desnaturação foi considerado aqui para as formas e espécies dissociadas  $P$ , as quais já estão combinadas com  $\sigma$  moléculas de uréia. Assim a correspondente reação de desnaturação torna-se:



com constante de equilíbrio de desnaturação a pressão atmosférica igual a  $K_{den}$ . Aqui  $\lambda$  representa o coeficiente estequiométrico de desnaturação por uréia.

A proposta constante aparente de equilíbrio de dissociação e desnaturação são respectivamente:

$$K^* = \frac{[PU_{\sigma}]^{2130} [N]}{[P_{2130}N][U]^v} \quad (7)$$

e

$$K^*_{den} = \frac{[PU_{\sigma+\lambda}]}{[PU_{\sigma}][U]^{\lambda}} \quad (8)$$

onde nós representamos o processo de desnaturação através do índice  $den$ .

Para uma dada concentração de uréia  $[U]$ , é possível expressar a constante aparente de dissociação  $K_{[U]}$  como:

$$K^*_{[U]} = K^*[U]^v = \frac{[P]_{[U]}^{2130} [N]_{[U]}}{[P_{2130}N]_{[U]}} \quad (9)$$

onde as respectivas espécies em concentração de ligante definida é representada com o índice "[U]". A energia aparente de dissociação então pode ser expressa como:

$$\Delta G^*_{[U]} = \Delta G^*_{U1} - vRT \ln[U] \quad (10)$$

onde  $R$  é a constante do gás ideal,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\Delta G_{[U]}$  é a correspondente variação de energia livre aparente de dissociação em concentração de uréia  $[U]=1$  M, considerado aqui como base molar.

A correlação entre a constante de dissociação em uma concentração de uréia  $[U]$  a pressão  $p$  e a pressão atmosférica, pode ser obtida através da respectiva energia livre aparente de dissociação,  $\Delta G_{[U],p}$  e  $\Delta G_{[U]}$ , como:

$$\Delta G^*_{[U],p} = \Delta G^*_{[U]} + p\Delta V \quad (11)$$

onde  $\Delta V$  representa a variação de volume aparente de dissociação. Essa relação fornece:

$$K^*_{[U],p} = K^*_{[U]} \exp(-p\Delta V / RT) = \frac{[P]_{[U],p}^{2130} [N]_{[U],p}}{[P_{2130}N]_{[U],p}} \quad (12)$$

Essa relação escrita em termos do correspondente grau de dissociação a pressão  $p$  ( $\alpha_p$ ), obtidos experimentalmente a partir de dados de espalhamento de luz, Eq. 1, em uma concentração de uréia definida, ( $\alpha_p$ ) fornece:

$$K^*_{[U],p} = K^*_{[U]} \exp(-p\Delta V / RT) = \frac{2130^{2130} C^{2130} \alpha_p^{2131}}{1 - \alpha_p} \quad (13)$$

onde  $C$  é concentração total de TMV, onde nós consideramos  $[P] = 2130\alpha_p C$ ,  $[N] = \alpha_p C$  e  $[P_{2130}N] = (1-\alpha_p)C$ . A forma logarítmica desta equação nos fornece uma relação linear igual a:

$$\ln K^*_{[U],p} = \ln K^*_{[U]} - \frac{p\Delta V}{RT} = 2130 \ln 2130 + 2130 \ln C + 2131 \ln \alpha_p - \ln(1 - \alpha_p) \quad (14)$$

O gráfico de  $\ln K^*_{[U],p}$  versus  $p$  resulta em uma reta, onde os coeficientes linear e angular da da (Eq.14) fornece valores para  $\ln K^*_{[U]}$  usado para calcular os valores de  $\Delta G^*_{[U]}$  e  $\Delta V^*$

respectivamente. Expressando  $\Delta G^*_{[U]}$  em função de  $\ln$  [uréia], obtém-se um gráfico cujo coeficiente angular representa o valor estequiométrico de uréia no processo de dissociação.

A desnaturação do TMV, mostrado na Eq. 6, pode ser expressa para uma definida concentração de uréia através de uma metodologia similar à dissociação, sendo que a respectiva constante de desnaturação  $K^*_{den,[U]}$  é:

$$K^*_{den,[U]} = K^*_{den} [U]^\lambda = \frac{[PU_{\sigma+\lambda}]_{[U]}}{[PU_\sigma]_{[U]}} \quad (15)$$

Assim, a energia livre aparente de desnaturação corresponde a:

$$\Delta G^*_{den,[U]} = \Delta G^*_{den,U1} - \lambda RT \ln[U] \quad (16)$$

onde  $\Delta G^*_{den,U1}$  é a energia livre aparente de desnaturação a uma concentração de uréia  $[U] = 1$  M.

Analogamente à equação de dissociação, Eq. 11 a 14, a constante aparente de desnaturação a pressão  $p$  pode ser obtida através da respectiva energia livre de desnaturação a uma concentração de uréia  $[U]$  como:

$$\Delta G^*_{den,[U],p} = \Delta G^*_{den,[U]} + p\Delta V_{den} \quad (17)$$

onde  $\Delta V_{den}$  representa a variação de volume aparente de desnaturação. Essa relação nos fornece:

$$K^*_{den,[U],p} = K^*_{den,[U]} \exp(-p\Delta V_{den} / RT) = \frac{[PU_{\sigma+\lambda}]_{[U],p}}{[PU_\sigma]_{[U],p}} \quad (18)$$

analogamente à Eq. 12 e 13, temos:

$$K_{den,[U],p}^* = K_{den,[U]}^* \exp(-p\Delta V_{den} / RT) = \frac{\alpha_{den,p}}{1 - \alpha_{den,p}} \quad (19)$$

onde  $\alpha_{den}$  é o grau de desnaturação da proteína, obtido experimentalmente através de dados de emissão de fluorescência (Eq. 3). A linearização pode então ser obtida como:

$$\ln K_{den,[U],p}^* = \ln K_{den,[U]}^* - \frac{p\Delta V_{den}}{RT} = \ln \alpha_{den,p} - \ln(1 - \alpha_{den,p}) \quad (20)$$

Analogamente ao processo de dissociação, através do gráfico de  $\ln K_{den,[U],p}^*$  versus  $p$ , foram obtidos os valores aparentes para  $\Delta G_{den,U}^*$  e  $\Delta V_{den}^*$ . Expressando  $\Delta G_{den,U}^*$  em função de  $\ln$  [uréia], obtém-se um gráfico cujo coeficiente angular representa o valor estequiométrico de uréia no processo de desnaturação.

Os parâmetros termodinâmicos aparentes da desnaturação do TMV por GndHCl foram obtidos através das equações 16 a 20, de maneira análoga a desnaturação por uréia.

Como relação ao processo de dissociação mencionado acima no início das considerações teóricas, se considerarmos a ordem de dissociação muito diferente de 2130, como por exemplo,  $n = 100$ , os parâmetros termodinâmicos aparentes como  $\Delta V$  ou a estequiometria de uréia pouco se alterariam. Isso pode ser verificado generalizando  $\ln K_{[u],p}^*$  para  $n$  ordem de dissociação, Eq. 14:

$$\ln K_{[u],p}^* = \ln K_{[u]}^* - \frac{p\Delta V}{RT} = n \ln n + n \ln C + (n+1) \ln \alpha_p - \ln(1 - \alpha_p) \quad (21)$$

assim, o  $\Delta G_{[u]}^*$  a pressão atmosférica por subunidade torna-se:

$$\Delta G_{[u]}^* = -RT \left( \ln n + \ln C + \left( \frac{n+1}{n} \right) \ln \alpha - \frac{1}{n} \ln(1 - \alpha) \right) \quad (22)$$

Levando-se em conta dois valores diferentes de concentrações de uréia [U2] e [U1], o respectivo  $\Delta\Delta G^*$  para dissociação, relacionado à estequiometria de uréia (Eq. 10) é:

$$\Delta\Delta G^*_{[U]} = -RT \left( \frac{n+1}{n} \ln \frac{\alpha_{[U2]}}{\alpha_{[U1]}} - \frac{1}{n} \ln \frac{1-\alpha_{[U2]}}{1-\alpha_{[U1]}} \right) \quad (23)$$

Dessa relação, tendo-se dois valores determinados de  $\alpha$  como  $\alpha_{[U2]} = 0,3$  e  $\alpha_{[U1]} = 0,8$ , e substituindo o valor de  $n=2130$  (na Eq. 23) por  $n= 100$ , o valor de  $\Delta\Delta G^*$  aumenta apenas 1,17 %, concluindo que a ordem de dissociação muda muito pouca a estequiometria de uréia por mol de subunidade. O mesmo pode ser verificado para o  $\Delta V$  por mol de subunidade dissociada.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 - Efeito da uréia sobre o TMV em pressão atmosférica

Os efeitos induzidos pela uréia sobre o TMV foram inicialmente caracterizados pelas mudanças no espectro de fluorescência do triptofano e medidas de espalhamento de luz, Figura 5. As amostras de TMV foram incubadas em concentrações crescentes de uréia (0 a 7,0 M), e após repouso de 1 hora, realizou-se as medidas espectroscópicas. Observa-se diminuição de intensidade de espalhamento de luz com o aumento da concentração de uréia até valores próximos ao espalhamento de luz do tampão. O centro de massa espectral, por outro lado, começou a apresentar desvio para o vermelho a partir de 2,5 M de uréia, e atingiu um desvio limite de  $1900\text{ cm}^{-1}$  a partir de 6,0 M de uréia, correspondendo à exposição máxima dos resíduos de triptofanos a ambientes polares. Esse acentuado desvio de centro de massa indicou significativa desnaturação. Entretanto, as curvas de variação de espalhamento de luz e centro de massa não foram sobreponíveis, indicando que o processo de dissociação precede à desnaturação (que teve início a partir de 2,5 M de uréia).

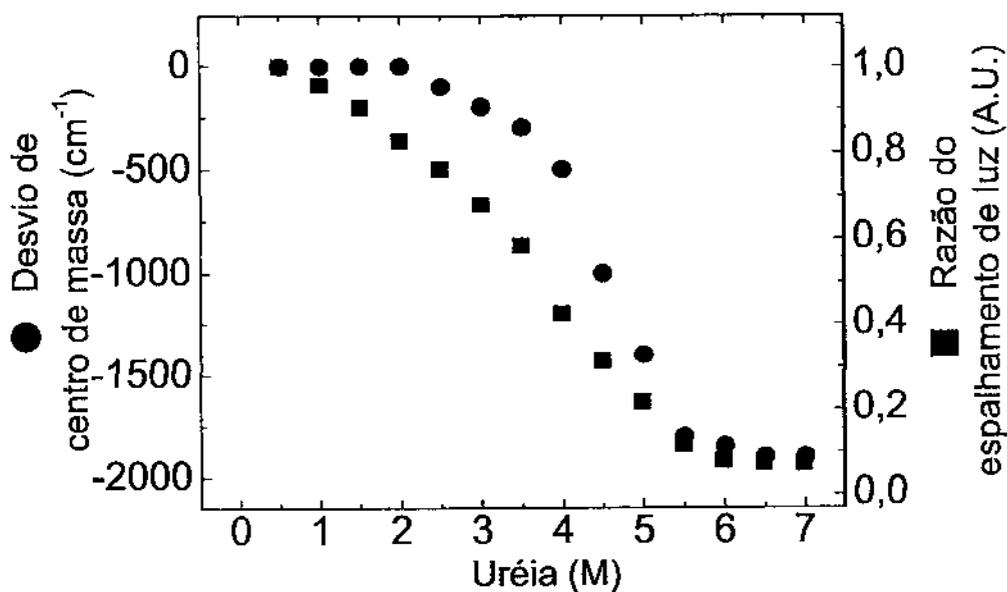


FIGURA 5. Efeito da uréia sobre a intensidade de espalhamento de luz e sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV. A solução de vírus utilizada foi de 0,25 mg/mL, as amostras estavam em tampão Tris HCl 100 mM, pH 7,0. As amostras foram preparadas e colocadas numa cubeta de quartzo e após repouso de 1h a temperatura de 5 °C foram realizadas as medidas espectroscópicas. Para as medidas de espalhamento de luz as amostras foram excitadas a 340 nm e varridas em comprimentos de ondas de 335 a 345 nm. O espalhamento de luz foi normalizado correlacionado-se 1 o espalhamento máximo. U.A. = unidade arbitrária. Para as medidas de fluorescências as amostras foram excitadas a 285 nm e varridas em comprimentos de ondas de 300 a 400 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata apresentando desvio padrão menor que os símbolos.

Microscopia eletrônica de transmissão forneceu informações adicionais sobre a organização estrutural do TMV nestas diferentes concentrações de uréia, Figura 6. A Figura 6A mostra o TMV na ausência de uréia. Nesta condição observa-se um grande número de imagens de TMV na forma íntegra e associada. Na presença de 2,0 M de uréia observa-se menor número de imagens de vírus na forma associada, Figura 6B, com relação à amostra de TMV na ausência de uréia. O aumento da concentração de uréia para 3,0 M diminuiu o número de imagens de TMV na forma íntegra e aumentou a fragmentação das partículas virais, Figura 6C. As amostras incubadas em 4,0 M de uréia não apresentaram imagens de TMV, Figura 6D, indicando dissociação elevada, de acordo com os achados espectroscópicos.

Efeitos da uréia na estrutura secundária do TMV foram observados através de dicroísmo circular, incubando-se as amostras em concentrações crescentes de uréia (0 a 8,0 M), Figura 7. O espectro de dicroísmo circular do controle sem uréia apresenta um pico negativo em torno de 215 nm, correspondendo à estrutura secundária da forma nativa. Com a adição de concentrações crescentes de uréia observa-se uma atenuação gradativa da elipticidade a 215 nm sugerindo perda da estrutura secundária da proteína capsídica do TMV, característico de processo de desnaturação. Estes dados confirmam os achados de desvio de centro de massa (Figura 5), evidenciando alterações significativas tanto na estrutura secundária quanto na terciária das proteínas capsídicas do TMV, à medida que a concentração de uréia é aumentada.

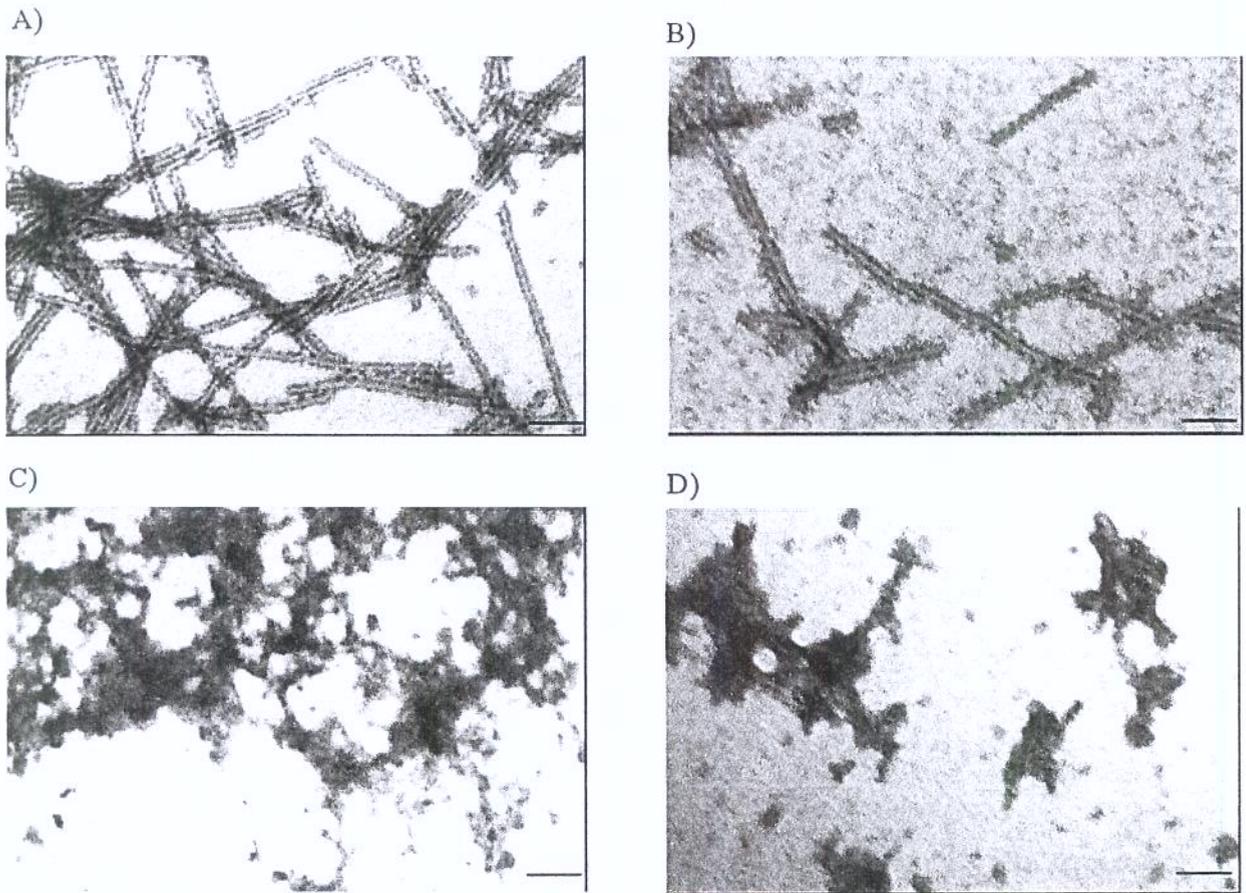


FIGURA 6. Microscopia eletrônica do TMV em diferentes concentrações de uréia a pressão atmosférica. As amostras foram preparadas e depois de 1h foram realizadas as microscopias. (A) Ausência de uréia, (B) uréia 2,0 M, (C) uréia 3,0 M e (D) uréia 4,0 M. Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. A barra de calibração corresponde a 50 nm. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

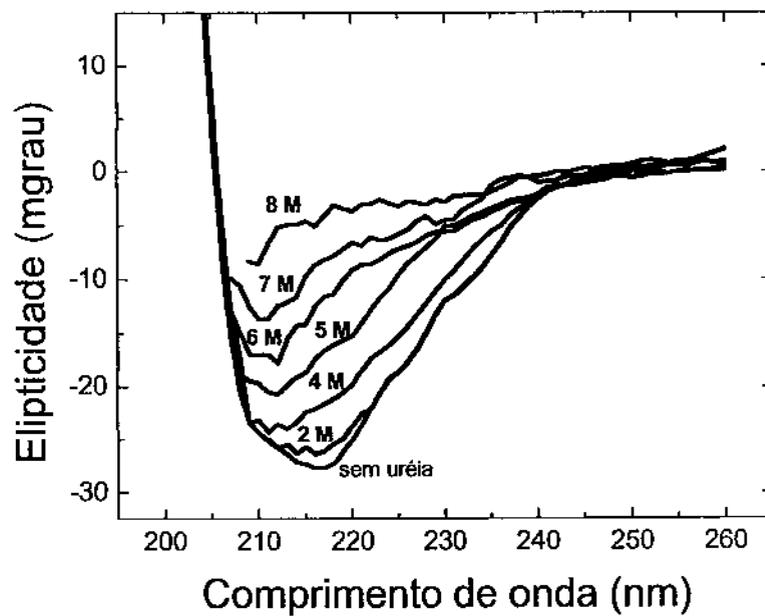


FIGURA 7. Espectros de dicroísmo circular do TMV em diferentes concentrações de uréia a pressão atmosférica. As amostras de TMV foram diluídas a uma concentração final de 0,125 mg/mL em tampão Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0, e foram colocadas em uma cubeta de quartzo de 2 mm de caminho óptico a temperatura de 5 °C. As amostras foram realizadas varrendo o espectro de 190 a 300 nm, com uma velocidade de 100 nm por minuto.

#### 4.2 - Efeito de alta pressão hidrostática combinada com uréia sobre o TMV

Inicialmente estudou-se o efeito de pressão em diferentes tempos de incubações para se ter uma melhor idéia da cinética do processo, e do tempo aceitável para atingir condições perto do equilíbrio. As Figuras 8A e 8B mostram o efeito de pressão, respectivamente, sobre a intensidade de espalhamento de luz e sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV em presença de 2,5 M de uréia em diferentes tempos de incubações a cada nível de pressão, 17 e 180 minutos. Observa-se que os resultados foram muito semelhantes para ambos os intervalos de tempos, indicando condições muito próximas do equilíbrio. A Figura 9 mostra a cinética de diminuição do espalhamento de luz do TMV (em 2,5 M de uréia) com o aumento de pressão até 220 MPa. Observa-se que em menos de 3 minutos ocorreu diminuição pela metade do espalhamento de luz, sendo que após 10 minutos praticamente não se observou diminuição adicional de espalhamento de luz.

Optou-se por realizar os experimentos nas diferentes concentrações de uréia observando um intervalo de estabilização em cada nível de pressão de 17 minutos, que corresponde a uma estabilização de mais de 99 % em relação ao equilíbrio. Assim, os processos de dissociação e desnaturação foram obtidos a partir de pontos experimentais, cada um muito perto do equilíbrio.

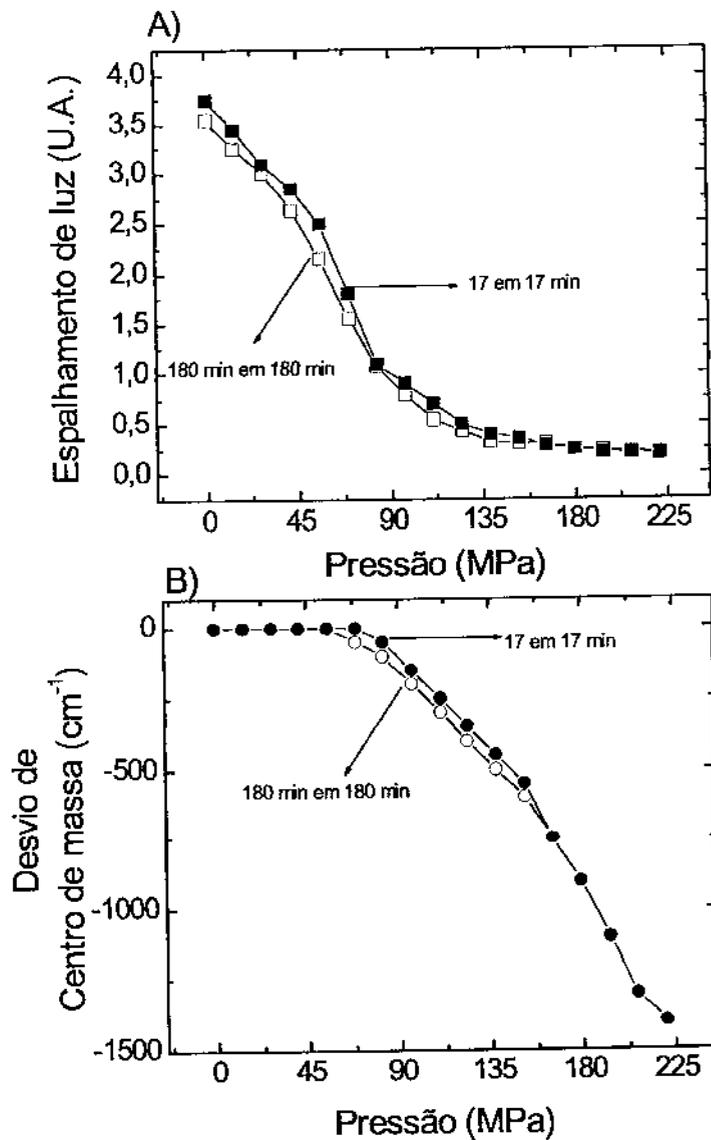


FIGURA 8. Efeito de pressão em combinação com uréia (2,5 M) sobre as propriedades espectroscópicas do TMV incubado em dois diferentes tempos, em 17 e 180 minutos. A) Sobre a intensidade de espalhamento de luz do TMV. B) Sobre o espectro de emissão de fluorescência do TMV. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

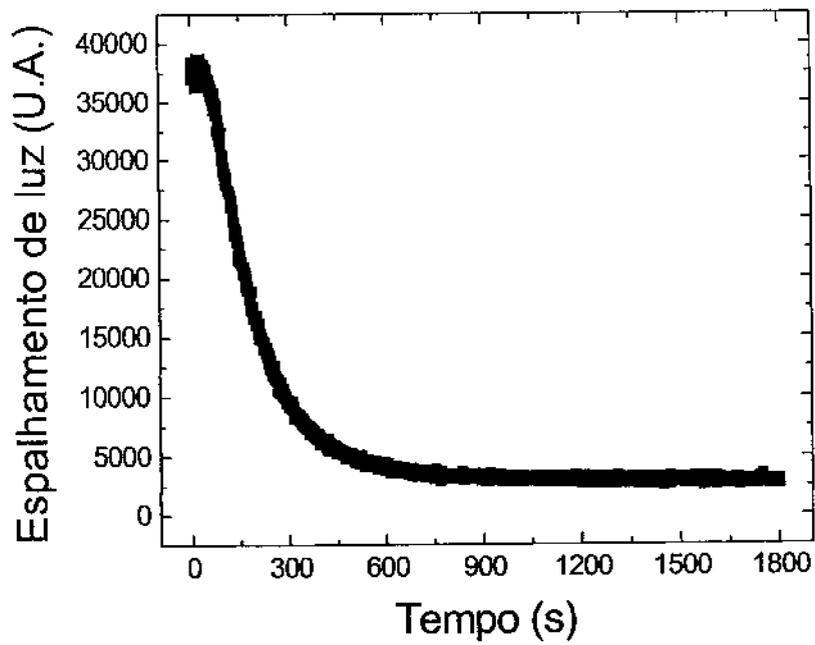


FIGURA 9. Efeito do tempo sobre o TMV em presença de 2,5 M de uréia pressurizado de 0,1 a 220 MPa em 90 segundos. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

A pressão hidrostática promove perturbações estruturais controladas e graduais, fornecendo informações mais precisas dos estados intermediários dos processos de dissociação e desnaturação. Para estes experimentos as amostras de TMV em diferentes valores de uréia foram pressurizadas até 220 MPa ( $1\text{atm} = 0,1\text{ MPa}$ ), com aumentos de 13,8 em 13,8 MPa, Figura 10A. Observa-se que a aplicação de alta pressão hidrostática provocou uma diminuição na intensidade de espalhamento de luz em todas as concentrações de uréia estudadas, até valores próximos ao valor da intensidade de espalhamento de luz do tampão, correspondendo a acentuado processo de dissociação.

O processo de desnaturação das amostras de TMV incubadas em diferentes valores de uréia e pressão foi monitorado pelo desvio de centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV, Figura 10B. Observa-se que a amostra controle (sem uréia) e com 0,5 M de uréia não apresentaram desvio de centro de massa, indicando desnaturação desprezível. Em concentrações subdesnaturantes de uréia (1,0 e 1,5 M) ocorreram discretos desvios de centro de massa para as amostras de TMV sob pressão de 220 MPa, respectivamente, com valores em torno de 250 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . A partir de 2,75 M de uréia, as amostras sob pressão de 220 MPa apresentaram um desvio de 1900  $\text{cm}^{-1}$ . Isso ocorreu, pois, a alta pressão aumentou a exposição dos resíduos de triptofanos ao solvente, acentuando o processo de desnaturação. O TMV em 6,0 M de uréia, mesmo em pressão atmosférica apresentou valores de centro de massa perto do limite máximo encontrado para outras concentrações de uréia.

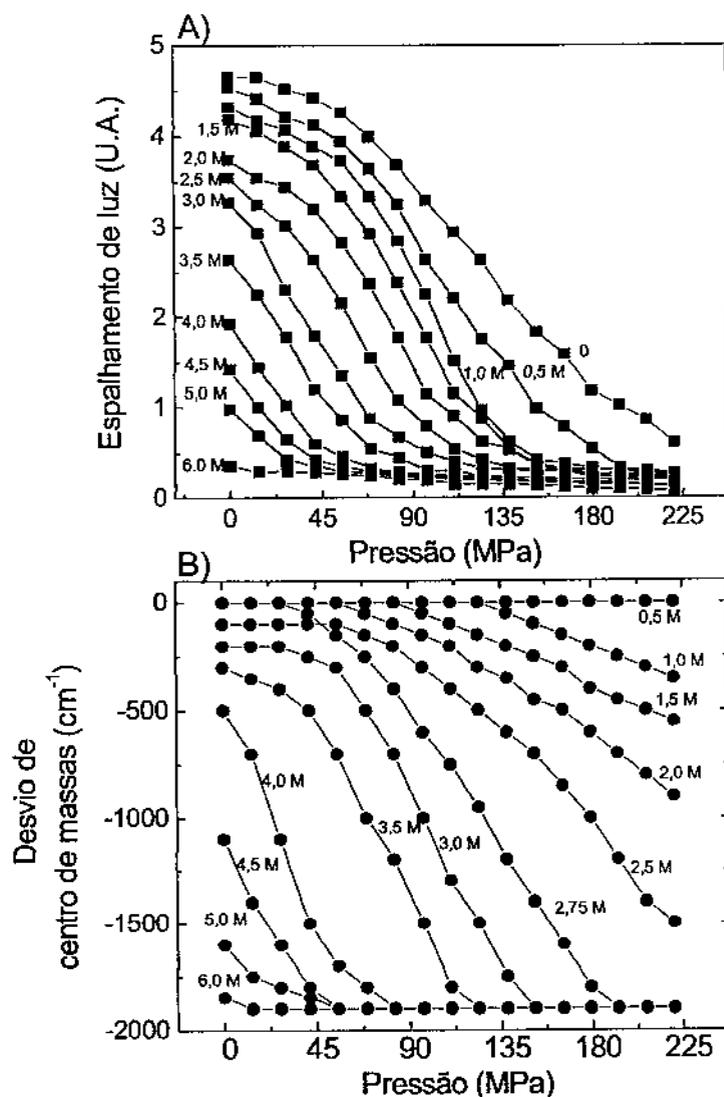


FIGURA 10. Efeito de pressão em combinação com uréia sobre as propriedades espectroscópicas do TMV. A) Sobre a intensidade de espalhamento de luz. B) Sobre os desvios de centro de massa espectral da emissão de fluorescência do TMV. Após o preparo as amostras foram submetidas à alta pressão, as medidas espectroscópicas foram realizadas 17 minutos após cada nível de pressão. Os experimentos foram feitos em triplicata apresentando desvio padrão menor que os símbolos. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

Os dados de intensidade de espalhamento de luz, Figura 10A e os dados de desvio de centro de massa, Figura 10B, através das Eqs 1 e 3, podem ser correlacionados a seus respectivos graus de dissociação e desnaturação, Figuras 11A e 11B, respectivamente. Os dados mostrados são semelhantes aos descritos para as Figuras 10A e 10B, porém, com uma melhor idéia quantitativa dos processos de dissociação e desnaturação.

Através dos dados dos graus de dissociação e desnaturação (e Eqs. 14 e 20) foram calculados as formas logarítmicas das constantes de dissociação e desnaturação  $\ln K^*_{[U],p}$  e  $\ln K^*_{den,[U],p}$ , respectivamente Figuras 12A e 12B. As retas traçadas nestes pontos experimentais fornecem os coeficientes lineares e angulares, que correspondem, respectivamente, aos valores aparentes de variações de energia livre e volume nos processos de dissociação e desnaturação, Figura 13A.

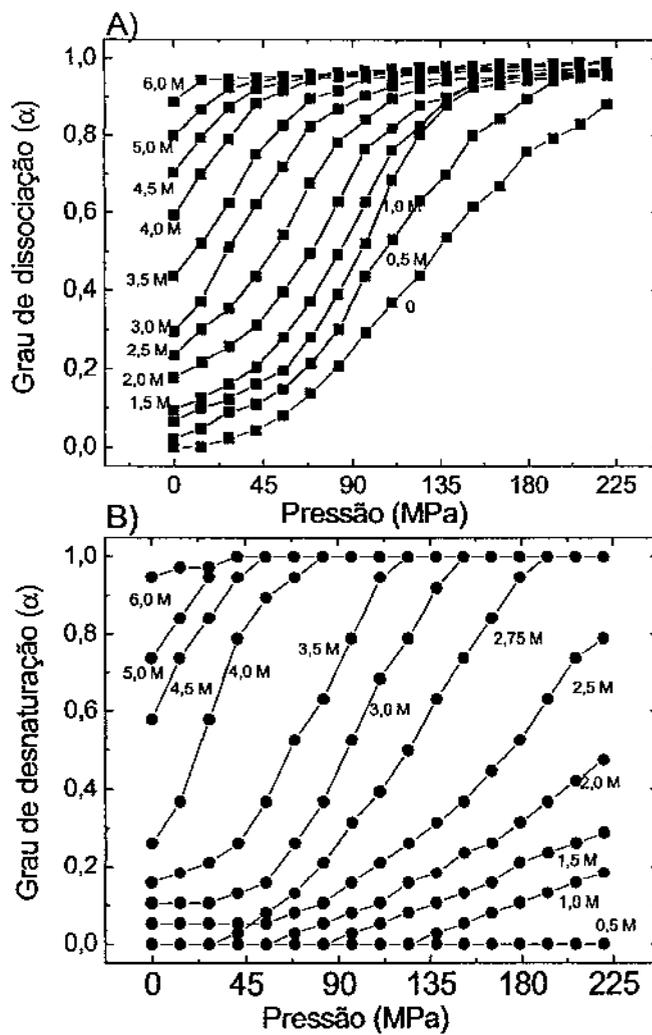


FIGURA 11. A) Grau de dissociação do TMV, baseado nos dados de espalhamento de luz da FIGURA 10A e Eq. 1. B) Grau de desnaturação do TMV, baseado nos dados de desvio de centro de massa da FIGURA 10B e Eq. 3. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

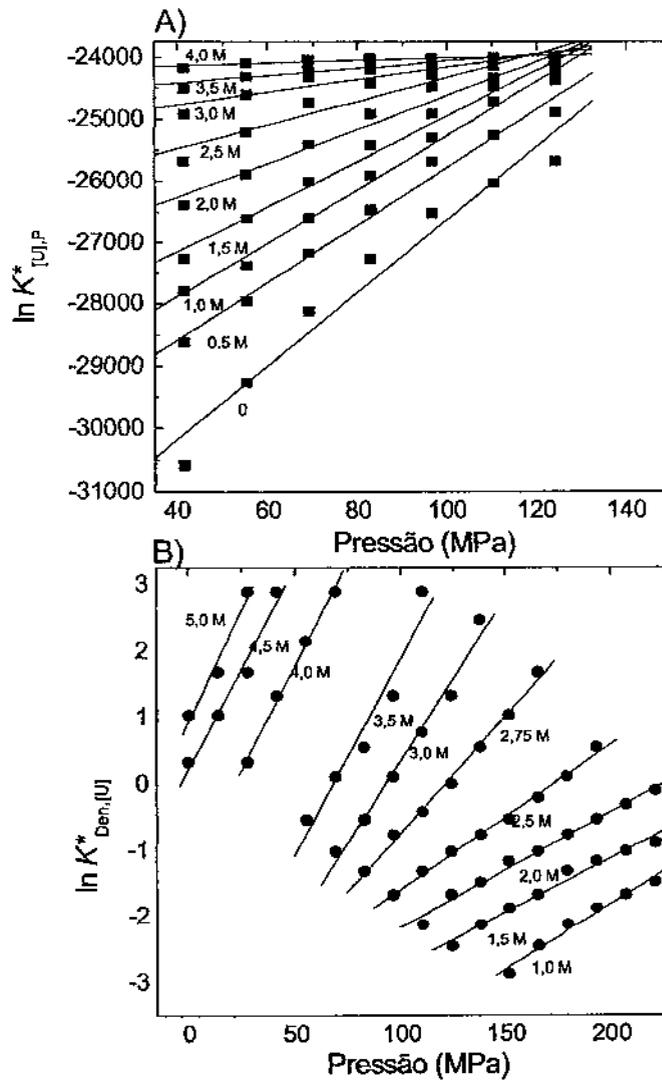


FIGURA 12. A) Gráfico de  $\ln K^*_{[U],p}$  (Eq. 14) versus pressão, baseado nos dados de grau de dissociação, da FIGURA 11A e Eq. 1. B) Gráfico de  $\ln K^*_{Den,[U],p}$  (Eq. 20) versus pressão, baseado nos de grau de desnaturação, da FIGURA 11B e Eq. 3. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

Na Figura 13A, observa-se uma diminuição da energia livre aparente de dissociação de 35,16 para 26,18 kJ/mol de subunidade de proteína com a elevação da concentração de uréia de 0 a 4,0 M. A energia livre aparente de desnaturação diminui de 10,5 para -2,15 kJ/mol de subunidade de TMV, com a elevação da concentração de uréia de 3,0 para 5,0 M, Figura 13A.

A variação de volume aparente de dissociação e desnaturação, calculados a partir das Eqs. 14 e 20 apresentam valores negativos, e são mostrados na Figura 13B. Em valores absolutos, a uréia induziu uma diminuição no  $\Delta V^*$  aparente de dissociação e a um significativo aumento no  $\Delta V^*$  aparente de desnaturação. Isso sugere que as espécies presentes na solução apresentam uma nova conformação, onde ocorre exposição parcial ou total das interfaces das subunidades da proteína, e o possível surgimento de espaços não ocupados entre estas subunidades dissociadas e/ou desnaturadas fazem com que ocorra uma nova reorganização do solvente, que então passa a ocupar um menor volume (Silva *et al.*, 2001).

As estequiometrias aparentes de uréia na dissociação e desnaturação do TMV foram obtidas graficamente através das Eqs. 10 e 16. Os ajustes lineares dos resultados obtidos para  $\Delta G^*$  versus  $\ln$  [uréia], Figura 13A, fornecem os coeficientes angulares que correspondem aos números médios de mols de uréia ligadas às subunidades protéicas do TMV durante os processos de dissociação e desnaturação ( $\sigma$  e  $\lambda$ , respectivamente, das Eqs. 5 e 6, para dissociação e desnaturação). O valor da estequiometria aparente de uréia no processo de dissociação foi de 1,53 mols de uréia/mol de subunidade de TMV, e o de desnaturação foi de 11,1 mols de uréia/mol de subunidade de TMV.

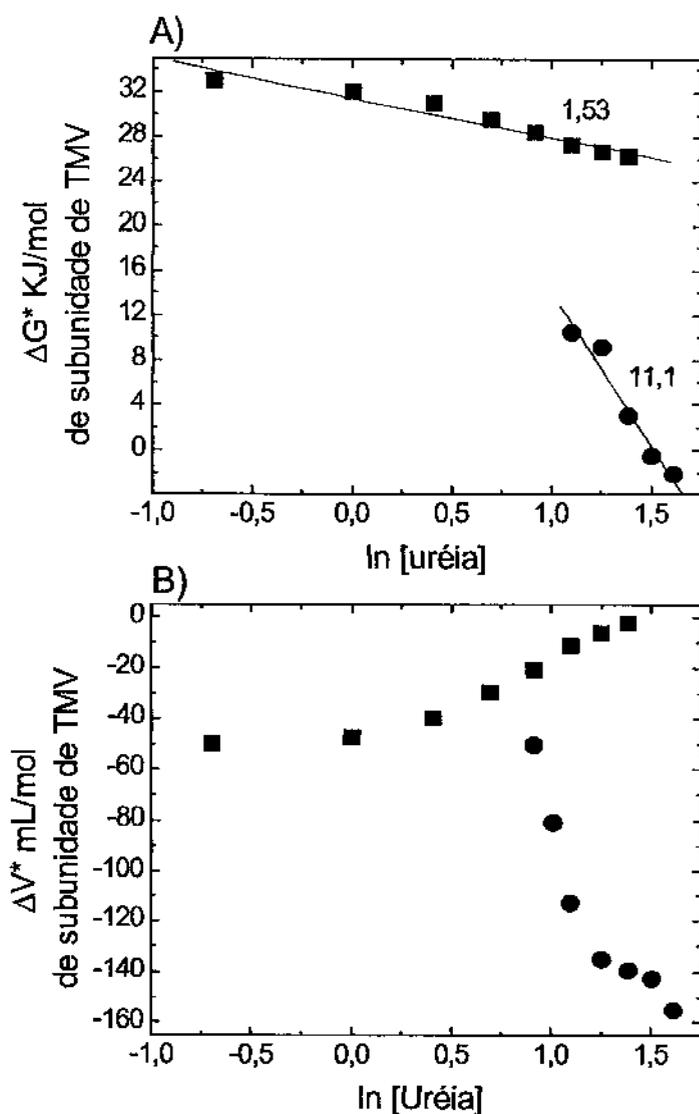


FIGURA 13. (A) Efeito da uréia sobre a energia livre de Gibbs de dissociação (quadrados) e desnaturação (círculos) do TMV. Os resultados para  $\Delta G^*$  foram obtidos através dos coeficientes lineares dos ajustes das retas das FIGURAS 12A e 12B (Eq. 14 e 20). O coeficiente angular dos resultados obtidos para  $\Delta G^*$  forneceu os valores estequiométricos de uréia nos processos de dissociação e desnaturação. (B) Efeito da uréia sobre a variação de volume de dissociação (quadrados) e de desnaturação (círculos) do TMV. Os resultados para os valores de  $\Delta V^*$  foram obtidos através dos ajustes angulares das retas das FIGURAS 12A (0 a 4,0 M de ure 12B. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

A Figura 14 mostra uma comparação entre os processos de dissociação e desnaturação do TMV em diferentes concentrações de uréia e pressão. Observa-se mais diretamente que a dissociação do TMV ocorre em concentrações de uréia significativamente inferior, comparando-se com a desnaturação. O aumento da pressão hidrostática potencializou ainda mais este efeito. Isso pode ser notado, por exemplo, comparando-se amostras de TMV em pressão atmosférica e em 110 MPa. Em 1,0 M de uréia sob pressão de 110 MPa, o grau de dissociação foi praticamente 70 % e o de desnaturação zero. Em pressão atmosférica não ocorre dissociação ou desnaturação significativa. A comparação da intensidade de espalhamento de luz e centro de massa das amostras de TMV nestas diferentes concentrações de uréia e pressão são mostradas na Figura 14, inclusões.

Realizou-se gel filtração em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com o objetivo de observar o estado de agregação pós pressão do TMV nas diferentes concentrações de uréia e condições de pressão, Figura 15. Esta técnica tem sido utilizada para a análise das mudanças estruturais em proteínas e em diversas partículas virais (Silva *et al.*, 1989, Bonafé *et al.*, 1998, Schwarcz *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2004, Bispo *et al.*, 2007). A Figura 15A, mostra o perfil de eluição do TMV na ausência de uréia em pressão atmosférica, no geral observa-se um único pico, correspondendo a uma única população de partículas virais. Após pressão de 220 MPa, a eluição ocorreu pouco depois do ponto  $V_0$ , indicando parcial dissociação. As amostras de TMV em presença de 2,5 M de uréia em pressão atmosférica apresentaram um perfil de eluição com mais de um pico, indicando um aumento do processo de dissociação viral, que foi mais acentuado após as amostras terem sido pressurizadas, Figura 15B. Em presença de 5,0 M de uréia o perfil de eluição das

amostras de TMV são semelhantes antes e após pressão de 220 MPa, indicando significativa dissociação, Figura 15C.

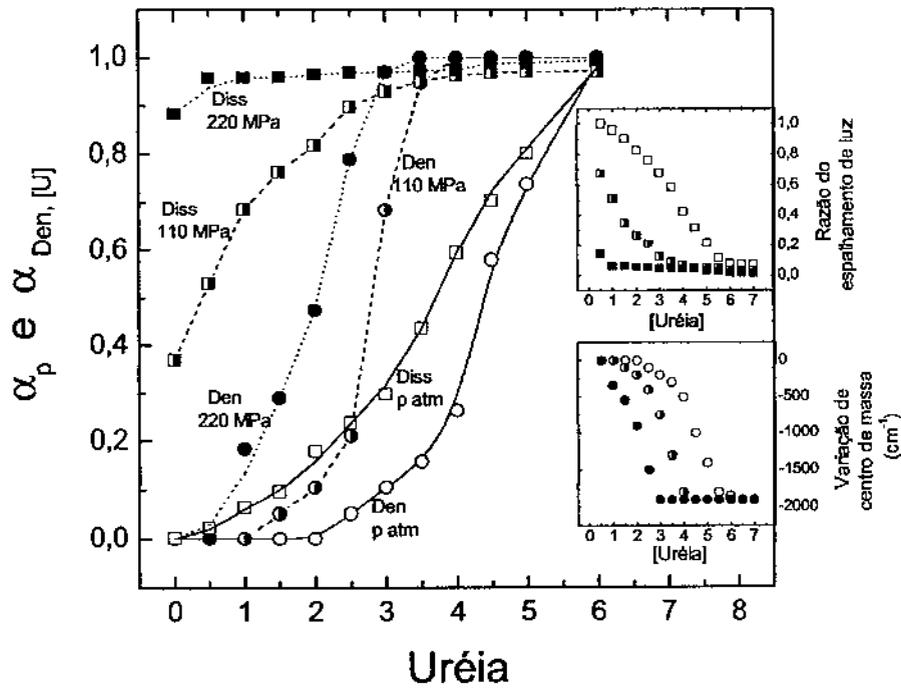


FIGURA 14. Efeito da uréia sobre o grau de dissociação e desnaturação do TMV em diferentes pressões (0,1, 110 e 220 MPa), baseados respectivamente, nos dados de espalhamento de luz (Inclusão superior) e desvio de centro de massa (Inclusão inferior). Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

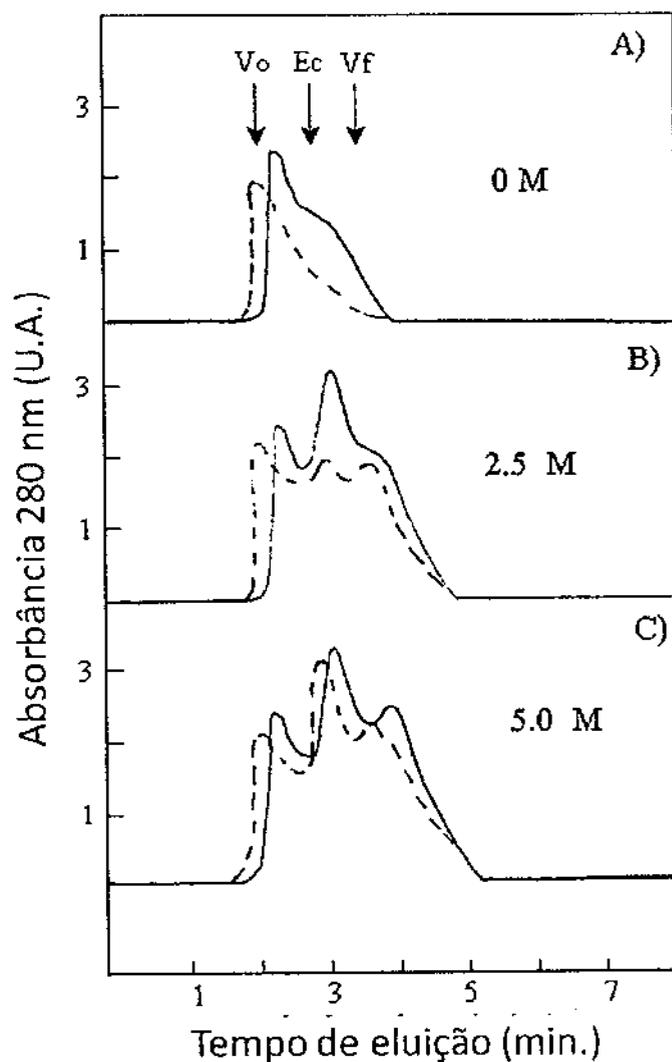


FIGURA 15. Cromatografia de gel filtração em HPLC do TMV em diferentes valores de uréia e pressão. A) TMV na ausência de uréia. B) TMV na presença de 2,5 M de uréia. C) TMV na presença de 5,0 M de uréia. Foram aplicados 100  $\mu$ L da amostra viral (0,25 mg/mL) e o fluxo utilizado foi de 0,3 mL/ min. Linha tracejada TMV em pressão atmosférica, linha contínua TMV incubado por 1,5 h sob pressão de 220 MPa.  $V_o$  é o volume inicial e,  $E_c$  e  $V_f$ , correspondem, respectivamente, ao ponto de eluição da hemoglobina extracehular do anelídeo *G. paulistus* de 3300 kDa, e da hemoglobina humana de 64 kDa. (Santos *et al.*, 2004). U.A. = unidade arbitrária.

#### 4.3 – Efeito do hidrocloreto de guanidina (GndHCl) e pressão sobre o TMV: comparação do processo de desnaturação com uréia

Estudou-se o efeito de outro agente desnaturante, o GndHCl, sobre o TMV em pressão atmosférica e em combinação com alta pressão hidrostática, com o objetivo de fazer uma análise comparativa da estequiometria desse agente com a estequiometria de uréia no processo de desnaturação.

O TMV em pressão atmosférica foi incubado em diferentes concentrações de GndHCl, até 6,0 M, sendo realizadas as medidas espectroscópicas de espalhamento de luz e fluorescência, Figura 16. Observa-se que em concentrações subdesnaturantes (de 0,5 a 1,5 M) ocorreu um aumento da intensidade de espalhamento de luz, mostrando um fenômeno oposto ao da ação da uréia, agregação, Figura, 16A. Em concentrações acima de 1,5 M de GndHCl ocorreu acentuada queda da intensidade de espalhamento de luz, aparentemente devido à ocorrência de precipitação. Isso impediu uma análise mais profunda do estudo de dissociação do TMV através de espalhamento de luz. Em relação ao desvio de centro de massa observou-se diminuição do mesmo a partir de 1,5 M de GndHCl, atingindo desvio máximo para o vermelho a partir de 4,0 M, totalizando  $1900\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo a uma maior exposição dos triptofanos ao solvente, portanto desnaturação, Figura 16B.

A Figura 17, mostra a microscopia eletrônica do TMV em diferentes concentrações de GndHCl. Observa-se um grande número de imagens de TMV em presença de 1,0 M de GndHCl, Figura 17A. Em presença de 2,0 M de GndHCl observa-se total ausência de imagens de vírus, sugerindo significativa desestruturação viral, Figura 17B.

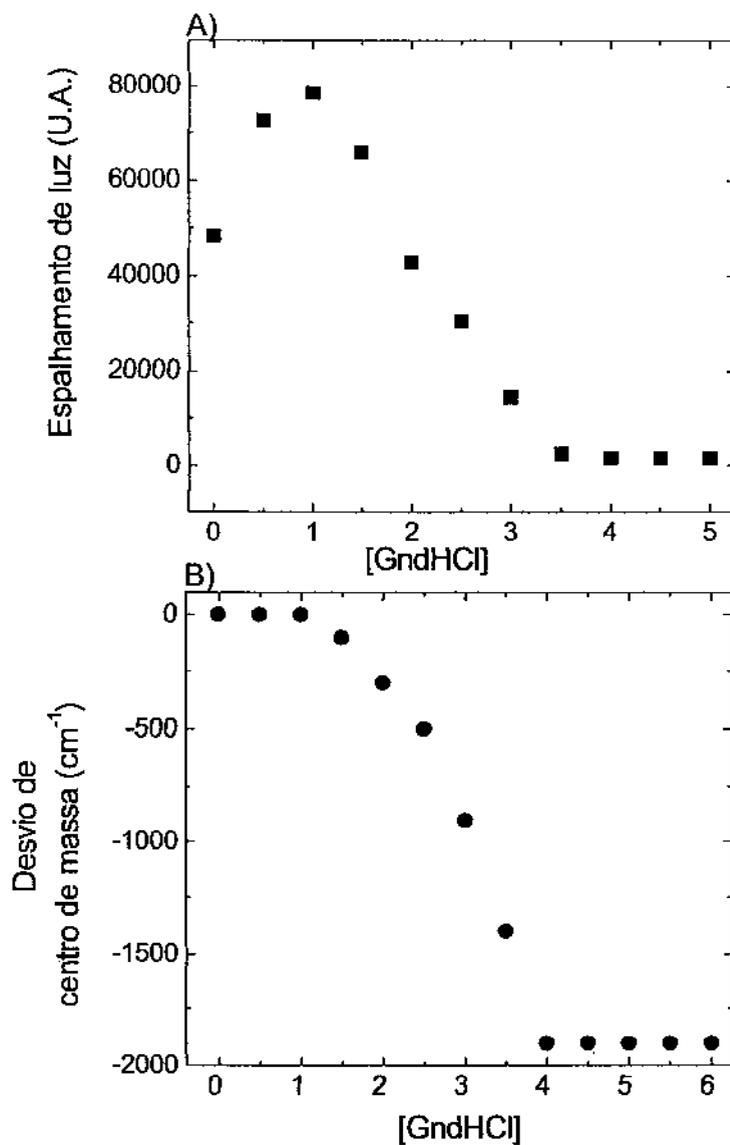


FIGURA 16. Efeito do GndHCl sobre as propriedades espectroscópicas do TMV. A) Intensidade de espalhamento de luz. B) Centro de massa do espectro de emissão de fluorescência. As amostras foram preparadas e colocadas numa cubeta de quartzo, e após repouso de 1h a temperatura de 5° C foram realizadas as medidas espectroscópicas. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

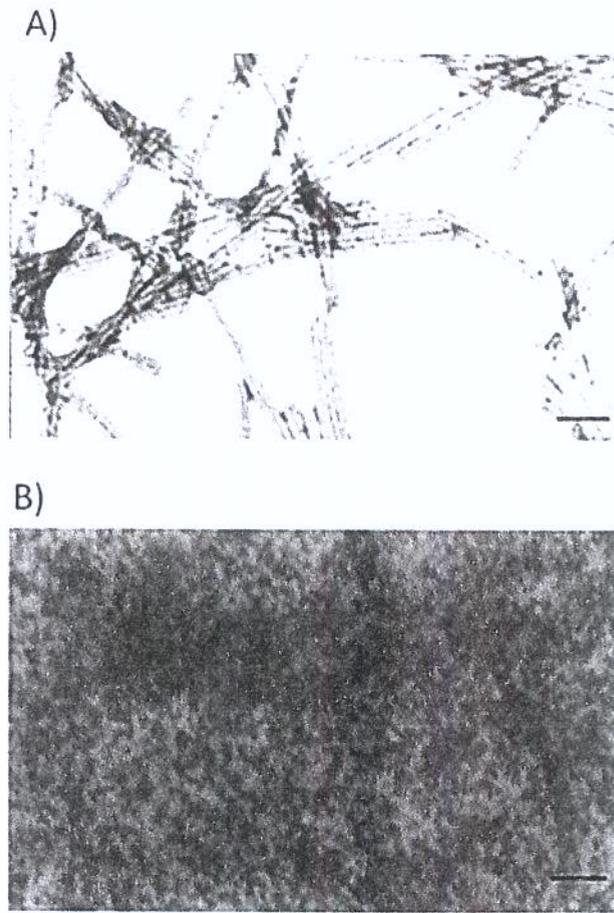


FIGURA 17. Microscopia eletrônica do TMV a pressão atmosférica em concentrações de GndHCl de (A) 1,0 M e (B) 2,0 M Contrastante negativo: acetato de uranila 1%. A barra de calibração corresponde a 50 nm. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

O efeito de alta pressão hidrostática sobre o centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do TMV em presença de GndHCl é mostrado na Figura 18A. Observa-se que desvio máximo de centro de massa,  $2000 \text{ cm}^{-1}$ , é atingido em 220 MPa em concentrações de GndHCl de 1,625 M, indicando “máxima desnaturação”. Por outro lado, a partir de 4,0 M de GndHCl o desvio de centro de massa já é praticamente o máximo a pressão atmosférica.

Os dados de desvio de centro de massa, Figura 18A, podem ser correlacionados a seus respectivos graus de desnaturação através da Eq. 3, Figura 18B. Através destes dados e Eq. 20, foi possível calcular a constante aparente de desnaturação deste processo, Figura 19A. As retas traçadas nestes pontos experimentais fornecem os coeficientes lineares e angulares, que correspondem, respectivamente, aos valores aparentes de variação de energia livre e variação de volume de desnaturação, Figura 19B e 19B inclusão.

A energia livre (aparente) de desnaturação diminui de 10,1 para -2,05 kJ/mol de subunidade de proteína com a elevação da concentração de GndHCl de 1,625 M para 3,5 M, Figura 19B. As variações de volume (aparente) de desnaturação, calculada a partir da Eq. 20, exibiram valores negativos, Figura 19B inclusão.

A estequiometria aparente de GndHCl na desnaturação do TMV foi obtida de maneira análoga à estequiometria aparente de uréia, através da Eq. 16. O ajuste linear dos resultados obtidos para  $\Delta G^*$  versus  $\ln [\text{GndHCl}]$ , Figura 19B, fornece, através do coeficiente angular obtido, a estequiometria aparente de GndHCl igual a 7,5 mols de GndHCl/mol de subunidade de TMV. Em pressão atmosférica (Figura 16B), a estequiometria aparente de GndHCl encontrada foi igual a 4,4 mols de GndHCl/mol de subunidade de TMV.

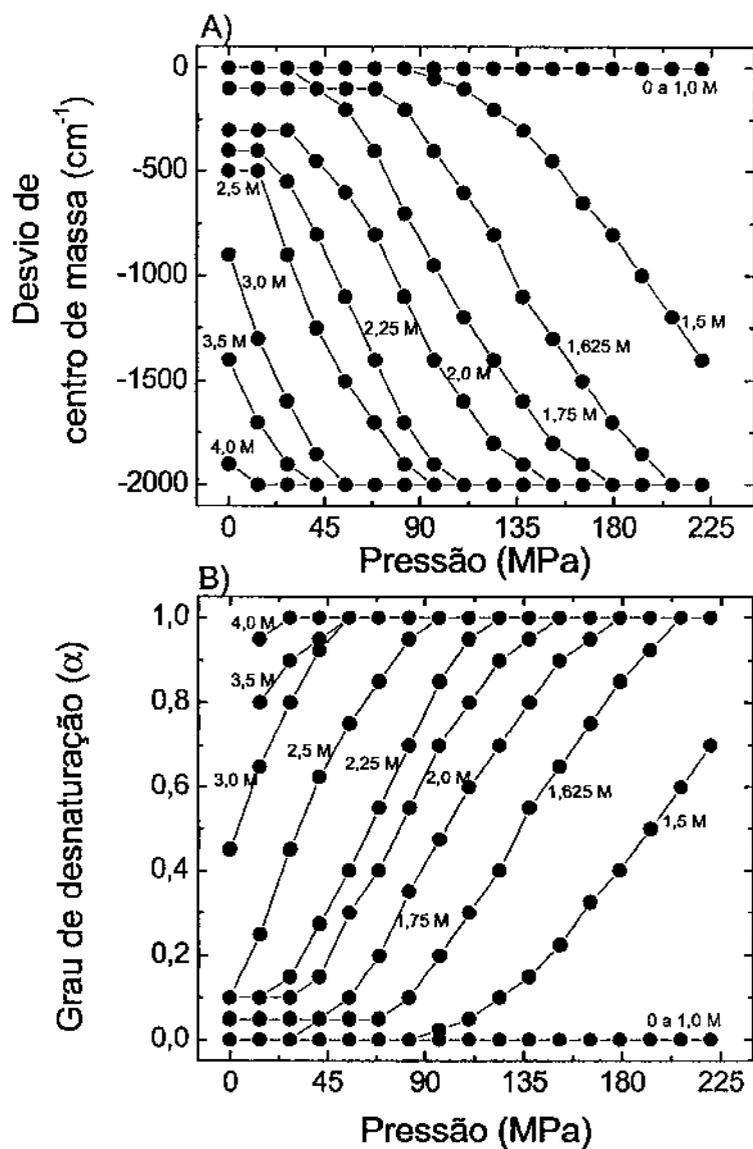


FIGURA 18. A) Efeito de pressão e GndHCl sobre os desvios de centro de massa espectral da emissão de fluorescência do triptofano do TMV. B) Grau de desnaturação do TMV, baseado nos dados de desvio de centro de massa da Figura 18A e Eq. 3. Após o preparo as amostras foram submetidas à alta pressão, as medidas de fluorescência foram realizadas 17 minutos após cada nível de pressão. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

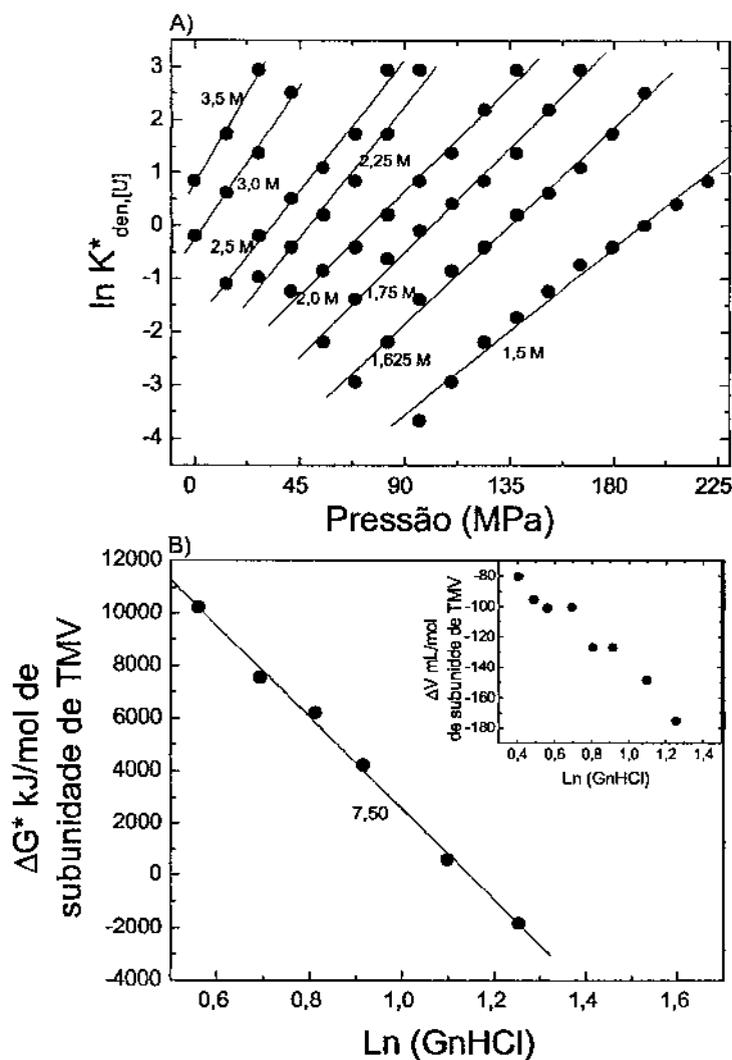


FIGURA 19. A) Gráfico de  $\ln K_{den, [U], p}^*$  (Eq. 20) versus pressão, baseado no grau de desnaturação, da FIGURA 18B e Eq. 3. B) Energia livre de Gibbs de desnaturação do TMV, em presença de GndHCl. Os resultados para os valores de  $\Delta G$  foram obtidos através dos ajustes lineares das retas da FIGURA 19A (Eq. 20). O coeficiente angular dos ajustes para  $\Delta G$  forneceu o valor da estequiometria de GndHCl no processo de desnaturação do TMV. Inclusão: efeito do GndHCl sobre a variação de volume de desnaturação do TMV. Os resultados para os valores de  $\Delta V$  foram obtidos através dos ajustes angulares das retas da FIGURA 19A. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

Experimentos de gel filtração em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) sem a presença de GndHCl em pressão atmosférica e após pressão de 220 MPa, Figura 20A, mostra a ocorrência de parcial dissociação. A incubação do TMV, respectivamente, em 2,0 e 4,0 M de GndHCl, por outro lado (Figuras 20B e 20C) mostram um único pico de eluição, além do volume final ( $V_f$ ) da coluna, tanto para as amostras em pressão atmosférica ou após alta pressão, indicando significativa dissociação.

A Figura 21 mostra uma comparação do grau de desnaturação do TMV em diferentes valores de uréia e GndHCl, a pressão atmosférica e a 220 MPa. Observa-se que o grau de desnaturação do TMV em pressão atmosférica ou em 220 MPa foi maior na presença de GndHCl do que na presença de uréia, mostrando que o GndHCl é um agente desnaturante mais eficiente. A Figura 21 Inclusão, mostra o desvio de centro de massa do TMV em pH ácido em presença de 4,0 M uréia e 3,0 M GndHCl incubado em alta pressão. Observa-se que neste pH não ocorre desvio de centro de massa para as amostras de TMV em presença de uréia, mesmo sob alta pressão. Em presença de 3,0 M de GndHCl os desvios de centro de massa começaram a diminuir a partir de 100 MPa. Esses dados mostram o efeito protetor dos prótons ( $H^+$ ) sobre o efeito desnaturante da uréia e do GndHCl.

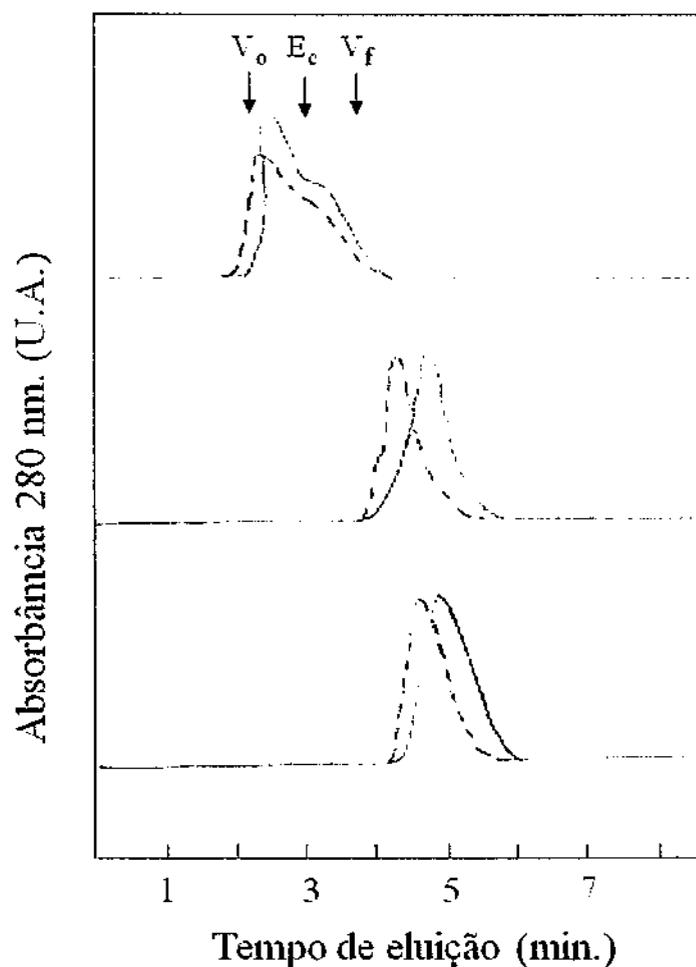


FIGURA 20. Cromatografia de gel filtração em HPLC do TMV em diferentes valores de GndHCl e pressão. A) TMV na ausência de GndHCl. B) TMV na presença de 2,0 M de GndHCl. C) TMV na presença de 4,0 M de GndHCl. Foram aplicados 100  $\mu$ L da amostra viral (0,25 mg/mL) e o fluxo utilizado foi de 0,3 mL/ min. Linha tracejada TMV em pressão atmosférica, linha contínua TMV incubado por 1,5 h sob pressão de 220 MPa.  $V_0$  é o volume inicial e,  $E_c$  e  $V_b$ , correspondem, respectivamente, ao ponto de eluição da hemoglobina extracelular do anelídeo *G. paulistus* de 3300 kDa, e da hemoglobina humana de 64 kDa. (Santos *et al.*, 2004). U.A. = unidade arbitrária.

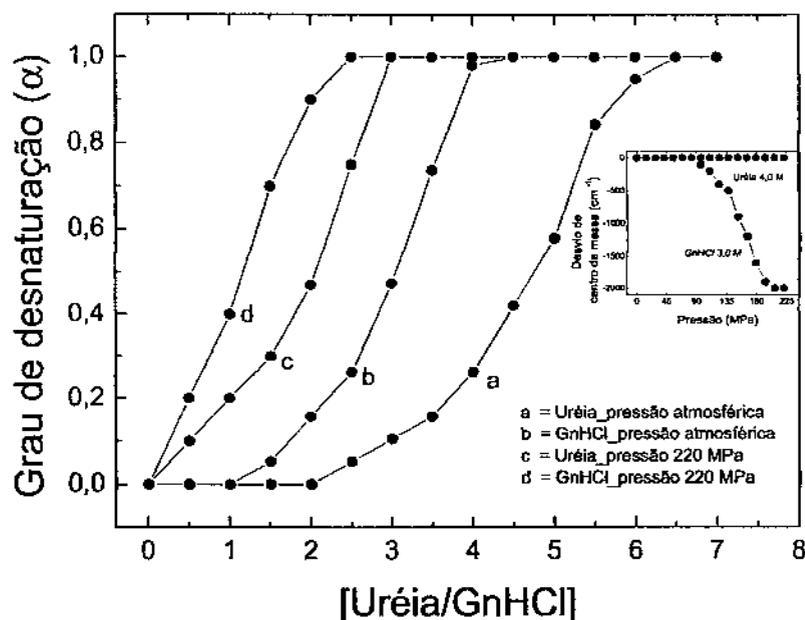


FIGURA 21. Efeito da uréia e do GnHCl sobre o grau de desnaturação do TMV em pressão atmosférica e sob pressão de 220 MPa. Os resultados foram baseados respectivamente, nos dados de desvio de centro de massa (FIGURAS 9B e 17). Inclusão: efeito da pressão em combinação com 4,0 M de uréia e 3,0 M GnHCl sobre os desvios de centro de massa espectral da emissão de fluorescência do triptofano do TMV em tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 5,5. Demais condições experimentais são semelhantes à FIGURA 5.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – Efeito da uréia e pressão sobre o TMV nos processos de dissociação e desnaturação

O mecanismo de interação da uréia com proteínas não está totalmente esclarecido, mas devem envolver interações desse composto com a cadeia polipeptídica e solubilização de grupamentos apolares da proteína, principalmente resíduos aromáticos (Scholtz *et al.*, 1995). Alguns relatos recentes sugerem que os efeitos dos agentes desnaturantes não estão apenas relacionados com as interações com o solvente, mas principalmente com sua direta interação com a proteína (Moglich *et al.*, 2005) Essa direta interação proteína-uréia sugere uma estequiometria passível de quantificação para os processos de dissociação e desnaturação, e o mesmo se aplica para a interação proteína-GndHCl, que será discutido mais adiante.

Nesta tese utilizou-se o TMV como modelo de interação proteína-agente desnaturante, determinando-se as estequiometrias aparentes de uréia (nos processos de dissociação e desnaturação) e de GndHCl (no processo de desnaturação), de maneira análoga à estequiometria de prótons na dissociação do TMV (Santos *et al.*, 2004) e da hemoglobina extracelular de anelídeo (Bispo, *et al.*, 2007).

Recentemente Zlotnick (2007) discutiu a associação dos fenômenos reversíveis e irreversíveis de proteínas capsídicas de vírus em diferentes condições experimentais. Em tal trabalho a irreversibilidade é considerada quando a reação inversa ocorre muito lentamente para ser considerada relevante. O oposto ocorreu nas condições experimentais na presente tese, havendo equilíbrio em cada nível de pressão, Figuras 8A e 8B. A estabilização dos produtos dissociados encontrados nesta tese (Figura 15) sugeriu o emprego de uma

metodologia voltada para uma condição de estado estacionário (*steady-state*), a qual forneceu parâmetros termodinâmicos aparentes para os processos de dissociação e desnaturação do TMV.

O resumo das alterações na estrutura do TMV induzidos por agentes físicos (temperatura e pressão) e químicos (pH e uréia) obtidos nesta tese e em trabalhos anteriores (Bonafe *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2004), estão representados esquematicamente na Figura 22, observando-se processos de dissociação e desnaturação nestas diferentes condições.

A associação-dissociação da proteína capsídica do TMV tem sido estudada há muito tempo, incluindo o efeito dos íons  $H^+$ , sendo evidenciado que o pH alcalino facilita muito a dissociação protéica (Shalaby & Laufer, 1977, Schuster *et al.*, 1980, Shalaby *et al.*, 1982). O efeito do pH no vírus íntegro também tem sido muito investigado, sendo demonstrado que a dissociação das subunidades ocorre na direção 5' para 3' do RNA. Observa-se ainda a presença de alguns intermediários de dissociação (Harrington & Schachman, 1956, Perhan 1969, Powell 1975, Perham & Wilson, 1976, Ohno & Okada, 1977, Perham & Wilson, 1978,). Estudos da dissociação alcalina do TMV em pH 9,5 a 10,5 e separação em gel agarose mostraram a predominância de algumas formas distintas de partículas virais parcialmente dissociadas correspondentes a aproximadamente 93, 68, 61, 39, 31, 24 e 16% do comprimento do vírus nativo (300 nm) (Hogue & Asselin, 1984).

Experimentos realizados por Blowers & Wilson (1982) usando uréia para promover dissociação do TMV mostraram dissociação do capsídeo predominantemente na direção 5' para 3' da molécula de RNA, semelhante ao observado para a dissociação alcalina.

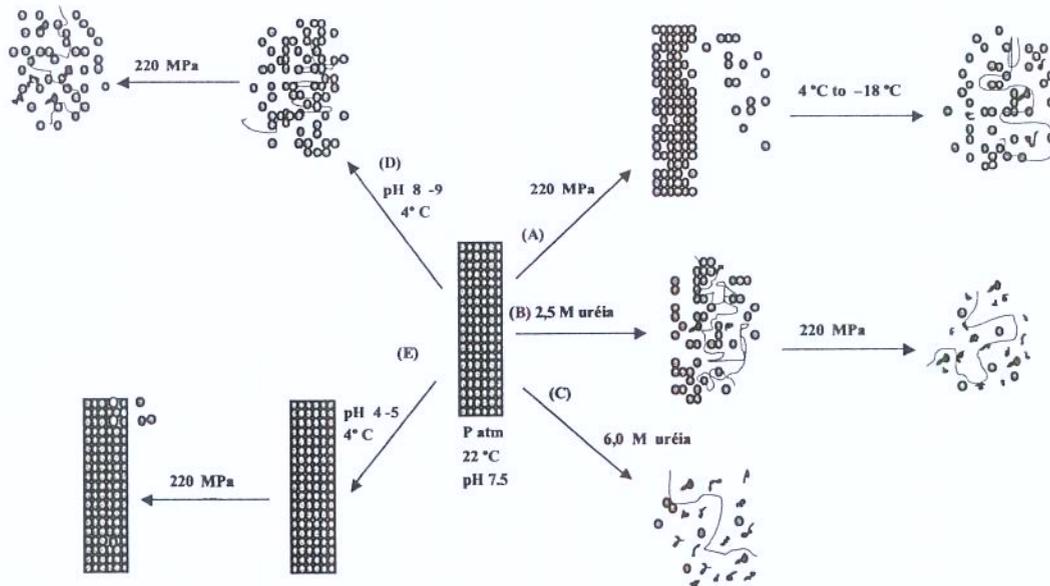


FIGURA 22. Esquema dos processos de dissociação e desnaturação do TMV induzidos por agentes físicos (temperatura e pressão) e químicos (pH e uréia), baseados em dados obtidos nesta tese e em estudos anteriores (Bonafe *et al.*, 1998, Santos *et al.*, 2004). (A) TMV em temperatura de 22° C incubado em pressão de 220 MPa ocorre pouca dissociação, com a diminuição da temperatura (a partir de 4°C) ocorre significativa dissociação. (B) A presença de 2,5 M de uréia causa dissociação do TMV sem a ocorrência de desnaturação, e a incubação em alta pressão foi observada a ocorrência de desnaturação. (C) TMV em presença de 6,0 M de uréia em pressão atmosférica apresenta significativa desnaturação. (D) Sob condições alcalinas observa-se dissociação do TMV, que se intensifica com a aplicação da alta pressão, porém nestas condições não ocorre desnaturação. (E) Sob condições ácidas o TMV não se dissocia ou desnatura, mesmo em alta pressão hidrostática.

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

Nesta tese, embora o processo de dissociação e desnaturação terem sido analisados com base em diferentes espécies estruturais em solução, considerou-se um processo simplificado de “dois estados” (nativo/dissociado e dissociado/denaturado) mais adequado para ser aplicado aos dados de espalhamento de luz e fluorescência, como considerado anteriormente para estudar o efeito do pH sobre o TMV (Santos *et al.*, 2004). O grau de dissociação e desnaturação (Figuras 11A e 11B) obtido dos resultados de intensidade de espalhamento de luz e fluorescência (Figura 10A e 10B) forneceram dados termodinâmicos (aparentes) quantitativos para os processos de dissociação e desnaturação em diferentes condições de uréia e pressão.

Os resultados obtidos nesta tese para os dados de dicroísmo circular (Figura 7), microscopia eletrônica (Figura 6) e gel filtração (Figura 15) foram concordantes com as observações espectroscópicas de intensidade de espalhamento de luz e fluorescência.

Uma clara distinção entre os processos de dissociação e desnaturação do TMV por uréia pode ser feita com base nos dados de intensidade de espalhamento de luz e desvio de centro de massa do espectro de emissão de fluorescência, Figura 10A e 10B, respectivamente. Em condições onde são observadas dissociação total do TMV (como por

exemplo, em ausência ou em 0,5 M de uréia sob pressão de 220 MPa, Figura 10A), não ocorreram desvio de centro de massa (Figura 10B), indicando apenas dissociação. Esses resultados indicaram que a forma dissociada mantém os resíduos aromáticos de triptofanos em um ambiente muito semelhante à forma associada.

Por outro lado, o valor de desvio de centro de massa encontrado no processo de desnaturação do TMV atinge  $1900\text{ cm}^{-1}$ , observado a partir de 6,0 M de uréia em qualquer pressão, ou a partir de 2,75 M de uréia em pressão de 220 MPa, Figura 10B. Esse valor é maior que em outros vírus descritos na literatura, como mostrado na Tabela 1, sugerindo uma diferença comparativamente maior da exposição dos resíduos de triptofanos ao solvente entre as formas não desnaturadas e desnaturadas do TMV. Mais adiante mostraremos detalhes da localização dos triptofanos presentes no TMV, e discutiremos as contribuições de suas fluorescências para os processos de dissociação e desnaturação.

Em resumo os resultados encontrados aqui indicaram que o processo de dissociação induzido por uréia precede o processo de desnaturação do TMV, como mostrado na Figura 14. Essa propriedade foi significativamente mais acentuada pelo uso da alta pressão hidrostática, a qual tornou o TMV mais suscetível à dissociação do que a desnaturação.

## 5.2 - Espectro de fluorescência na estrutura do TMV

A fluorescência do triptofano é sensível ao ambiente eletrostático ao seu redor, uma característica que permite o estudo de processos dinâmicos. Embora as interpretações dos dados espectroscópicos de proteínas terem certa complexidade, pode-se relacionar parâmetros físicos e estruturais à emissão de fluorescência (Reshetnyak *et al.*, 2001, Vivian & Collis 2001).

Os triptofanos presentes nas subunidades protéicas do TMV foram classificados de acordo com seus respectivos ambientes através de inspeção visual, em imagens da estrutura terciária da subunidade (DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>) analisados pelas mudanças ocorridas em seus espectros de fluorescência, de acordo com a classificação definida por Vivian & Collis, 2001. No referido artigo, em tabela 2 observa-se estruturas representativas de cinco classes distintas de triptofanos que foram usadas para comparações estruturais, de acordo com o proposto pelos autores.

Vivian & Collis (2001), usaram um método híbrido de dinâmica molecular mecânico-clássico e quântico, utilizando estruturas cristalográficas para prever os comprimentos de onda da emissão de fluorescência de 19 triptofanos de 16 proteínas, com  $\lambda_{max}$  calculado dentro de  $\pm 6$  nm dos valores experimentais. Esses autores propuseram uma classificação do ambiente dos triptofanos, considerando cinco diferentes classes, cada uma com diferente contribuição para o desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência (desvio de centro de massa). A classificação levou em conta a extensão da exposição dos resíduos de triptofanos ao solvente:

Classe 1 – triptofano enterrado, não exposto a água;

Classe II – triptofano com uma aresta exposta;

Classe III – triptofano apenas com uma face exposta;

Classe IV – triptofano com uma face e uma aresta exposta;

Classe V – triptofano com duas faces e duas arestas expostas.

Analisando a estrutura do TMV, trata-se de um cilindro de cerca de 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro, que consiste de 2130 cópias de proteínas capsídica (17,5 kDa, 158 resíduos), formando uma hélice de 16 e 1/3 de subunidades por volta, com um canal interno (Goelet *et al.*, 1982). O material genético deste vírus é uma fita simples positiva de RNA, com 6.400 nucleotídeos (2.000 kDa), enovelado internamente ao capsídeo protéico formando uma hélice na qual cada subunidade protéica se liga a 3 nucleotídeos (Hirth & Richards, 1981). A proteína capsídica do TMV também pode se auto associar em solução, formando estruturas semelhantes ao vírus nativo, mostrado na Figura 3. A estrutura do TMV foi determinada por difração de raio-X em resolução de 2,9 Å, Figura 23A (Namba, *et al.*, 1989), e a localização dos seus três triptofanos presentes em suas subunidades podem ser observados na Figura 23B. Dados estruturais disponíveis também incluem estrutura cristalográfica de um agregado de quatro camadas (2,45 Å de resolução), um dímero de disco cilíndrico bilateral formado por 34 subunidades resultante da auto associação de proteínas capsídicas do TMV em solução (PDB entrada 1E17, Bhyravbhatla *et al.*, 1998).

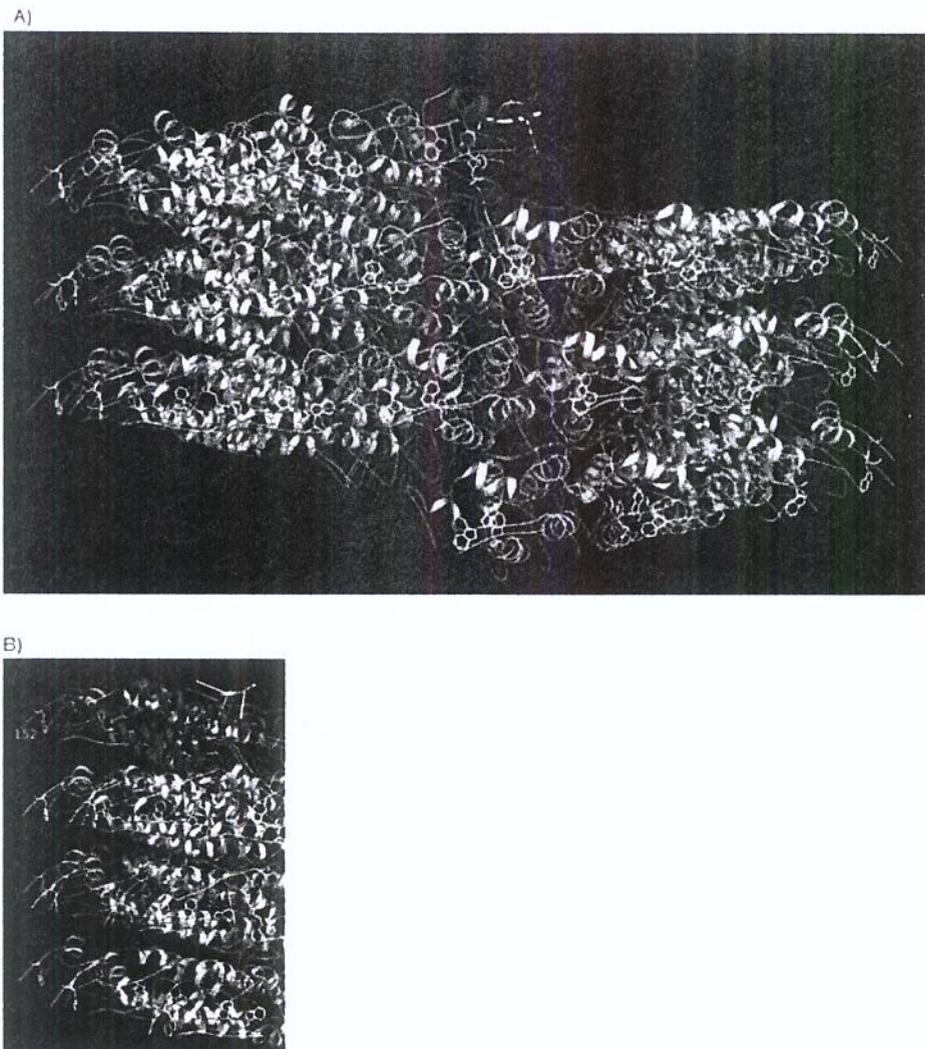


FIGURA 23: Representação da estrutura do TMV. Após resolução por simetria, uma única subunidade de proteína (com três nucleotídeos ligados) resume as informações estruturais do vírus inteiro. A) Uma unidade de hélice completa com 49 subunidades em 3 voltas, com uma subunidade em evidência (mostrando a alfa hélice em vermelho). B) Detalhe que enfatiza a localização dos resíduos de triptofanos, em particular o resíduo 152 (com os átomos de carbono em amarelo). A representação das estruturas foram feitas usando o programa PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>).

A proteína capsídica do TMV possui três triptofanos, Trp17, Trp52 e Trp152. Classificamos estes resíduos de acordo com os critérios acima descritos, (cinco classes, de I a V), Figura 24A.

O Trp152 deve ser classificado como Classe IV, pois, este triptofano fica situado à extremidade exterior da hélice, com um lado lateral quase completamente exposto ao solvente na forma associada do vírus, Figura 24B. Este resíduo está perto da região C-terminal da proteína, uma região flexível que exhibe variabilidade conformacional considerável, presente na estrutura completa do TMV. Portanto, é esperado que o ambiente deste triptofano não mude significativamente ao compararmos a forma associada do vírus e a proteína capsídica dissociada, não contribuindo para mudanças no espectro de fluorescência durante o processo de dissociação.

O Trp17, enterrado no interior da proteína, pode ser considerado como Classe I, Figura 24C. Nenhuma evidência experimental foi encontrada de que a desnaturação acompanha a dissociação do TMV. Então, pode-se antecipar que a contribuição dos espectros de fluorescências do Trp17 seria praticamente o mesmo no processo de dissociação. Porém, a contribuição de sua fluorescência foi provavelmente muito maior para a proteína desnaturada (onde ocorrem mudanças estruturais mais drásticas, e, portanto, uma maior exposição deste resíduo ao solvente) do que para a proteína nativa.

No caso de Trp52, uma análise da estrutura do vírus completo e do agregado de quatro camadas (formada pelas subunidades do TMV) mostra que este resíduo tem ambiente semelhante em ambas as estruturas. Embora a sobreposição estrutural (não mostrado) indica uma diferença na conformação lateral deste resíduo no TMV ( $\chi_1=-102^\circ$ ,  $\chi_2=-93^\circ$ ) e na estrutura de quatro camadas ( $\chi_1=-47^\circ$ ), a classe deste resíduo corresponde

essencialmente à mesma, Classe III, Figura 24D. É importante notar que o agregado de quatro camadas resulta da auto associação da proteína capsídica em solução, que dependendo das condições do meio forma um cilindro parecido com o vírus nativo. Assim, podemos dizer que este resíduo assume uma conformação diferente (a uma classe mais alta) apenas durante o processo de desnaturação.

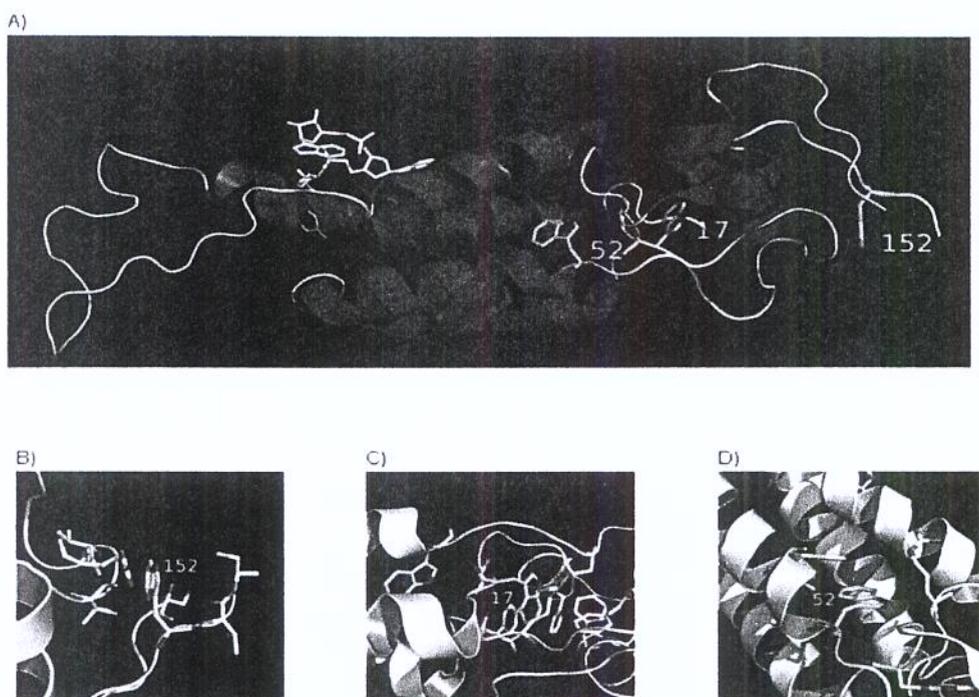


FIGURA 24: Detalhes dos triptofanos na proteína capsídica do TMV. A) subunidade do capsídeo protéico mostrando a localização dos triptofanos. B) Trp52 apresenta apenas uma face exposta ao solvente, Classe III. C) Trp17 é completamente enterrado dentro da proteína, Classe I. D) Trp152, o mais exposto para o solvente, Classe IV. As estruturas foram obtidas com o programa PyMOL (DeLano Scientific, San Carlos, CA, <http://www.pymol.org>).

Em resumo, nossos resultados relacionados à emissão de fluorescência na dissociação e desnaturação estão de acordo com o que seria esperado analisando os dados estruturais. Para os três triptofanos presentes na proteína capsídica do TMV, não foram esperado que eles apresentassem significantes modificações quanto à exposição ao solvente, que mudariam sua classe, durante o processo de dissociação, e conseqüentemente, não deveriam apresentar significativa diferença de centro de massa da emissão de fluorescências durante este processo.

Durante o processo de desnaturação, provavelmente o Trp17 e o Trp52 sofreram significativas modificações estruturais, sendo provavelmente os responsáveis pela maioria das mudanças espectrais, com suas fluorescências apresentando grandes contribuições durante este processo.

O Trp152, quase completamente exposto para o solvente na estrutura nativa do TMV e na proteína dissociada, provavelmente não sofreu alterações espectroscópicas nos processos de dissociação e desnaturação.

### 5.3 - Comparação da estequiometria de uréia nos processos de dissociação e desnaturação com outros vírus

Estudos anteriores (Bonafe *et al.*, 1998), mostraram o efeito da uréia sobre o TMV, e, através dos dados de espalhamento de luz e desvio de centro de massa, aplicando-se à metodologia proposta nesta tese, calculou-se a estequiometria aparente de uréia nos processos de dissociação e desnaturação, correspondendo respectivamente a 1,48 e 14,6 mols de uréia /mol de subunidade de TMV. Esses valores devem ser considerados menos precisos que os valores encontrados nesta tese (de 1,53 e 11,1 mols de urea/mol de subunidade de TMV, respectivamente para os processos de dissociação e desnaturação), pois o “ajuste” do gráfico de  $\Delta G^*$  versus  $\ln$  da concentração de uréia foi feito diretamente dos dados de pressão atmosférica, enquanto que nesta tese os valores de  $\Delta G^*$  foram obtidos das curvas de pressão em diferentes concentrações de uréia, portanto, utilizando dados mais completos. Esses dados foram colocados na Tabela 1, a qual também está incluída a estequiometria aparente de uréia calculada nos processos de dissociação e desnaturação do TMV em pressão atmosférica, obtidos nesta tese (Figura5).

Estudos com o bacteriófago R17 compararam o efeito da concentração viral no processo de dissociação por pressão em diferentes concentrações de uréia (de 2,5 a 5,0 M de uréia), demonstrando que o efeito da diluição apenas facilita a dissociação em altas concentrações de uréia (Da Poian *et al.*, 1993). A independência de concentração na dissociação viral em ausência de uréia também foi observada em outros agregados macromoleculares, como a hemoglobina extracelular de anelídeo e a hemocianina (Silva *et al.*, 1989, Bonafe *et al.*, 1994). Erijman & Weber (1991), sugeriram que a pouca dependência de concentração de vírus ou proteínas na curva de dissociação por pressão

seria devido à heterogeneidade quanto à energia livre de associação, presentes em agregados com número de subunidades maior que dois. O efeito de concentrações maiores de uréia na reversão da falta de dependência de concentração do bacteriófago R17 foi explicado como um efeito homogeneizador da uréia (ligação da uréia em vários sítios das subunidades, facilitando a dissociação) sobre este vírus (Weber *et al.*,1996).

O efeito da uréia sobre a intensidade de espalhamento de luz e desvio de centro de massa de fluorescência de vários vírus foram descritos na literatura. Através destes dados (literatura) e das Eqs. 10 e 16 desta tese foi possível calcular a estequiometria aparente de uréia, respectivamente, para os processos de dissociação e desnaturação destes diferentes vírus. Os resultados destes cálculos estão mostrados na Tabela 1, a qual compara a estequiometria aparente de uréia nos processos de dissociação e desnaturação. É importante lembrar, como já mencionado, que estes resultados não são tão precisos quanto os valores para o TMV resultante dos experimentos nesta tese, pois nos outros vírus os dados foram baseados apenas em resultados a pressão atmosférica, e não em curvas de alta pressão. Além disso, os dados para o processo de desnaturação foram baseados no desvio para o vermelho dos espectros de emissão de fluorescência, assim outras técnicas para quantificar a desnaturação poderiam conduzir a alguma variação na estequiometria aparente de uréia calculada.

Virus	forma	Estequiometria de dissociação	Estequiometria de desnaturação	Desvio de centro de massa	Referência
TMV	nativo	<u>1,53</u> ; 1,82 (Fig.4)	<u>11,1</u> ; 8,65 (Fig.4)	1900 cm <sup>-1</sup>	Resultados desta tese
TMV	nativo	1,48	14,6	2000 cm <sup>-1</sup>	Bonafe <i>et al.</i> , 1998
Bacteriófago R 17	nativo	5,27*	(9,42)	(1700 cm <sup>-1</sup> )	Da Poian <i>et al.</i> , 1993
Bacteriófago R 17	dímeros (da capa protéica)	0,87*	(4,25)	(1100 cm <sup>-1</sup> )	Da Poian <i>et al.</i> , 1993
"cowpea mosaic-virus"	capsídeo vazio		6,65	700 cm <sup>-1</sup>	Da Poian <i>et al.</i> , 1994
"Cowpea severe mosaic virus"	nativo	3,26*	(7,55)	(1000 cm <sup>-1</sup> )	Gaspar <i>et al.</i> , 1997
Poliovírus	nativo		5,04	1000 cm <sup>-1</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
Rhinovírus	nativo		11,13	600 cm <sup>-1</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
FMDV "Foot mouth disease virus" (vírus da febre aftosa)	nativo		5,90	800 cm <sup>-1</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 1999
Bacteriófago P22	nativo	0,91	5,60	950 cm <sup>-1</sup>	Sousa <i>et al.</i> , 1999
Bacteriófago P22	mutante T294I	0,55	3,90	900 cm <sup>-1</sup>	Sousa <i>et al.</i> , 1999
FHV "Flock house virus"	nativo	1,30	8,5	1200 cm <sup>-1</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 2000
FHV "Flock house virus"	mutante D75N	0,85	7,41	>800 cm <sup>-1</sup>	Oliveira <i>et al.</i> , 2000
FHV "Flock house virus"	nativo	1,02	6,20	>900 cm <sup>-1</sup>	Swarcz <i>et al.</i> , 2004
Vírus Mayaro	nativo	0,95	2,63	700 cm <sup>-1</sup>	Gaspar <i>et al.</i> , 2001
Vírus Mayaro	nucleocapsídeo	0,50	1,55	700 cm <sup>-1</sup>	Gaspar <i>et al.</i> , 2001
Rotavírus	nativo		3,91	1000 cm <sup>-1</sup>	Pontes <i>et al.</i> , 2001
Bacteriófago MS2	nativo		7,22	1800 cm <sup>-1</sup>	Lima <i>et al.</i> , 2006

Tabela 1 – Cálculo da estequiometria de uréia (a partir da metodologia empregada nesta tese) nos processos de dissociação e desnaturação de diversos vírus da literatura a pressão atmosférica, baseados respectivamente, nos dados de espalhamento de luz e desvio de centro de massa do espectro de emissão de fluorescência do triptofano. \*: Dissociação foi baseada em desvio de centro de massa, no referido artigo; o valor da respectiva estequiometria calculada como desnaturação está em parêntese. Valores sublinhados de estequiometria correspondem a cálculos baseados nas curvas de dissociação e desnaturação por pressão (desta tese).

Basicamente, os vírus são formados por um genoma, constituídos por um ácido nucléico (RNA ou DNA), e uma capa protéica que envolve e protege este material genético. Este capsídeo protéico pode apresentar na maioria das vezes simetria helicoidal, como o TMV, ou simetria icosaédrica (esférica), como os vírus listados na Tabela 1. Alguns vírus ainda possuem uma membrana lipídica que protege o complexo ácido nucléico-proteína denominado nucleocapsídeo. Esta membrana que envolve os vírus (quando presente) é chamada de envelope viral (formado basicamente por uma bicamada lipídica), e é adquirido durante o processo de maturação do nucleocapsídeo, quando a partícula recém formada deixa a célula hospedeira.

De forma interessante, a maioria das estequiometrias aparentes de uréia nos processos de dissociação calculados encontrou-se entre 0,5 a 1,5 mols de uréia/mol de subunidade de vírus, enquanto para a desnaturação a maioria das estequiometrias aparentes estava entre 4 a 11 mols de uréia/mol de subunidade de vírus.

Os vírus Mayaro e Rotavírus apresentaram uma estequiometria aparente relativamente baixa para desnaturação e dissociação. Tais resultados parecem refletir um efeito linear em relação à concentração de uréia, de 0 a 8,0 M, observados nestes processos (Figura 2, Gaspar *et al.*, 2001 e Figura 1A, Pontes *et al.*, 2001), enquanto que em outros vírus o efeito da uréia é menos abrupto, exibindo curvas com formato sigmoidal, como apresentado pelo TMV, mostrado nesta tese na Figura 5. O Rotavírus possui uma organização mais complexa, em comparação a outros vírus de simetria icosaédrica, possuindo 3 proteínas diferentes na constituição de seu capsídeo, enquanto o vírus Mayaro é constituído por um envelope viral. É possível que em ambos os vírus, tenha ocorrido uma diminuição de acessibilidade de uréia no intervalo de concentração de uréia analisado, 0 a 8,0 M.

Comparando o vírus Mayaro (envelopado) com sua forma nucleocapsídica (sem sua bicamada lipídica, portanto, sem seu envelope), a ureia para estequiometria aparente de ureia para os processos de dissociação e desnaturação foram menores para a forma nucleocapsídica. Uma possível explicação para este resultado é que o envelope viral (membrana lipídica) poderia dificultar a interação da ureia com a proteína capsídica, e conseqüentemente, apresentar uma maior estequiometria aparente de ureia para causar os processos de dissociação e de desnaturação, comparado a outros tipos de estados virais.

Embora a maioria dos vírus estudados usassem o desvio para o vermelho do espectro de emissão de fluorescência de triptofano como critério para monitorar o processo de desnaturação, para o bacteriófago R17 (Da Poian *et al.*, 1993) e o “*cowpea severe mosaic virus*” (Gaspar *et al.*, 1997) os autores consideraram como critério de dissociação essa medida experimental. O valor das estequiometrias aparentes de ureia calculadas para o processo de dissociação para esses vírus foram, respectivamente, 5,27 e 3,26 mols de ureia/por de subunidade de proteína. Esses valores foram muito altos, comparando-se aos valores encontrados para os outros vírus. Se considerarmos que as mudanças espectroscópicas de desvio do centro de massa para o vermelho estão medindo desnaturação, as estequiometrias aparentes de ureia neste processo correspondem a 9,42 e 7,55 mols de ureia/ subunidade de proteína desnaturada, Tabela 1, dados em parênteses. Isso pode indicar que as mudanças espectrais para o bacteriófago R17 e o “*cowpea severe mosaic virus*” podem corresponder à desnaturação, e não dissociação, como são interpretados nestes trabalhos.

A comparação do bacteriófago R17 (vírus nativo) com dímeros de sua proteína capsídica (vírus sem a presença do ácido nucléico), mostrou uma menor estequiometria aparente de ureia para os processos de dissociação e desnaturação para a forma dimérica.

Uma possível explicação para este resultado seria que a interação das subunidades protéicas com o ácido nucléico presente no vírus nativo, pode induzir a uma maior estequiometria aparente de uréia para ocorrer os processos de dissociação e desnaturação do bacteriófago R17 nativo, comparando-se somente com as proteínas diméricas, sem a presença do ácido nucléico.

Uma interessante aplicação da metodologia empregada nesta tese é a investigação da estequiometria aparente de dissociação e desnaturação em proteínas multiméricas ou monoméricas que poderá levar a resultados significativos para melhor entendimento dos processos de dissociação e desnaturação. Uma vez que fenômenos relacionados à desnaturação são frequentes em sistemas biológicos, tais como equilíbrio dinâmico entre estados nativos e conformações desnaturadas nas células, proteólises e “*turnover*” de proteínas (Dill & Shortle, 1991). Assim, o detalhamento termodinâmico do processo de desnaturação é essencial para a melhor compreensão desses fenômenos.

Nossos resultados apontam para uma estequiometria aparente de uréia que são semelhantes para os processos de dissociação e desnaturação. Como foram observadas as estequiometrias aparentes de uréia foram maiores para o processo de desnaturação em comparação com o processo de dissociação. Isso pode refletir o fato do processo de desnaturação envolver mudanças estruturais mais drásticas, ocorrendo uma maior interação proteína-uréia. Uma explicação para o fato da dissociação depender de menores estequiometrias aparentes de uréia pode ser pelo fato dos vírus helicoidal (TMV) e icosaédricos (vírus listados na Tabela 1) apresentarem estabilidade relativamente fraca, e a presença de poucas moléculas de agentes perturbadores (uréia) são suficientes para causar a desestabilizam dessas partículas. Esse conhecimento pode ser fundamental para o desenvolvimento de novas técnicas antivirais.

Como visto, a metodologia aqui proposta, para melhor detalhar a interação proteína-uréia, pode ser estendida a outros sistemas e deverão contribuir para a compreensão do efeito de agentes desnaturantes nas proteínas e, conseqüentemente, da estabilidade de agregados protéicos e virais.

#### 5.4 – Efeito do hidrocloreto de guanidina (GndHCl) e pressão sobre o TMV: comparação do processo de desnaturação com a uréia

A desnaturação de proteínas utilizando compostos químicos vem sendo estudada há mais de um século, sendo que a uréia e o GndHCl são os mais utilizados. Este último, ao contrário da uréia, possui carga, e tem propriedade de se ligar fortemente às proteínas através do íon guanidino, tornando-se assim mais eficiente que a uréia (Arakawa, 1984).

Além de atuar como agente desnaturante, o GndHCl é também utilizado para promover agregação quando utilizado em concentrações subdesnaturantes (Tobler *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2004, McDuff *et al.*, 2004). Isso foi observado na presente tese, Figura 16A. O GndHCl é um sal, dissociando-se em ( $\text{GndH}^+$ ) e ( $\text{Cl}^-$ ) e os cátions podem interagir com os grupos carboxílicos do TMV (Figura 2), diminuindo a repulsão eletrostática entre subunidades, causando a estabilidade do TMV, e mesmo agregação. Esse efeito estabilizador do GndHCl em baixas concentrações também foi observado para a RNase T1 (Pace *et al.*, 1990, Mayr & Smith, 1993). O GndHCl em concentrações mais altas provocou um aumento da viscosidade do solvente e conseqüentemente desnaturação, isso dificultou uma análise mais profunda do processo de dissociação por alta pressão através de medidas de intensidade de espalhamento de luz, ao contrário do ocorrido com uréia. Assim, para os experimentos envolvendo GndHCl foram calculados apenas os parâmetros termodinâmicos aparentes envolvendo o processo de desnaturação.

Os dados de desvio de centro de massa por pressão (Figuras 10B e 18A) mostraram que o GndHCl foi mais eficiente que a uréia em provocar a desnaturação do TMV. Outro resultado comparativo que mostra esta eficiência são os dados de cromatografia em gel filtração (Figuras 15 e 20), as amostras de TMV na presença de GndHCl eluíram em um

único pico, sugerindo total desestruturação do TMV, diferentemente da uréia em que são observados vários picos de eluições, sugerindo a presença de amostras dissociadas ou desnaturadas de TMV com diferentes pesos moleculares.

Essa maior eficiência do GndHCl em relação à uréia provavelmente ocorre porque a ausência de carga da uréia não facilita as interações eletrostáticas com sítios carregados, presentes nas subunidades capsídicas do TMV, e essa interação mais fraca deve exigir maiores concentrações para desnaturar, resultando assim em uma maior estequiometria aparente de uréia (11,1 mols de uréia/mol de subunidade de TMV). Isso não é observado para o GndHCl que devido a presença de carga em sua estrutura interage mais facilmente com os grupos carboxílicos presentes no TMV, resultando em uma menor estequiometria aparente de GndHCl em comparação com a uréia para causar a desnaturação do TMV.

A maior eficiência do GndHCl não se resume simplesmente apenas na presença de carga em sua estrutura, a composição de aminoácidos do TMV também pode estar relacionada com essa sua atuação, pois os íons  $\text{GnH}^+$  interagem facilmente com resíduos de triptofanos presentes na proteína (Dempsey *et al.*, 2005, Mason *et al.*, 2007). Contudo, nosso objetivo principal foi apenas determinar a estequiometria aparente de uréia e de GndHCl nos processos de dissociação e desnaturação do TMV através da metodologia desenvolvida na presente tese, fazendo apenas uma análise comparativa e quantitativa dos efeitos destes desnaturantes sobre o TMV.

O efeito do pH, por outro lado, mostrou que altas concentrações de prótons protegem o TMV da desnaturação tanto com uréia quanto com GndHCl, Figura 21 inclusão. A presença de  $\text{H}^+$  diminui a repulsão eletrostática entre as subunidades, protegendo o TMV contra a dissociação (Santos *et al.*, 2004). Com a aplicação de alta

pressão os  $H^+$  ainda conseguem proteger o TMV contra a desnaturação por uréia, porém a proteção contra o GndHCl ocorre até 100 MPa, acima deste nível de pressão observa-se desnaturação. Isso pode ser explicado pelo fato dos íons  $GnH^+$  ganharem dos  $H^+$  a competição pela ligação com os grupos carboxílicos ou com novos sítios de ligações expostos pelas proteínas do TMV quando estas estão sendo desnaturadas por pressão, facilitando a interação GndHCl-TMV tornando este agente mais eficiente que a uréia em causar a desnaturação do TMV.

Podemos, na verdade, deduzir que deve ocorrer um equilíbrio na desnaturação do TMV por GndHCl envolvendo a liberação de  $H^+$  da seguinte maneira:



$P_{2130}N$  representa a molécula viral integra,  $\omega$  é o coeficiente estequiométrico de GndHCl necessário para causar a desnaturação do TMV,  $K$  é a constante de equilíbrio de desnaturação a pressão atmosférica,  $PGnHCl\omega$  representa as 2130 subunidades desnaturadas e ligadas ao GndHCl,  $N$  o material genético (RNA), e  $\nu_H$  é o mol de  $H^+$  liberado no processo de desnaturação do TMV.

Isso sugere uma participação de prótons suscetível à quantificação. Experimentos futuros análogos aos realizados na presente tese poderão mostrar uma estequiometria de prótons no processo de desnaturação, e a comparação utilizando os diferentes agentes desnaturantes, uréia e GndHCl, certamente levarão a resultados bastante interessantes.

Em resumo nossos resultados mostraram que ambos agentes, uréia e GndHCl, causaram a desnaturação do TMV, sendo, o GndHCl mais eficiente que a uréia, comparando-se em relação à concentração molar de ambos, o que também foi observado utilizando-se alta pressão hidrostática, Figura 21.

## 6 – CONCLUSÕES

- A desnaturação do TMV é um processo que se dá na forma dissociada, pelo menos em condições controladas de aumento de uréia e/ou de pressão em combinação com este agente.
- A direta aplicação do modelo aqui proposto mostra estequiometria de dissociação (por uréia) e de desnaturação bem definidas.
- A estequiometria de agente desnaturante (uréia) para dissociar é bem menor que para desnaturar (1,53 e 11,1 mols de uréia/mol de subunidade de TMV), provavelmente devido a processos de interações muito mais “abrangentes” nas subunidades no caso da desnaturação, enquanto “poucos” contatos uréia-TMV são suficientes para dissociação.
- O modelo, aplicado a outros vírus, mostra também estequiometria de uréia para dissociação e desnaturação bem definidas, e também valores comparáveis aos encontrados para o TMV. Isso deve ser relacionado a semelhantes mecanismos de interação uréia-proteína nos diferentes vírus.
- A comparação de estequiometria de uréia e GndHCl (respectivamente, 11,1 e 7,5 mols de agentes desnaturantes/mol de subunidade de TMV) mostrou uma maior eficiência do GndHCl para causar a desnaturação do TMV.
- O GndHCl desnatura o TMV em concentrações significativamente inferiores à uréia, a exemplo do que ocorre com proteínas em geral. É possível que isso se deva à carga do GndHCl, que pode corresponder a maior afinidade desse agente na desnaturação.
- Dados preliminares apontam que baixos valores de pH protegem o TMV contra a desnaturação tanto por uréia quanto por GndHCl, sugerindo que esse processo possa ser dependente de liberação de prótons. Outra possibilidade é a estabilização da forma

associada do TMV pelo baixo pH, com conseqüente proteção à desnaturação. Experimentos envolvendo desnaturação de proteínas monoméricas pela uréia e GndHCl em diferentes valores de pH devem esclarecer melhor esse fenômeno.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKAWA, T & TIMASHEF S. N. (1984). Protein stabilization and destabilization by guanidium salts. *Biochemistry*. **23**, 3597-3603.
- ASSELIN, A. & ZAITLIN, M. (1978). Characterization of a second protein associated with virion of tobacco mosaic virus. *Virology* **91**, 173-181.
- BALNY, C. (2006) What lies in the future of high-pressure bioscience?, *Biochim. Biophys. Acta*. **1764**, 632-639.
- BHYRAVBHATLA, B., WATOWICH, S. J. & CASPAR, D. L. (1998) Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-Å resolution. *Biophys. J.* **74**, 604-615.
- BISPO, J. A., SANTOS, J. L. R., LANDINI, G. F., GONÇALVES, J. M., & BONAFE, C. F. S. (2007). pH dependence of the dissociation of multimeric hemoglobin probed by high hydrostatic pressure, *Biophys. Chem.* **125**, 341-349.
- BISPO, J. A., LANDINI, G. F., SANTOS, J. L., NORBERTO, D. R. & BONAFE, C. F. (2005). Tendency for oxidation of annelid hemoglobin at alkaline pH and dissociated states probed by redox titration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **141**, 498-504.
- BLOWERS, L. E. & WILSON, T. M. A. (1982). The effect of urea on tobacco mosaic virus-polarity of disassembly. *J. Gen. Virol.* **61**, 137-141.

- BONAFE, C. F. S., GLASER, M., VOSS, E. W., WEBER, G., & SILVA, J. L. (2000). Virus inactivation by anilinoanthralene sulfonate compounds and comparison with other ligands, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 955-961.
- BONAFE, C. F. S., VITAL, C. M. R., TELLES, R. C. B.; GONÇALVES, M. C., MATSUURA, M.S.A., PESSINE, F. B. T., FREITAS, D. R. C. & VEJA, J. (1998). Tobacco mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry* **37**, 11097-11105.
- BONAFE, C. F. S., ARAUJO, J. R. V. & SILVA, J. L. (1994). Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry* **33**, 2651-2659.
- BONAFE, C. F. S., VILLAS-BOAS, M. S., SUAREZ, M. C. & SILVA, J. L. (1991). Reassembly of a large multisubunit protein promoted by nonproteic factors. Effect of calcium and glycerol on the reassociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13210-13216.
- BUTLER, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus particle: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 537-550.
- CASPAR, D. L. (1963). Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Adv Protein Chem.* 1963; **18**, 37-121.
- COURTENAY, E. S., CAPP, M. W. & RECORD JR. M.T. (2001). Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: relationship between

- solute effects on protein stability and changes in water-accessible surface area. *Protein Sci.* **10**, 2484 – 2497.
- CULVER, J. N. (2002). Tobacco mosaic virus: assembly and disassembly determinants in pathogenicity and resistance. *Annu Rev Phytopathol.* **40**, 287-308.
- DA POIAN, A. T., OLIVEIRA, A. C. & SILVA, J. L. (1995). Cold denaturation of an icosahedral virus: the role of entropy in virus assembly. *Biochemistry* **34**, 2672-2677.
- DA POIAN, A. T., JOHNSON, J. E. & SILVA, J. L. (1994). Differences in pressure stability of the three components of cowpea mosaic-virus: implications for virus assembly and disassembly. *Biochemistry* **33**, 8339-8346.
- DA POIAN A. T., OLIVEIRA A. C., GASPAR, L. P., SILVA J. L. & WEBER, G. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *J Mol Biol.* **231**, 999-1008.
- DEMPSEY, C. E., PIGGOT, T. J. AND MASON, P. E. (2005). Dissecting Contributions to the Denaturant Sensitivities of Proteins. *Biochemistry* **44**, 775-781.
- DILL, K. A. & SHORTLE, D. (1991). Denatured states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 795-825.
- ERIJMAN, L. & WEBER, G. (1991). Oligomeric protein associations: transition from stochastic to deterministic equilibrium. *Biochemistry* **30**, 1595-1599.
- FERREON, A. C. M. & BOLEN, D. W. (2004). Thermodynamics of denaturant-induced unfolding of a protein that exhibits variable two-state denaturation. *Biochemistry.* **43**, 13357-13369.

- GASPAR, L. P., TEREZAN, A. F., PINHEIRO, A. S., FOGUEL, D., REBELLO, M. A., & SILVA, J. L. (2001). The metastable state of nucleocapsids of enveloped viruses as probed by high hydrostatic pressure, *J. Biol. Chem.* **276**, 7415-21.
- GASPAR L. C., JOHNSON, J. E., SILVA, J.L. & DA POIAN, A. T. (1997). Partially folded states of the capsid protein of cowpea severe mosaic virus in the disassembly pathway. *J. Mol. Biol.* **273**, 456-466.
- GOELET, P., LOMONOSSOFF, G. P., BUTLER, P. ., AKAM, M. E., GAIT, M. J. & KARN, J. (1982). Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**, 5818-5822.
- GOMES, A. M. O., PINHEIRO, A. S., BONAFE, C. F. S. & SILVA, J. L. (2003). Pressure-induced fusogenic conformation of vesicular stomatitis virus glycomprotein. *Biochemistry* **42**, 5540-5546.
- GREENE, R. F. & PACE, C. N. (1974). Urea and guanidinium chloride denaturation of ribonuclease,  $\alpha$ -chymotrypsin, and  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Biol. Chem.* **249**, 5388 – 5393.
- HARRINGTON, W. F. & SCHACHMAN, H. K. (1956). Studies on the alkaline degradation of tobacco mosaic virus. I. Ultracentrifugal analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **65**, 278-295.
- HEREMANS, K. H. H. (1982). High pressure effects upon proteins and other biomolecules, *Annu. Ver. Biophys. Bioeng.* **11**, 1-21.
- HIRTH, L. & RICHARDS, K. E. (1981). Tobacco mosaic virus. *Adv. Virus Res.* **26**, 145-199.

- HOGUE, R. & ASSELIN, A. (1984). Study of tobacco mosaic-virus invitro disassembly by sucrose density gradient centrifugation and agarose-gel electrophoresis. *Can. J. Bot.* **62**, 457-462.
- ISHIMARU, D., SA-CARVALHO, D., & SILVA, J. L (2004). Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine, *Vaccine* **22**, 2334-2339.
- JURKIEWICS, E., VILLAS-BOAS, M., SILVA, J.L., WEBER, G., HUNSMAN, G. & CLEGG, R.M. (1995). Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 6935-6937.
- KLUG, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 531-535.
- KLUG, A. (1972). Assembly of tobacco mosaic virus. *Fed. Proc.* **31**, 30-42.
- LAKOWICZ, J. R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy. Plenum Press, New York.
- LIMA, S. M., VAZ, A. C., SOUZA, T. L., PEABODY, D. S., SILVA, J. L., AND OLIVEIRA, A. C. (2006). Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acid interactions in MS2 bacteriophage stability, *FEBS J.* **273**, 1463-1475.
- LIMA, L. M., CORDEIRO, Y., TINOCO, L. W., MARQUES, A. F., OLIVEIRA, C. L. SAMPATH, S., KODALI, R., CHOI, G., FOGUEL, D., TORRIANI, I, CAUGHEY, B. & SILVA, J. L. (2006). Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry* **45**, 80-87

- MAKHATADZE, G. I. (1999). Thermodynamics of protein interaction with urea and guanidinium hydrochloride. *J. Phys. Chem.* **103**, 4781-4785.
- MASON, P. E., BRADY, W. J., NELSON, G. W. & DEMPSEY, C. E. (2007). The interaction of guanidinium ions with a model peptide. *Biophysical J.*
- MAYR, L. M. & SMITH, F. X. (1993). Stabilization of a protein by guanidinium chloride. *Biochemistry*, **32**, 7994-7998.
- MCDUFF, F. O., DOUCET, A. & BEAUREGARD, M. (2004). Low concentration of guanidine hydrochloride induces the formation of an aggregation-prone state in  $\alpha$ -urease. *Biochem Cell Biol.* **82**, 305-313.
- MESH, T., KIYAMA, R., OHNO, T. & OKADA, Y. (1983). Nucleotide sequence of the coat protein cistron and the 3' noncoding region of cucumber green mottle mosaic virus (watermelons strain) RNA. *Virology* **127**, 54-64.
- MILLER, J. W., NESTLER, F. H. M. & SCHRAG J. L. (2004). Quantitative analysis of aggregation in dilute solutions of effectively rigid biomacromolecules via the combination of oscillatory flow birefringence and viscoelasticity measurements: example study of aggregation of bovine fibrinogen in aqueous glycerol, and detection of a large aggregate formed on addition of guanidine hydrochloride. *Biophys. Chem.* **112**, 155-163.
- MOGLICH, A., KRIEGER, F. & KIEFHABER, T. (2005). Molecular basis for the effect of urea and guanidinium chloride on the dynamics of unfolded polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* **345**, 153-162.

- MOUGEL, M., EYERMAN, F., WESTHOF, E., ROMBY, P., EXPERT-BEZANCON, A., EBEL, J.P., EHERSMANN, B. & EHRESMANN, C. (1987). Binding of escherichia coli ribosomal protein S8 to 16 S rRNA. A model for the interaction and the tertiary structure of the RNA binding site. *J. Mol. Biol.* **198**, 91-107.
- NAMBA, K., PATTANAYEK, R., & STUBBS, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *J. Mol. Biol.* **208**, 307-325
- NOORDAN, D. (1973). In identification of plant viruses. Methods & experiments. *Centre for Agricultural and Documentation Wageningen*.
- OHNO, T. & OKADA, Y. (1977). Polarity of stripping of tobacco mosaic-virus by alkali and sodium dodecyl-sulfate. *Virology* **76**, 429-432.
- OLIVEIRA, A. C., GOMES, A. M., ALMEIDA, F. C., MOHANA-BORGES, R., VALENTE, A. P., REDDY, V. S., JOHNSON, J. E., AND SILVA, J. L. (2000). Virus maturation targets the protein capsid to concerted disassembly and unfolding. *J. Biol. Chem.* **275**, 16037-43.
- OLIVEIRA, A. C., ISHIMARU, D., GONCALVES, R. B., SMITH, T. J., MASON, P., SACARVALHO, D., & SILVA, J. L. (1999). Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. *Biophys. J.* **76**, 1270-1279.
- PACE, C. N., LAURENTS, D. V. & THOMSON, J. A. (1990). pH dependence of the urea and guanididine hydrochloride denaturation of ribonuclease A and ribonuclease T1. *Biochemistry*, **29**, 2564-2572.

- PACE, C.N. (1986). Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves. *Meth. Enzymol.* **131**, 266 – 280.
- PALADINI, A. A. & WEBER, G. (1981). Absolute measurements of fluorescence polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 419-427.
- PERHAM, R. N. & WILSON, T.M.A. (1978). Characterization of intermediates formed during disassembly of tobacco mosaic-virus at alkaline pH. *Virology* **84**, 293-302.
- PERHAM, R. N. & WILSON, T.M.A. (1976). Polarity of stripping of coat protein subunits from RNA in tobacco mosaic-virus under alkaline conditions. *FEBS Lett.* **62**, 11-15.
- PERHAM, R. N. (1969). Sucrose density-gradient analysis of alkaline degradation of tobacco mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **45**, 439-441.
- PITZER, K. S. & BREWER, L. (1961). *Thermodynamics*, Mc Graw-Hill, Tokio.
- PONTES, L., CORDEIRO, Y., GIONGO, V., VILLAS-BOAS, M. S., BARRETO, A., ARAUJO, J.R.V. & SILVA, J.L. (2001). Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein *J. Mol. Biol.* **307**, 1171-1179.
- POWELL C. A. (1975). Effect of cations on alkaline dissociation of tobacco mosaic-virus. *Virology* **64**, 75-85.
- RAGHAVENDRA, K., KELLY, J. A., KHAIRALLAH, L. & SCHUSTER, T.M. (1988). Structure and function of disk aggregates of the coat protein of tobacco mosaic virus. *Biochemistry* **27**, 7583-7588.

- RESHETNYAK, Y. K., KOSHEVNIK, Y., & BURSTEIN, E. A. (2001). Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys. J.* **81**, 1735-1758.
- SANTOS, J. L., BISPO, J. A., LANDINI, G. F., & BONAFE, C. F. S. (2004). Proton dependence of tobacco mosaic virus dissociation by pressure, *Biophys. Chem.* **111**, 53-61.
- SCHOLTZ, J. M., BARRICK, D., YORK, E. J., STEWART, J. M., AND BALDWIN. R. L. (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 185-189.
- SCHUSTER, T. M., SCHEELE, R. B., ADAMS, M. L., SHIRE, S. J., STECKERT, J. J. & POTSCHKA, M. (1980). Studies on the mechanism of assembly of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.* **32**, 313-329.
- SCHWARCZ, W. D., BARROSO S. P., GOMES, A. M., JOHNSON J. E., SCHNEEMANN, A., OLIVEIRA, A. C., & SILVA, J. L. (2004). Virus stability and protein-nucleic acid interaction as studied by high-pressure effects on nodaviruses, *Cell. Mol. Biol.* **50**, 419-427.
- SHALABY, R. A., STEVENS, C. L. & LAUFFER, M. A. (1982). Ultracentrifugation studies on early stage polymerization of tobacco mosaic virus protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **218**, 384-401.

- SHALABY, R. A. F. & LAUFFER, M. A. (1977). Hydrogen ion uptake upon tobacco mosaic virus protein polymerization. *J. Mol. Biol.* **116**, 709-725.
- SILVA, J. L., OLIVEIRA, A. C., GOMES, A. M., LIMA, L. M., MOHANA-BORGES, R., PACHECO, A. B., & FOGUEL, D. (2002). Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly, *Biochim. Biophys. Acta.* **25**, 250-265.
- SILVA, J. L., FOGUEL, D. & ROYER, C.A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 612-618.
- SILVA, J. L. (1993). In *high pressure Chemistry, Biochemistry and Material Science*, NATO ASI Series, ed. Winter, R & Jonas, L. (Kluwer, Dordrecht, The Netherland), Vol. 401, p. 561 – 578. Silva, J.L. & Weber, G. ( 1993). Pressure stability of protein. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 89-113.
- SILVA, J. L. & WEBER, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Adv. Rev. Phys Chem.* **44**, 89-113.
- SILVA, J. L., VILLAS-BOAS, M. S., BONAFE, C. F. S. & MEIRELLES, N. C. (1989). Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **264**, 15863-15868.
- SILVA, J. L. & WEBER, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **199**, 149-159.

- SOUSA, P. C. JR., TUMA, R., PREVELIGE, P. E. JR., SILVA, J. L., AND FOGUEL, D. (1999). Cavity defects in the procapsid of bacteriophage P22 and the mechanism of capsid maturation, *J. Mol. Biol.* **287**, 527-538.
- STUBBS, G. (1999). Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci.* **354**, 551-557.
- TOBLER, S. A. & FERNANDEZ, E. J. (2002). Structural features of inteferon- $\gamma$  aggregation revealed by hydrogen exchange. *Protein Sci.* **11**, 1340-1352.
- VIVIAN, J. T., AND CALLIS, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins *Biophys. J.* **80**, 2093-2109
- WEBER, G., DA POIAN, A.T., & SILVA, J. L. (1996). Concentration dependence of the subunit association of oligomers and viruses and the modification of the latter by urea binding, *Biophys. J.* **70**, 167-173.
- WEBER, G. (1986). Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and of hydrostatic pressure. *Biochemistry* **25**, 3626-3631.
- WEBER, G. & DRICKAMER, H. G. (1983). The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 89-112.
- ZIMMERN, D. & BUTTLER, P. J. G. (1977). Isolation of tobacco mosaic-virus RNA fragments containing origin for viral assembly. *Cell* **11**, 455-462.
- ZLOTNICK, A. (2007). Distinguishing reversible from irreversible virus capsid assembly. *J. Mol Biol.* **9**, 14-18.

## Curriculum Vitae

JOSÉ LUIS DA ROCHA SANTOS, 15/05/1975, Brasileiro

### EDUCAÇÃO

- Licenciatura em Ciências Biológicas – UNIANCHIETA – SP (1995-1999).
- Especialização em Microbiologia – OSVALDO CRUZ – SP (2000 -2001).
- Mestre em Biologia Funcional e Molecular –UNICAMP (2002-2004).
- Doutorado em Biologia Funcional e Molecular – UNICAMP (2005-2008).

### ATIVIDADES PROFISSIONAIS

- Estágio no laboratório de Termodinâmica de Proteínas – Departamento de Bioquímica – UNICAMP (2001).
- Bolsa de Mestrado do CNPq (2002-2004).
- Bolsa de Doutorado do CNPq (2005-2008).

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- Participações em Congressos Nacionais: 09
- Participações em Congressos Internacionais: 01

### PUBLICAÇÕES

“Different Urea Stoichiometries Between the Dissociation and Denaturation of Tobacco Mosaic Virus as Probed by Hydrostatic Pressure.

SANTOS, J. L. R., APARICIO, R., JOEKES, I., SILVA, J. L., BISPO, J. A., & BONAFÉ, C. F. S. *Biophys. Chem.* (2008) “in press” artigo aceito em março de 2008.

“pH Dependence of the Dissociation of Multimeric Hemoglobin Probed by High Hydrostatic Pressure”.

BISPO, J. A., SANTOS, J. L. R., LANDINI, G. F., GONÇALVES, J. M., & BONAFE, C. F. S. *Biophys. Chem.* 125, 341-349. (2007).

“Tendency for Oxidation of Annelid Hemoglobin at Alkaline pH and Dissociated States Probed by Redox Titration”.

BISPO, J. A., LANDINI, G. F., SANTOS, J. L., NORBERTO, D. R. & BONAFE, C. F. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 141, 498-504. (2005).

“Proton Dependence of Tobacco Mosaic Virus Dissociation by Pressure”.

SANTOS, J. L., BISPO, J. A., LANDINI, G. F., & BONAFE, C. F. S. *Biophys. Chem.* 111, 53-61. (2004).