

ESTUDO TERMODINÂMICO DA DISSOCIAÇÃO DO VÍRUS DO MOSAICO DO TABACO (TMV) POR PRESSÃO E BAIXA TEMPERATURA

Rosiani Carla Baron Telles

Orientador : Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

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

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas, SP - Brasil
1998

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Rosiani Carla Baron Telles
e aprovada pela Comissão Julgadora.

12/08/98
[Assinatura]

T238e

35244/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TI UNICAMP
	T238e
V.	Ex
TUMBO BC/	35244
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	01/10/98
N.º CPD	

CM-00117196-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

T238e Telles, Rosiani Carla Baron
Estudo termodinâmico da dissociação do vírus do mosaico do tabaco (TMV) por pressão e baixa temperatura / Rosiani Carla Baron Telles. -- Campinas, SP, : [s.n.], 1998.

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

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

Campinas, 12 de agosto de 1998.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Jerson Lima Silva

Assinatura

Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

PEDRO LUIZ ONOFRIO VOLPE

Assinatura

Prof. Dr. Carlos F. S. Bonafé

CARLOS FRANCISCO SAMPAIO BONAFÉ

Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

Assinatura

Aos meus pais,
às minhas irmãs
e aos meus
sobrinhos, com
todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar presente.

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé pela orientação e pelo incentivo durante esses anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine pela colaboração e discussão desse trabalho.

A Profa. Dra. Maria S. Arita Matsuura pelas discussões e por ter cedido seu laboratório para a realização desse trabalho.

A Profa. Dra. Denise e a Profa. Dra. Lúcia da S. Pereira por terem colaborado ao cederem o laboratório para o desenvolvimento do trabalho experimental.

Ao Frazatto e Roberto pela paciência no conserto dos aparelhos do espectrofluorímetro e do HPLC.

Ao pessoal do CT pela ajuda no conserto da câmara de alta pressão.

Ao Reinaldo e a Claudia pela atenção e ajuda no manuseio do espectrofluorímetro.

Ao Daniel pelas discussões e pela gentileza de sempre me ajudar em qualquer problema com o micro ou outro aparelho.

A Juliana, técnica do laboratório, pela disponibilidade, atenção e pela amizade.

A Jusceley, que conviveu comigo durante toda essa etapa, pelo seu incentivo e por sua amizade. A amizade é essencial para a alma.

A Zizi pelas discussões, pelos conselhos, pelo apoio, pela amizade e por todas as incertezas.

A Aninha pela amizade, pelo incentivo e pelas oportunidades que me deu de conhecer lugares belíssimos.

As amigas Andreia, Paola e Elzira, e aos amigos Paulo e Francisco.

Aos amigos da Bioquímica que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho e pelo convívio, e principalmente ao pessoal animadíssimo do laboratório do Prof. Dr. Hiroshi.

A Cris por ser mais que uma amiga.

A Andrea, Marina e Miriam pela atenção.

A CAPES pela bolsa fornecida.

A FAEP/UNICAMP, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro em projetos de pesquisas aprovados.

RESUMO

Investigou-se o efeito de alta pressão combinado com baixa temperatura na ausência e presença de uréia no Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV). O estado de agregação e o processo de desnaturação foram analisados através de medidas espectroscópicas. A incubação a 0 °C e 2,5 kbar induziu dissociação significativa, sem ocorrência de desnaturação. Nas diferentes concentrações virais o valor de $p_{1/2}$ (pressão na qual 50% do vírus está dissociado) foi 1,2 kbar, indicando a não dependência de concentração de TMV na curva de dissociação por pressão. Isso pode ser explicado através da heterogeneidade do TMV quanto à energia livre de associação. A entalpia e entropia aparentes de dissociação (ΔH_{dis}^* e $T\Delta S_{dis}^*$) foram -6,9 e -15,3 kcal/mol de subunidade, respectivamente, indicando que a associação do TMV é um processo entropicamente dirigido. A energia livre aparente de estabilização dada pela presença de RNA foi -1,7 kcal/mol de subunidade. A alta pressão induziu desnaturação significativa do TMV em presença de 2,5 M de uréia, causando uma variação de volume aparente de desnaturação de -105,0 mL/mol. A entalpia e entropia aparente de desnaturação (ΔH_{den}^* e $T\Delta S_{den}^*$) por uréia 1,75 M em 2,5 kbar foi -11,1 e -10,2 kcal/mol, respectivamente, portanto com energia livre de desnaturação perto de zero. Como o processo de dissociação do TMV não está em equilíbrio verdadeiro, determinaram-se os parâmetros termodinâmicos assumindo a condição de estado estacionário.

SUMMARY

We investigated the effect of low temperature and urea combined with high pressure on Tobacco Mosaic Virus (TMV). The evaluation of its aggregation state and denaturation process was studied using spectroscopic methods. The incubation at 2.5 kbar and 0 °C induced significative dissociation. Under such conditions extensive denaturation did not occur. At different TMV concentrations the $p_{1/2}$ was 1.2 kbar. This result shows absence of concentration dependence of TMV dissociation by pressure, that can be explained by the TMV association energy heterogeneity. The apparent enthalpy and entropy of dissociation (ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{dis}^*$) were -6,9 and -15,3 kcal/mol of subunit respectively, indicating that the TMV association is an entropically driven process. The apparent free energy of stabilization given by the presence of RNA is at least -1.7 kcal/mol of subunit. High pressure induced remarkable TMV denaturation in the presence of 2.5 M urea, with a volume change of -105 mL/mol of denaturated subunit. The apparent enthalpy and entropy of denaturation (ΔH_{den}^* and $T\Delta S_{den}^*$) by 1.75 M urea at 2.5 Kbar was -11.1 and -10.2 kcal/mol of subunit, respectively, demonstrating that the TMV protein coat presents an apparent free energy of denaturation by urea close to zero. Although the processes could not be assumed to be equilibria, these thermodynamic parameters could be derived by assuming a steady-state condition.

ABREVIATÖES

Bis-ANS	(Bis-(8-anilinonaftaleno-1-sulfonato))
BMV	"Brome Mosaic Virus"
CPMV	Vírus do Mosaico do "Cowpea"
CPMSV	Vírus do Mosaico do "Severe Cowpea"
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
RNA	Ácido Ribonucleico
TnC	Troponina C
TMV	Vírus do Mosaico do Tabaco

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
1- Termodinâmica de dissociação por alta pressão hidrostática.....	4
2- Efeito de alta pressão em presença de uréia.....	9
3- Efeito de alta pressão e baixa temperatura.....	10
4- Estrutura do TMV.....	10
OBJETIVOS.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
1-Reagentes.....	15
2- Purificação do TMV.....	15
3- Equipamento de alta pressão hidrostática.....	16
4- Estudos de fluorescência e espalhamento de luz sob pressão.....	20
RESULTADOS.....	22
1- Efeito de alta pressão em TMV em diferentes concentrações virais.....	22
2- Efeito de alta pressão na dissociação de TMV diferentes concentrações na presença de uréia.....	33
3- Alta pressão e baixa temperatura em TMV na ausência e presença de uréia.....	42
DISCUSSÃO.....	54
1- Efeito de pressão em TMV.....	54
2- Alta pressão em diferentes concentrações de TMV: heterogeneidade quanto à energia livre de dissociação.....	58

3- Alta pressão em diferentes concentrações de TMV em presença de uréia: desnaturação por pressão.....	62
4- Alta pressão e baixa temperatura em TMV na ausência e presença de uréia: dissociação e desnaturação.....	63
PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE FIGURAS

1 Representação esquemática do TMV e da proteína capsídica.....	11
2 Esquema do sistema de pressão hidrostática.....	18
3 Esquema da câmara de pressão em corte lateral.....	19
4 Efeito de pressão a 0 °C na intensidade do espalhamento de luz, em diferentes concentrações de TMV.....	24
5 Efeito de pressão a 0 °C no espectro de fluorescência em diferentes concentrações de TMV.....	25
6 Efeito de pressão a 0 °C no centro de massa do espectro de fluorescência em diferentes concentrações de TMV.....	26
7 Efeito de pressão na dissociação de TMV na constante K_{dis}^* em diferentes concentrações.....	31
8 Efeito de pressão no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV em presença de uréia.....	36
9 Efeito de pressão na intensidade do espalhamento de luz em presença de 2,5 M de uréia, em diferentes concentrações de TMV.....	38
10 Efeito de pressão no centro de massa do espectro de fluorescência em presença de 2,5 M de uréia, em diferentes concentrações de TMV.....	39
11 Efeito de pressão na desnaturação do TMV em presença de 2,5 M de uréia.....	41

12 Efeito de pressão e baixa temperatura na intensidade do espalhamento de luz do TMV.....	44
13 Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de fluorescência do TMV.....	45
14 Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV	46
15 Gráfico de van't Hoff relacionado à dissociação do TMV.....	48
16 Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV em presença de uréia.....	52
17 Gráfico de van't Hoff relacionado à desnaturação do TMV em uréia e alta pressão.....	53
18 Esquema do processo de dissociação e desnaturação do TMV induzido por alta pressão.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cálculo de $\ln K_{dis}^*$ a 0 °C para 0,5 mg de TMV/mL.....	30
Tabela 2- Valores de ΔV_{dis}^{0*} e $p_{1/2dis}$ referentes a diferentes concentrações de TMV a 0°C	32
Tabela 3- Valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$ de desnaturação de 1,0 mg/mL de TMV referentes à alta pressão em diferentes concentrações de uréia.....	37
Tabela 4- Valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$ de desnaturação por uréia 2,5 M e alta pressão em diferentes concentrações de TMV.....	40
Tabela 5- Cálculo para os valores de ΔH_{dis}^* e ΔS_{dis}^* referentes ao TMV submetido a 1,75 kbar e baixa temperatura.....	47
Tabela 6- Entalpia (ΔH_{dis}^*) e entropia (ΔS_{dis}^*) aparentes de dissociação do TMV a diferentes pressões.....	49
Tabela 7- Valores de ΔH_{den}^* e ΔS_{den}^* do TMV A 2,5 kbar e baixa temperatura em diferentes concentrações de uréia.....	51

LISTA DE FÓRMULAS

pág.

$$(1) K_p = K_{atm} e^{(p\Delta V_{dis}^0/RT)} \dots\dots\dots 4$$

$$(2) \ln K_p = \ln K_{atm} + \frac{p\Delta V_{dis}^0}{RT} \dots\dots\dots 5$$

$$(3) X_n \leftrightarrow nX \dots\dots\dots 5$$

$$(4) K_p = \frac{[X]^n}{[X_n]} \dots\dots\dots 5$$

$$(5) [X] = n \alpha_p C \dots\dots\dots 6$$

$$(6) [X_n] = C - (\alpha_p C) = C (1 - \alpha_p) \dots\dots\dots 6$$

$$(7) K_p = \frac{n^n (\alpha_p)^n C^{(n-1)}}{(1 - \alpha_p)} \dots\dots\dots 6$$

$$(8) \ln \frac{n^n (\alpha_p)^n}{(1 - \alpha_p)} = \frac{p\Delta V_{dis}^0}{RT} + \ln \frac{K_{atm}}{C^{(n-1)}} \dots\dots\dots 6$$

$$(9) \alpha_p = [1 + Q (< v_p > - < v_d >) / (< v_a > - < v_p >)]^{-1} \dots\dots\dots 7$$

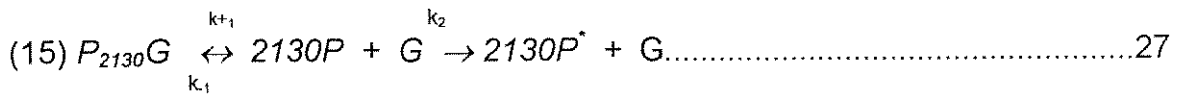
$$(10) I_{90} \propto M_a \dots\dots\dots 7$$

$$(11) \alpha_p = \frac{(S_a - S_p)}{(S_a - S_d)} \dots\dots\dots 7$$

$$(12) \Delta G_{dis}/T = \Delta H_{dis} (1/T) - \Delta S_{dis} \dots\dots\dots 8$$

$$(13) \Delta G_{dis} = \Delta H_{dis} - T\Delta S_{dis} \dots\dots\dots 8$$

$$(14) \Delta G_{dis} = -R T \ln K_p \dots\dots\dots 8$$



$$(16) K_p^* = \frac{k_{+1}}{(k_{-1} + k_2)} \dots\dots\dots 27$$

$$(17) (k_{+1}) [P_{2130}G] = (k_{-1} + k_2) [P]^{2130} [G] \dots\dots\dots 28$$

$$(18) [P] = (n \alpha_p C) \dots\dots\dots 28$$

$$(19) [P_{2130}G] = C - \alpha_p C = (1 - \alpha_p) C \dots\dots\dots 28$$

$$(20) [G] = \alpha_p C \dots\dots\dots 28$$

$$(21) (k_{+1}) ((1 - \alpha_p) C) = (k_{-1} + k_2) ((n \alpha_p C)^n (\alpha_p C)) \dots\dots\dots 29$$

$$(22) K_p^* = \frac{(n \alpha_p C)^n (\alpha_p C)}{(1 - \alpha_p) C} \dots\dots\dots 29$$

$$(23) K_p^* = \frac{2130^{2130} \alpha_p^{2131} C^{2130}}{1 - \alpha_p} \dots\dots\dots 29$$

$$(24) \ln K_p^* = n \ln n + (n + 1) \ln \alpha_p + n \ln C - \ln (1 - \alpha_p) \dots\dots\dots 29$$

$$(25) \ln K_{dis}^* = n \ln n + (n + 1) \ln \alpha_p + n \ln C - \ln (1 - \alpha_p) \dots\dots\dots 30$$

$$(26) \ln K_{dis}^* = \ln K_{atm}^* + \frac{p \Delta V_{dis}^{0*}}{RT} \dots\dots\dots 32$$

$$(27) \ln K_{den,p}^* = \ln K_{atm}^* + \frac{p \Delta V_{den,p}^{0*}}{RT} \dots\dots\dots 34$$

- (28) $K_{den,p}^* = \frac{(n\alpha_{den,p} C)^n}{(1 - \alpha_{den,p}) C} \dots\dots\dots 34$
- (29) $\alpha_{den,p} = [1 + Q (< v_p > - < v_{den} >) / (< v_n > - < v_p >)]^1 \dots\dots\dots 34$
- (30) $\ln((\alpha_{den,p}) / (1 - \alpha_{den,p})) = \ln(K_{atm}^* / C^{(n-1)}) + p\Delta V_{den,p}^{0*} / RT \dots\dots\dots 35$
- (31) $\ln((\alpha_{den,p}) / (1 - \alpha_{den,p})) = \ln K_{atm}^* + p\Delta V_{den,p}^{0*} / RT \dots\dots\dots 35$
- (32) $\Delta G_{dis}^* = -RT \ln K_p \dots\dots\dots 43$
- (33) $\Delta G_{dis}^* = -RT \ln K_t \dots\dots\dots 43$
- (34) $\Delta G_{dis}^* = \Delta H_{dis}^* - T\Delta S_{dis}^* \dots\dots\dots 43$
- (35) $\Delta G_{dis}^* / T = \Delta H_{dis}^* / T - \Delta S_{dis}^* \dots\dots\dots 47$
- (36) $\Delta G_{den}^* = -RT \ln K_p \dots\dots\dots 50$
- (37) $\Delta G_{den}^* = \Delta H_{den}^* - T\Delta S_{den}^* \dots\dots\dots 50$
- (38) $\Delta G_{den}^* / T = \Delta H_{den}^* / T - \Delta S_{den}^* \dots\dots\dots 50$
- (39) $\Delta \Delta G^* / n = \Delta G_R^* / n_R - \Delta G_0 / n_0 \dots\dots\dots 55$
- (40) $\Delta G_{dis} = - [RT \ln K_{atm} + (p\Delta V_{dis}^0)] \dots\dots\dots 55$
- (41) $\Delta G_R^* = - [RT \ln K_{atm}^* + (p_R^* \Delta V_R^*)] \dots\dots\dots 55$
- (42) $\Delta G_0 = - [RT \ln K_{atm} + (p_0 \Delta V_0)] \dots\dots\dots 55$
- (43) $\Delta \Delta G^* / n = - [(p_R \Delta V_R^* / n_R) - (p_0 \Delta V_0 / n_0)] \dots\dots\dots 55$
- (44) $\Delta \Delta G^* / n = - [((p_{1/2})_R \Delta V_R^* / n_R) - ((p_{1/2})_0 \Delta V_0 / n_0)] \dots\dots\dots 56$
- (45) $\ln K_p = \ln K_{atm} + p \Delta V_p / RT \dots\dots\dots 58$
- (46) $\ln K_p^* = \ln K_{atm}^* + p \Delta V_p^* / RT \dots\dots\dots 58$

$$(47) \ p_{1/2} = \frac{RT}{\Delta V_p^*} \ln \left(\frac{n^n (\alpha_p)^n}{1 - \alpha_p} \right) + \frac{RT}{\Delta V_p^*} \ln \frac{C^{(n-1)}}{K_{atm}} \dots\dots\dots 59$$

$$(48) \ \Delta p_{1/2} = p_{1/2} (C_2) - p_{1/2} (C_1) = \frac{RT}{\Delta V_c^*} (n-1) \ln \frac{C_2}{C_1} \dots\dots\dots 59$$

$$(49) \ \Delta p_{1/2} = \frac{((n-1)/n) RT \ln (C_2/C_1)}{(\Delta V_c^*/n)} \dots\dots\dots 60$$

LISTA DE SÍMBOLOS

K_p	constante de dissociação à pressão p
K_{atm}	constante de dissociação à pressão atmosférica
ΔV_{dis}^0	variação de volume de dissociação
R	constante universal dos gases
T	temperatura
$[X]$	concentração da espécie X
$[X_n]$	concentração da espécie X_n
α_p	grau de dissociação
C	concentração
Q	rendimento quântico
ν_p	número de onda à pressão p
ν_d	número de onda da forma dissociada
ν_a	número de onda da forma associada
I_{90}	intensidade de espalhamento de luz a 90°
M_a	massa molecular média
S_p	intensidade de espalhamento de luz à pressão atmosférica
S_a	intensidade de espalhamento de luz da forma associada
S_d	intensidade de espalhamento de luz da forma dissociada
ΔG_{dis}	variação de energia livre de dissociação
ΔH_{dis}	variação de entalpia de dissociação
ΔS_{dis}	variação de entropia de dissociação
$P_{2130}G$	TMV
P	capsídeo proteico que se reassocia
P^*	capsídeo proteico que não se reassocia
G	material genético do TMV (RNA)
k_{+1} , k_{-1} e k_2	constantes de velocidade
K_{dis}^*	constante de dissociação aparente

ΔV_{dis}^{0*}	variação de volume aparente de dissociação
$K_{den,p}^*$	constante de desnaturação aparente
$\Delta V_{den,p}^{0*}$	variação de volume aparente de desnaturação
n	número de dissociação
$\alpha_{den,p}$	grau de desnaturação
ν_{den}	número de onda da forma desnaturada
ν_n	número de onda da forma nativa
ΔG_{dis}^*	variação de energia livre aparente de dissociação
ΔH_{dis}^*	variação de entalpia aparente de dissociação
ΔS_{dis}^*	variação de entropia aparente de dissociação
ΔG_{den}^*	variação de energia livre aparente de desnaturação
ΔH_{den}^*	variação de entalpia aparente de desnaturação
ΔS_{den}^*	variação de entropia aparente de desnaturação
$\Delta \Delta G$	diferença de variação de energia livre
G_R^*	variação de energia livre aparente em presença de RNA
n_R	número de dissociação
ΔG_0	variação de energia livre aparente em ausência de RNA
n_o	número de dissociação em ausência de RNA
$p_{1/2}$	pressão a qual 50% do vírus está dissociado
$\Delta p_{1/2}$	variação de pressão a qual 50% do vírus está dissociado
ΔV_c^*	variação de volume aparente calculado através da dependência de concentração
ΔV_p^*	variação de volume de dissociação aparente calculado através da dissociação por pressão

INTRODUÇÃO

A termodinâmica de associação-dissociação de proteínas oligoméricas é freqüentemente estudada através de variação de pH, de temperatura e do efeito de agentes desnaturantes como, por exemplo, uréia. Esses parâmetros interferem, de uma maneira geral, na estrutura terciária da proteína.

Outra ferramenta que vem sendo utilizada como agente dissociante em proteínas oligoméricas (Silva e Weber, 1993; Bonafe *et al.*, 1994) e estruturas virais (Da Poian *et al.*, 1993 e 1994) é a alta pressão hidrostática. Através de sua aplicação é possível detalhar o estudo do equilíbrio de dissociação, pois a maioria das proteínas monoméricas só começa a apresentar alguma mudança conformacional mais drástica (desnaturação) acima de 5 kbar, valor superior ao valor de pressão que promove dissociação da maioria das proteínas multiméricas (Weber, 1983; Silva e Weber, 1988; Silva *et al.*, 1986; Bonafé *et al.*, 1991). O efeito de alta pressão em proteínas e partículas virais, que corresponde a perturbações nas interações entre subunidades e ao processo de dissociação, pode ser acompanhado por técnicas espectroscópicas (Silva e Weber, 1988; Silva e Weber, 1993). Além disso, esta ferramenta permite melhor compreensão no estudo termodinâmico da associação-dissociação de proteínas.

O processo de dissociação provocado por aumento de pressão desloca o equilíbrio no sentido de espécies que ocupam um menor volume. Segundo Paladini e Weber (1981) existem "espaços mortos" entre subunidades de

proteínas multiméricas e estes espaços desaparecem quando essas proteínas se dissociam. Por outro lado, a exposição das cargas das proteínas através da dissociação leva a contatos diretos com o solvente, que então sofre organização nessas regiões, levando-o a ocupar menor volume. Esse fenômeno é denominado de "eletrostricção".

A alta pressão mostrou um novo fenômeno em proteínas, a "deriva conformacional", que consiste na mudança conformacional das subunidades quando as proteínas são dissociadas. Isso pode ser relacionado ainda com a perda de atividade temporária de enzimas oligoméricas submetidas à alta pressão (Silva *et al.*, 1986). Muitas vezes isso é observado através da histerese na curva de dissociação por pressão de proteínas diméricas e tetraméricas. Em vírus como "Brome Mosaic Virus" (BMV) foi observado que após descompressão as subunidades se associam de uma maneira diferente da forma nativa (Silva e Weber, 1988). Estudos utilizando Vírus do Mosaico do "Cowpea" (CPMV) mostram que a incubação em alta pressão de proteína capsídica em ausência de RNA e presença de uréia em concentrações subdesnaturantes resulta em produtos de conformação desnaturada sem que ocorra reversibilidade viral. Essa conformação, entretanto, se assemelha mais a uma estrutura em "molten globule", diferente do drástico estado de desnaturação obtido na presença de uréia em altas concentrações. Na presença do RNA viral ocorre aumento da estabilidade da proteína capsídica e renaturação após dissociação por pressão, demonstrando papel importante de acoplamento energético na associação das proteínas para a montagem do vírus (Da Poian *et al.*, 1994).

Outro comportamento observado em proteínas com muitas subunidades é a falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão, que é explicada pela heterogeneidade quanto à energia livre de associação (Silva *et al.*, 1988 e 1989; Ruan e Weber, 1989; Bonafe *et al.*, 1994; Da Poian *et al.*, 1993).

Nos últimos anos vem sendo estudado o efeito combinado de alta pressão hidrostática e alguns agentes físicos ou químicos, como baixa temperatura e a presença de uréia em concentrações subdesnaturantes (Foguel *et al.*, 1992; Da Poian *et al.*, 1993 e 1994, Bonafe *et al.*, 1998). A combinação de alta pressão e baixa temperatura é bastante interessante como estratégia para o estudo de proteínas em soluções em temperaturas abaixo de 0 °C, pois quando se aplica pressão de 2,2 kbar, a temperatura de congelamento da água é diminuída a -18 °C (Foguel *et al.*, 1992).

O TMV já é alvo de estudo em nosso laboratório há três anos. Estudou-se o efeito de alta pressão em presença de uréia, assim como baixa temperatura (Vital, 1996). Através desses experimentos observou-se que pressão até 2,5 kbar induziu dissociação de 18%, e após abaixamento de temperatura até -18 °C ocorreu dissociação adicional até 72%, não havendo mudança significativa do centro de massa do espectro de fluorescência, portanto sem desnaturação significativa. Pelo gráfico de van't Hoff ($\Delta G^{\circ}/T$ em função de $1/T$) pode-se calcular a variação de entalpia (ΔH°_{dis}) e entropia (ΔS°_{dis}) aparentes de dissociação por subunidade do sistema, -8,23 kcal/mol e -50,26 cal/(K·mol), respectivamente. Esses resultados mostram que a associação do

TMV é um processo entropicamente dirigido. Alta pressão em presença de uréia 2,5 M induz desnaturação do TMV de maneira semelhante à induzida por uréia 6 M à pressão atmosférica, baseando-se nos dados de centro de massa do espectro de fluorescência. A variação de volume de associação calculada através da dissociação por pressão (ΔV_p) na ausência e na presença de uréia 2,5 M foi respectivamente, 16,3 e 3,1 mL/mol de subunidade (Vital, 1996; Bonafé *et al.*, 1998).

1 - Termodinâmica de dissociação por alta pressão hidrostática.

Uma série de parâmetros termodinâmicos podem ser calculados através de equações que relacionam medidas efetuadas sob alta pressão hidrostática. Assim, as constantes de dissociação à pressão p , K_p , e à pressão atmosférica, K_{atm} estão relacionadas através da equação:

$$K_p = K_{atm} e^{(p\Delta V_{dis}^0 / RT)} \quad (1)$$

onde p é a pressão (em bar), ΔV_{dis}^0 é a variação de volume padrão de dissociação (em mL/mol de subunidade), R é a constante universal dos gases ($1,9872 \times 10^{-3}$ kcal/(K·mol)), e T é a temperatura absoluta. Rigorosamente, ΔV_{dis}^0 depende da pressão devido à diferença de compressibilidade entre reagentes e produtos. Como a compressibilidade de proteínas é muito pequena e não é esperada uma variação significativa relacionada com o estado de agregação,

podemos considerar ΔV_{dis}^0 independente da pressão como uma boa aproximação (Ruan e Weber, 1988).

Expressando a equação (1) na forma logarítmica, têm-se:

$$\ln K_p = \ln K_{atm} + \frac{p\Delta V_{dis}^0}{RT} \quad (2)$$

Para uma proteína que se dissocia em n subunidades



a constante de dissociação K_p será

$$K_p = \frac{[X]^n}{[X_n]} \quad (4)$$

onde $[X]$ e $[X_n]$ correspondem as concentrações das respectivas espécies “X” e “X_n” no equilíbrio. O grau de dissociação à pressão p , α_p , pode ser relacionado com essas concentrações como:

$$[X] = n \alpha_p C \quad (5)$$

e

$$[X_n] = C - (\alpha_p C) = C (1 - \alpha_p) \quad (6)$$

onde C é a concentração inicial da proteína. Substituindo as equações (5) e (6) na equação (4), podemos expressar K_p como:

$$K_p = \frac{n^n (\alpha_p)^n C^{(n-1)}}{(1 - \alpha_p)} \quad (7)$$

Para relacionar o grau de dissociação com a pressão, podemos combinar as equações (7) e (2), obtendo:

$$\ln \frac{n^n (\alpha_p)^n}{(1 - \alpha_p)} = \frac{p \Delta V_{dis}^0}{R T} + \ln \frac{K_{atm}}{C^{(n-1)}} \quad (8)$$

A representação gráfica de $\ln n^n ((\alpha_p)^n / (1 - \alpha_p))$ em função de p permite o cálculo de ΔV_{dis}^0 através do coeficiente angular, o de K_{atm} pelo coeficiente linear (Silva *et al.*, 1986; Ruan e Weber, 1988), e correlacionar as mudanças no espectro de fluorescência e dissociação, considerando o grau de dissociação " α_p " como:

$$\alpha_p = [1 + Q (< \nu_p > - < \nu_d >) / (< \nu_a > - < \nu_p >)]^{-1} \quad (9)$$

onde Q é a razão entre o rendimento quântico de fluorescência das moléculas dissociada e a associada, ν_p é o número de onda à pressão p , e $< \nu_d >$ e $< \nu_a >$ correspondem aos números de onda das formas dissociada e associada, respectivamente (Silva *et al.*, 1986).

O espalhamento de luz pode informar o grau de dissociação, pois sua intensidade é proporcional à massa molecular média:

$$I_{90} \propto M_a \quad (10)$$

onde I_{90} é a intensidade de espalhamento de luz a 90° e M_a é a massa molecular média.

O grau de dissociação, assim, é obtido através da seguinte relação:

$$\alpha_p = \frac{(S_a - S_p)}{(S_a - S_d)} \quad (11)$$

onde S_p é a intensidade de espalhamento de luz à pressão p , e S_d e S_a correspondem, respectivamente, à intensidade de espalhamento de luz das formas dissociada e associada (Silva *et al.*, 1989).

Os parâmetros termodinâmicos como variação de energia livre (ΔG_{dis}), variação de entalpia (ΔH_{dis}) e variação de entropia (ΔS_{dis}) de dissociação podem

ser obtidos pela equação de van't Hoff, através de variação de temperatura em condições dissociantes:

$$\Delta G_{dis}/T = \Delta H_{dis} (1/T) - \Delta S_{dis} \quad (12)$$

Os valores de ΔH_{dis} e ΔS_{dis} são obtidos através, respectivamente, dos coeficientes angular e linear da reta de $\Delta G_{dis}/T = f(1/T)$. Obtendo-se esses valores para cada pressão, pode-se determinar os valores de ambos à pressão atmosférica, calculando-se o ΔG_{dis} nessa pressão, pela equação abaixo:

$$\Delta G_{dis} = \Delta H_{dis} - T\Delta S_{dis} \quad (13)$$

A variação de energia livre de Gibbs de dissociação (ΔG_{dis}) de proteínas oligoméricas está relacionada à constante de dissociação à pressão p , K_p , através da equação:

$$\Delta G_{dis} = - R T \ln K_p \quad (14)$$

A obtenção desses parâmetros termodinâmicos em alta pressão é importante na análise dos processos de associação/dissociação de proteínas oligoméricas, principalmente quando associada à presença de agentes como uréia combinada com baixa temperatura.

2 - Efeito de alta pressão em presença de uréia.

A uréia é um agente desnaturante que modifica a estrutura de proteínas de modo ainda não muito bem estabelecido. Essa atuação pode ocorrer pela interação entre uréia e cadeia polipeptídica ou através da solubilização de grupamentos laterais apolares, como os grupos aromáticos (Scholtz *et al.*, 1995).

Estudos anteriores (Vital, 1996; Bonafe *et al.*, 1998) mostram que TMV submetido à alta pressão com uréia 2,5 M (concentração subdesnaturante) à pressão atmosférica, apresenta alterações significativas de intensidade de fluorescência, com desvio acentuado para o vermelho, indicando desnaturação importante. Observações semelhantes foram verificadas em estudos realizados em Vírus do Mosaico "Cowpea" (CPMV) (Da Poian *et al.*, 1994) e bacteriófago R17 (Da Poian *et al.*, 1993).

A variação de volume do TMV durante a dissociação aparentemente é menor em presença de uréia ($\Delta V_p = 3,1$ mL/mol de subunidade em 2,5 M de uréia) que em ausência da mesma ($\Delta V_p = 16,3$ mL/mol de subunidade). Este fato pode estar relacionado à dissociação parcial promovida pela uréia antes da pressurização, observado pela intensidade de espalhamento de luz e através de microscopia eletrônica, que mostra pequenas "falhas" na imagem das partículas virais. Assim, é possível que a dissociação parcial promovida pela uréia em pressão atmosférica exponha inicialmente as interfaces de subunidades não

dissociadas por pressão correspondendo à menor área a ser exposta, portanto eletrostricção menos significativa (Vital, 1996; Bonafe *et al.*, 1998).

3 - Efeito de alta pressão e baixa temperatura.

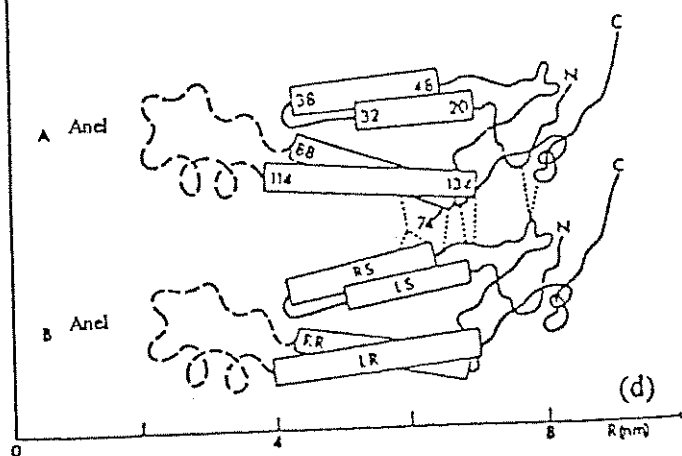
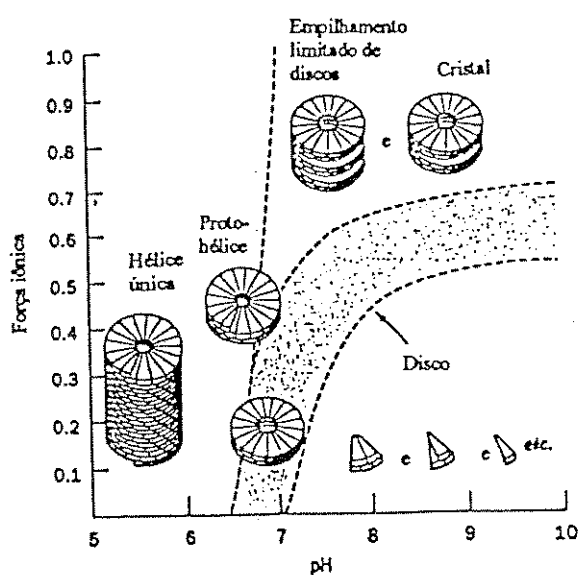
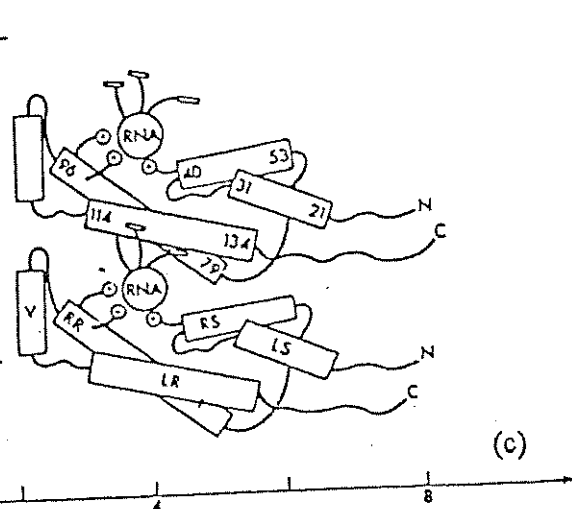
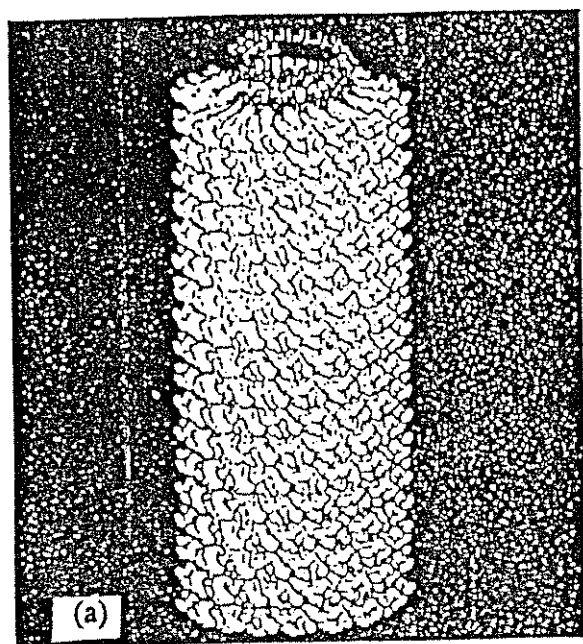
O estudo do efeito de baixa temperatura na dissociação e desnaturação viral pode fornecer informações sobre a entalpia e entropia desses processos.

Investigações utilizando ficobilinossomos (Foguel *et al.*, 1992), repressor Arc (Foguel *et al.*, 1994), bacteriófago P22 (Foguel *et al.*, 1995), CPMV (Da Poian *et al.*, 1994) e TMV (Vital, 1996; Bonafe *et al.*, 1998) mostram que a dissociação e desnaturação são favorecidas quando a temperatura é diminuída após pressurização, e os valores de entropia obtidos são grandes e positivos em relação a entalpia. Isto pode indicar que a associação das subunidades é um processo entropicamente dirigido (Weber, 1993).

4 - Estrutura do TMV

O TMV (Fig. 1) é um vírus clássico que provoca descoloração e manchas nas folhas de *Nicotiana tabacum* (Tabaco). Tem forma cilíndrica, de dimensões de cerca de 3.000 Å de altura, 180 Å de diâmetro e sua massa molecular é 40.000 kDa. A sua proteína capsídica de 17,5 kDa é composta por 158 resíduos de aminoácidos, sendo que cerca de 2.130 cópias da mesma se arranjam em uma estrutura helicoidal, com 16 1/3 subunidades por volta, formando um canal

PARTÍCULA VIRAL



PROTEÍNA CAPSÍDICA

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

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

interno. Seu material genético consiste de uma fita simples de RNA, com 6.400 nucleotídeos e massa molecular de 2.000 kDa, situado internamente ao capsídeo proteico formando uma hélice de modo que cada subunidade de proteína capsídica se liga a 3 nucleotídeos (Hirth e Richards, 1981).

A proteína capsídica, facilmente isolada, se polimeriza de diferentes modos, dependendo de condições de pH e de força iônica. Por exemplo, em pH 8 e alta força iônica, ocorre formação de uma estrutura cristalina composta de discos duplos, com coeficientes de sedimentação 27S, 37S, ou mais. Em pH 7 e baixa força iônica, também formam-se discos duplos de 20S, mas que não se agregam. Em meio alcalino 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 meio ácido e baixa força iônica, a proteína capsídica se associa formando longas hélices, estrutura semelhante à proteína capsídica do vírus nativo. Em pH 7 e média força iônica, observam-se apenas proto-hélices, com 39 ± 2 subunidades, similares à estrutura das longas hélices mencionadas acima. É interessante o fato que em meio neutro e baixa força iônica, condições que se assemelham às fisiológicas, a proteína capsídica forma hélice somente na presença do RNA viral (Klug, 1972; Hirth e Richards, 1981).

A associação do RNA viral com a proteína capsídica pode ser descrita em duas etapas, nucleação e alongamento. A primeira é dependente da seqüência específica do RNA, assim como requer a formação de um agregado proteico de 19-20S, identificado como uma hélice de $16 \frac{1}{3}$ subunidades por

volta. O alongamento, continuação do processo, parece depender da adição de proto-hélices, às quais o RNA se liga internamente, acompanhando a estrutura helicoidal (Hirth e Richards, 1981; Raghavendra *et al.*, 1988).

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: investigar o processo da dissociação e desnaturação de TMV por aplicação de alta pressão hidrostática; calcular os parâmetros termodinâmicos como entalpia, entropia e energia livre desses processos; avaliar o efeito de baixa temperatura em presença de uréia e avaliar a influência de concentração do vírus na curva de dissociação por pressão.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q e tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5 em NaCl 150 mM. Foi escolhido este tampão devido à baixa dependência de pK_a em função da pressão (Neuman *et al.*, 1973).

2 - Purificação do TMV

A purificação do TMV foi realizada por Vital (1996), e obtida através da adaptação do método descrito por Asselin e Zaitlín (1978) ("Método PEG - Celite - Triton X-100 - Fosfato"), inicialmente, na homogeneização de folhas infectadas pelo vírus com solução de Na_2HPO_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 a cerca de 4 °C, exceto quando mencionada outra condição. O homogenato foi filtrado em filtro de nylon, clarificando-se com celite, 5 g/100mL e centrifugado a 10.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi filtrado, e o vírus foi precipitado por adição de polietilenoglicol 6.000 e NaCl, em concentrações finais de 3% e 1%, respectivamente. Após 10 min sob agitação e repouso por 20 min em banho de gelo a suspensão foi novamente centrifugado a 10.000 x g por 30 min. O

precipitado foi ressuspenso em um quarto do volume original com Na_2HPO_4 0,01 M e ascorbato de sódio 0,01% (m/v), e submetido a novo processo de clarificação, precipitação e ressuspensão nas mesmas condições. Após centrifugação da solução a $10.000 \times g$ 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 $90.000 \times g$ por 2 h em gradiente descontinuo de sacarose (60% e 20%). A fração de TMV foi coletada na interface entre 60 e 20% de sacarose, e dialisada contra EDTA 1 mM, 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 $10.000 \times g$. 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 0,01 g%.

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

3 - Equipamento de alta pressão hidrostática

O sistema utilizado consiste de um gerador de pressão que é conectado à câmara de pressão hidrostática (Fig. 2 e 3). Esta câmara possui três janelas ópticas de quartzo, através das quais realizam-se medidas espectroscópicas da amostra a pressões de, até, 2,5 kbar, limite que essas janelas toleram. No interior da câmara coloca-se uma cubeta cilíndrica de quartzo com volume

aproximadamente 0,8 mL que contém a amostra a ser submetida à alta pressão. A cubeta é selada com um tubo de polietileno cuja extremidade foi fechada por aquecimento. O objetivo desse tubo é, através de sua flexibilidade, permitir 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 câmara. Utiliza-se etanol absoluto como meio líquido para a transmissão da pressão e por possuir propriedades de refração próximas às do quartzo. A unidade geradora de pressão é constituída por um pistão operado manualmente que injeta etanol através de dutos metálicos até a câmara. A medida de pressão é realizada por um manômetro analógico (Paladini, 1980; Paladini e Weber, 1981).

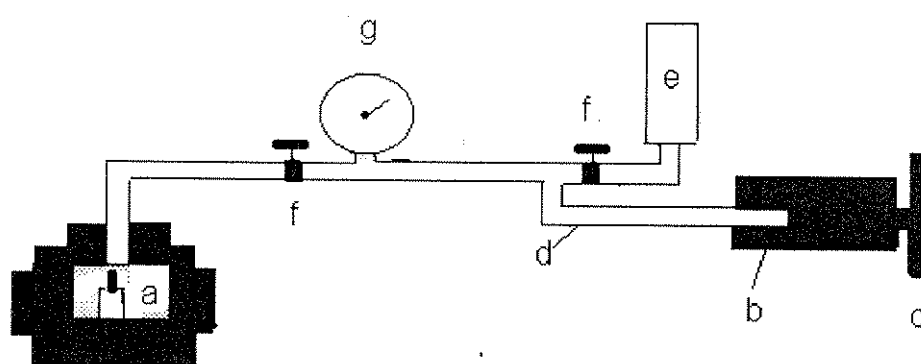


Figura 2: Esquema do sistema de pressão hidrostática.

Câmara (a), conectada ao gerador de pressão (b), com pistão (c) que comprime a linha de etanol (d). Reservatório de etanol (e), válvulas (f) e manômetro (g). (Fig. baseada em Suarez, 1985).

4 - Estudos de fluorescência e espalhamento de luz sob pressão.

Os espectros de fluorescência e de espalhamento de luz foram registrados em um espectrofluorímetro SLM AMINCO SPF - 500C. Neste modelo não é possível a adaptação da câmara de alta pressão no seu interior. Assim, a luz de excitação entra diretamente através de uma janela da câmara, e nas janelas perpendiculares à primeira foram conectados cabos de fibras óptica de quartzo para transmissão ao fluorímetro, na entrada do feixe de emissão. Este sistema foi protegido de luz externa. Além disso, conectou-se à câmara um banho com a finalidade de controlar a temperatura.

O TMV exibe fluorescência intrínseca devido aos aminoácidos aromáticos, principalmente triptofano. Processos de dissociação, assim como desnaturação, muitas vezes ocorrem acompanhados de exposição de resíduos de triptofano ao solvente, ocorrendo um desvio do centro de massa (ν_p) do espectro de fluorescência para o vermelho (Silva e Weber, 1988). Originalmente obtém-se dados de intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda, faz-se a conversão para intensidade de fluorescência em função do número de onda, pois o último é diretamente proporcional à energia associada ao fóton. A importância em caracterizar os deslocamentos espectrais através do centro de massa, e não do número de onda na emissão máxima, é porque em sistemas heterogêneos, representados pelos vários fluoróforos intrínsecos de uma proteína, deslocamentos consideráveis de centro de massa podem ocorrer com mudanças muito pequenas no comprimento de onda. Nestas medidas,

utilizou-se comprimento de onda de excitação 280 nm, os espectros de fluorescência foram obtidos entre 300 e 400 nm.

O espalhamento de luz Rayleigh detecta a dissociação de agregados de massa molecular elevada, permitindo monitorar o estado de agregação do TMV. Pode-se assumir que a intensidade de luz espalhada é proporcional à massa molecular média (M_w) (equação 10) para soluções diluídas (Silva *et al.*, 1989). Para estes experimentos foram utilizados λ_{exc} de 350 nm e λ_{em} entre 300 e 400 nm.

RESULTADOS

1 - Efeito de alta pressão em TMV em diferentes concentrações virais.

O efeito de alta pressão a 0 °C em diferentes concentrações de TMV foi estudado através de diminuição da temperatura até 0 °C, e após 60 min., a pressão foi aumentada de 210 em 210 bar até 2,5 kbar, incubando-se a amostra por 10 min. antes das análises espectroscópicas. As medidas de espalhamento de luz a 90° (Rayleigh) e intensidade de fluorescência obtidas para cada concentração foram corrigidas baseando-se em medidas efetuadas em cubeta de quartzo convencional, pois os resultados com a cubeta cilíndrica no interior da câmara de alta pressão estão sujeitos a variações no início de cada experimento, como a posição da câmara, ou a fixação das fibras ópticas. Estas correções foram feitas tendo como referência o valor de 1 mg/mL de TMV a 25 °C e pressão atmosférica, considerando a intensidade de espalhamento de luz à pressão atmosférica proporcional ao peso molecular médio em solução. O aumento de pressão foi realizado a 0 °C baseando-se em estudo anterior realizado com TMV (Vital, 1996; Bonafé *et al.*, 1998), o qual demonstra que em temperatura ambiente o vírus apresenta um pequeno decréscimo de intensidade do espalhamento de luz quando se eleva a pressão de 10⁻³ a 2,5 kbar, apresentando portanto pouca dissociação. No entanto, o abaixamento de temperatura a 0 °C a pressão atmosférica promove uma queda significativa do espalhamento de luz, indicando dissociação. Essa condição experimental

permite avaliar melhor o efeito de concentração do vírus na curva de dissociação, desde que a mesma se torna significativa. A Fig. 4 mostra a intensidade de espalhamento de luz em função da pressão em diferentes concentrações de TMV em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e NaCl 150 mM. Como se pode observar, a diminuição de temperatura a 0 °C promoveu queda de espalhamento de luz somente para a amostra de 3 mg/mL. A alta pressão induziu diminuição mais acentuada de espalhamento de luz em concentrações acima de 1 mg de vírus/mL. O retorno à pressão atmosférica e a 25 °C não promoveu recuperação total da intensidade de espalhamento de luz nas condições estudadas, sugerindo reassociação apenas parcial.

Nesse mesmo experimento, estudou-se o espectro de fluorescência, Fig. 5. Observou-se diminuição na intensidade de fluorescência com o abaixamento de temperatura e com o aumento de pressão até 0,5 kbar, e acima dessa pressão um aumento sensível de intensidade de fluorescência. No retorno à pressão atmosférica e a 25 °C, notou-se parcial reversibilidade desse comportamento. Aparentemente o aumento da pressão levou a dissociação do TMV, e a perda por processos não radiativos devido a colisões foi acentuada pela exposição de resíduos aromáticos ao solvente. A variação do centro de massa em função da pressão, obtida através desses espectros de fluorescência, é mostrada na Fig. 6. Não observou-se um desvio para o vermelho com aumento de pressão a 0 °C para as diferentes concentrações de TMV, indicando que a dissociação não foi acompanhada por um processo de desnaturação importante.

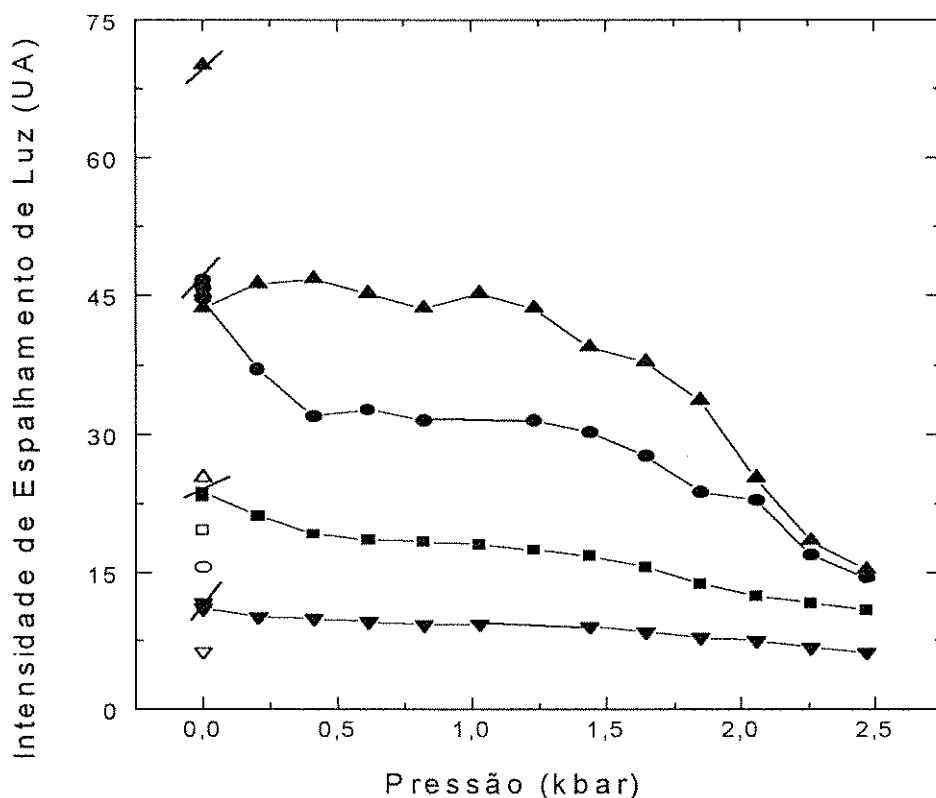


Figura 4: Efeito de pressão a 0 °C na intensidade do espalhamento de luz, em diferentes concentrações de TMV.

A intensidade de espalhamento de luz a 90° foi medida entre 345 e 355 nm ($\lambda_{exc} = 350$ nm). Concentrações de TMV de 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (●) e 3,0 mg/mL (▲). Símbolos cheios cortados correspondem à condição inicial de pressão atmosférica e 25 °C, e os símbolos abertos ao retorno à pressão atmosférica e 25 °C. As medidas foram realizadas nas mesmas condições do experimento das Fig. 5 e 6.

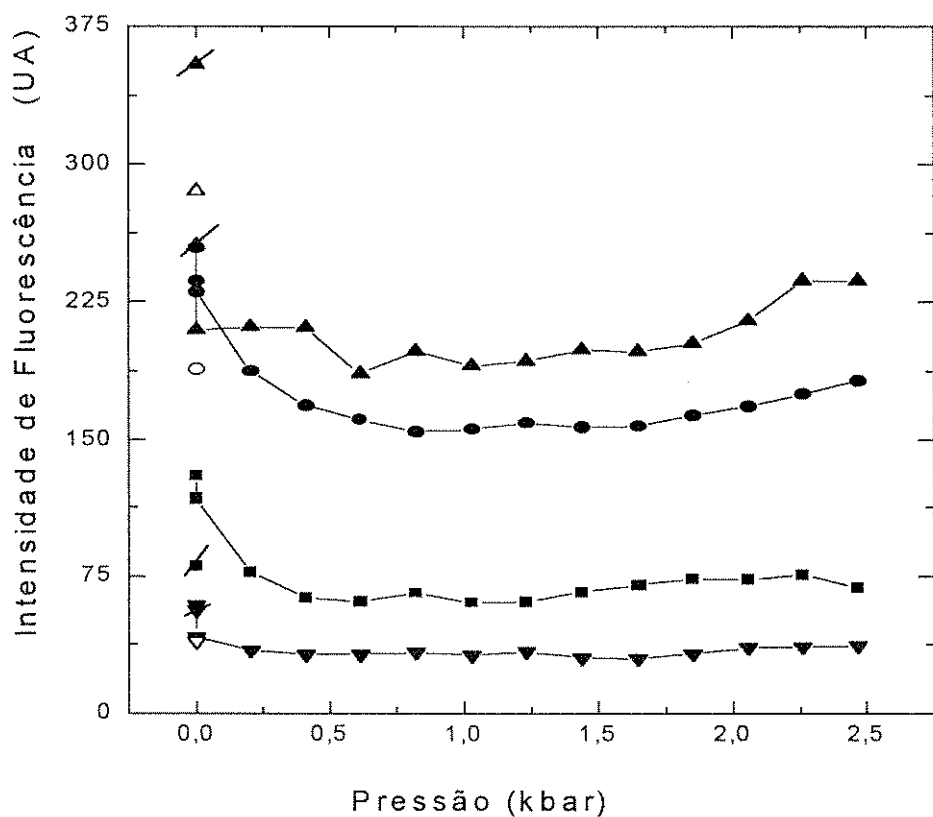


Figura 5: Efeito de pressão a 0 °C no espectro de fluorescência em diferentes concentrações de TMV.

Intensidade de fluorescência entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm).
 Concentrações virais de 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (●) e 3,0 mg/mL (▲).
 Símbolos cheios e cortados correspondem à condição inicial de pressão atmosférica e 25 °C, e os símbolos abertos ao retorno à pressão atmosférica e 0 °C. As medidas foram realizadas nas mesmas condições das Fig. 4 e 6.

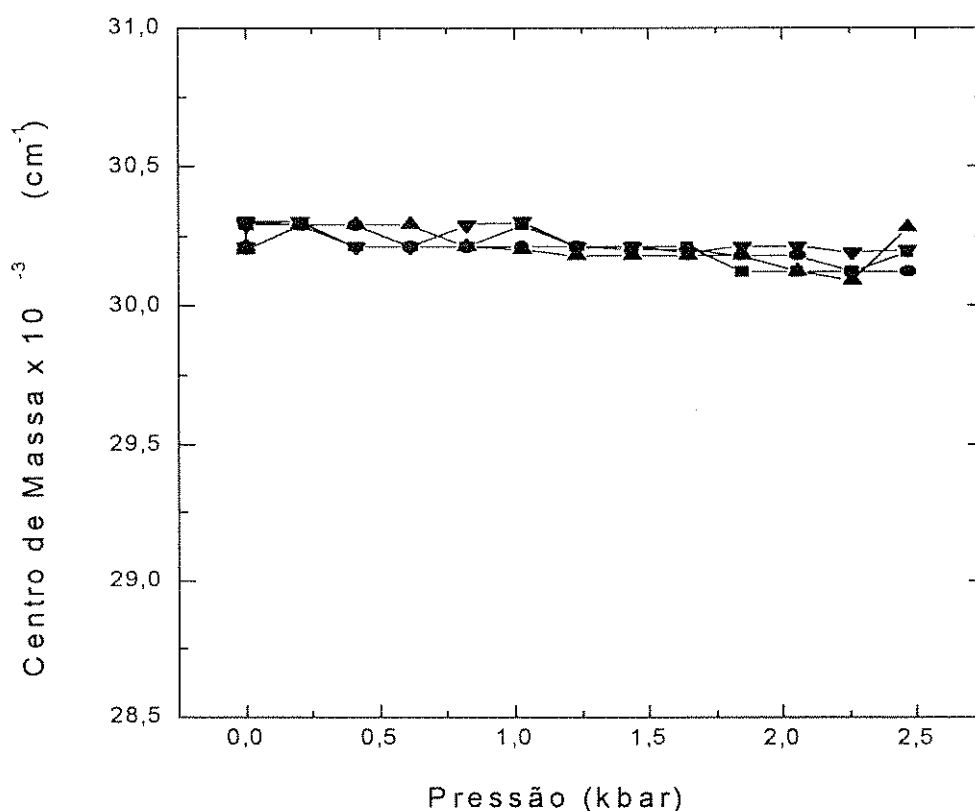
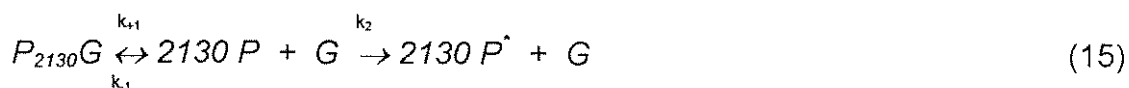


Figura 6: Efeito de pressão a 0 °C no centro de massa do espectro de fluorescência em diferentes concentrações de TMV.

Espectro de emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm), convertido para número de ondas. Concentrações virais de: 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (•) e 3,0 mg/mL (▲). O retorno à pressão atmosférica e a 25 °C coincidiu com os valores iniciais. As medidas foram realizadas nas mesmas condições das Fig. 4 e 5.

Pela observação do comportamento apenas parcialmente reversível na dissociação do TMV, na escala de tempo observada, utilizou-se a aproximação do “estado estacionário” (Lavenda, 1978; Da Poian *et al.*, 1995) para se obter uma expressão para constante de dissociação do TMV (K_p^*). Apesar de não ocorrer reversibilidade total no processo, esta aproximação considera constante a concentração de intermediários, permitindo a determinação de parâmetros termodinâmicos aparentes. Assim, podemos considerar o processo de dissociação do vírus como:



onde $P_{2130}G$ representa o TMV, sendo P o capsídeo proteico que se ressurcia, P^* representa uma forma derivada que não se associa novamente e G o material genético (RNA); e k_{+1} , k_{-1} e k_2 são as constantes de velocidade das reações representadas acima.

Através da equação (15) podemos determinar a constante de dissociação aparente à pressão p , K_p^* (o asterisco indica uma condição de “estado estacionário” em lugar do estado de equilíbrio):

$$K_p^* = \frac{k_{+1}}{(k_{-1} + k_2)} \quad (16)$$

Podemos assim considerar a velocidade de formação do intermediário "2130P + G" igual ao seu consumo:

$$(k_{+1}) [P_{2130}G] = (k_{-1} + k_2) [P]^{2130} [G] \quad (17)$$

onde o termo da esquerda é a velocidade de formação e o termo da direita, a velocidade de consumo.

Considerando C a concentração total e α_p o grau de dissociação do vírus na pressão p , temos:

$$[P] = (n - \alpha_p C) \quad (18)$$

e

$$[P_{2130}G] = C - \alpha_p C = (1 - \alpha_p) C \quad (19)$$

e,

$$[G] = \alpha_p C \quad (20)$$

Substituindo as equações (18), (19) e (20) na equação (17), obtemos:

$$(k_{+1}) ((1 - \alpha_p) C) = (k_{-1} + k_2) ((n - \alpha_p C)^n (\alpha_p C)) \quad (21)$$

Relacionando a equação (16) com a equação (21), temos:

$$K_p^* = \frac{(n - \alpha_p C)^n (\alpha_p C)}{(1 - \alpha_p) C} \quad (22)$$

Considerando o número de dissociação $n = 2130$ subunidades, têm-se:

$$K_p^* = \frac{2130^{2130} \alpha_p^{2131} C^{2130}}{1 - \alpha_p} \quad (23)$$

Consideração semelhante foi feita para o Vírus do Mosaico "Cowpea" (CPMV) (Da Poian *et al.*, 1995) e, também, para as constantes de dissociação do equilíbrio (Silva e Weber, 1993; Bonafé *et al.*, 1994).

A constante de dissociação aparente K_p^* (Tabela 1) pode ser obtida através da equação 22, obtendo-se os dados de espalhamento de luz da Fig. 4, e calculando-se o valor de α_p pela equação 11:

$$\ln K_p^* = n \ln n + (n + 1) \ln \alpha_p + n \ln C - \ln (1 - \alpha_p) \quad (24)$$

Considerando K_p^* como K_{dis}^* , constante de dissociação aparente, a equação (24) equivale a:

$$\ln K_{dis}^* = n \ln n + (n+1) \ln \alpha_p + n \ln C - \ln (1-\alpha_p) \tag{25}$$

A Tabela 1 mostra as diferentes contribuições de cada parcela da equação (25), que contribuem para $\ln K_{dis}^*$. Como pode-se observar o valor de $(n-1) \ln C$ é de ordem de - 38.743 e não varia com o grau de dissociação para 0,5 mg de TMV/mL. Esses resultados são valores baixos devido à reduzida concentração molar de TMV, $1,2 \cdot 10^{-8}$ M. Esta observação é similar para qualquer concentração viral utilizada.

Tabela 1 : Cálculo de $\ln K_{dis}^*$ a 0 °C para 0,5 mg de TMV/mL.

Pressão (kbar)	I_{esp} (UA)	α	$n \ln(n)$	$(n+1) \ln(\alpha_p)$	$n \ln C$	$-\ln (1-\alpha_p)$	$\ln K_{dis}^*$
0	11664,5	0					
0	11036,1	0,054	16324	-6204	-38743	0,056	-28620
0	11157,5	0,093	16324	-5051	-38743	0,098	-27467
0,20548	10137,2	0,282	16324	-2704	-38743	0,331	-25118
0,41096	10017,4	0,304	16324	-2540	-38743	0,362	-24957
0,61644	9656,48	0,37	16324	-2118	-38743	0,462	-24535
0,82192	9297,67	0,436	16324	-1767	-38743	0,573	-24184
1,0274	9416,38	0,414	16324	-1877	-38743	0,535	-24294
1,23288	9118	0,469	16324	-1611	-38743	0,634	-24028
1,64384	8458,66	0,591	16324	-1121	-38743	0,894	-23538
1,84932	7888,13	0,696	16324	-772	-38743	1,192	-23189
2,05479	7529,86	0,762	16324	-578	-38743	1,437	-22995
2,26027	6749,01	0,906	16324	-210	-38743	2,367	-22626
2,46575	6240,53	1	16324	-2E-05	-38743	18,74	-22400

Obs.: (1) $n = 2130$
(2) $C = [TMV] = 0,5 \text{ mg/mL} = 1,25 \times 10^{-8} \text{ M}$
(3) $\ln K_{dis}^* = n \ln n + (n+1) \ln (\alpha_p) + n \ln C - \ln (1- \alpha_p)$, segundo equação (25).

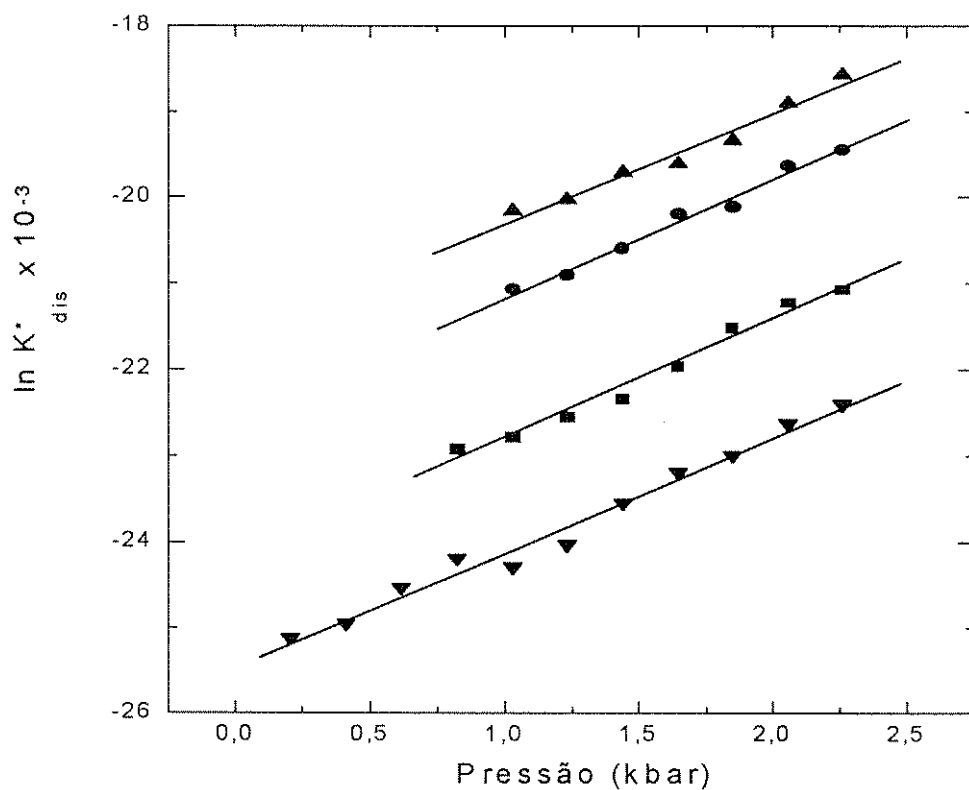


Figura 7: Efeito da pressão na dissociação de TMV na constante K^*_{dis} , em diferentes concentrações.

Concentrações virais de: 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (•) e 3,0 mg/mL (▲). Os valores de $\ln K^*_{dis}$ foram calculados através das equações (11) e (25) (ver Tabela 1) a partir das intensidades de espalhamento de luz da Fig. 4.

A partir dos valores de $\ln K_{dis}^*$ em função da pressão fixados na Tabela 1, obteve-se o gráfico mostrado na Fig. 7, para as diferentes concentrações de TMV. Os coeficientes angular e linear das retas correspondem, respectivamente, a $\Delta V_{dis}^{0*}/RT$ e $\ln K_{atm}^*$. Com o valor de $\ln K_{dis}^*$ que corresponde a 50% do vírus dissociado ($\alpha_{50\%}$) pode-se obter pela equação da reta o valor de $p_{1/2dis}$, ou seja, a pressão necessária para obter 50% do vírus dissociado (Tabela 2).

A relação entre a constante de dissociação aparente à pressão p , K_{dis}^* , e o volume de dissociação aparente, ΔV_{dis}^{0*} , considerando a condição de "estado estacionário", será análogo à equação (2):

$$\ln K_{dis}^* = \ln K_{atm}^* + \frac{p\Delta V_{dis}^{0*}}{RT}$$

(26)

Tabela 2: Valores de ΔV_{dis}^{0*} e $p_{1/2dis}$ referentes a diferentes concentrações de TMV a 0°C.

Concentração de TMV (mg/mL)	ΔV_{dis}^{0*} (mL/mol de subunidade)	$p_{1/2dis}$ (kbar)
0,5	14,1	1,17
1,0	14,6	1,28
2,0	14,5	1,20
3,0	13,5	1,18

Observou-se que não ocorreu variação significativa do $p_{1/2dis}$ com o aumento da concentração. Esses resultados são interessantes, pois é esperado que o processo de dissociação medido no equilíbrio deva apresentar dependência de concentração, com $p_{1/2dis}$ maior em concentrações mais elevadas (Bonafe *et al.*, 1994).

Para melhor avaliar o efeito de concentração do TMV no processo de dissociação e desnaturação por pressão, investigou-se a combinação de alta pressão em presença de uréia em concentrações subdesnaturantes.

2 - Efeito de alta pressão na dissociação de TMV em diferentes concentrações na presença de uréia.

Concentrações de uréia acima de 2,5 M em pressão atmosférica levam a grande desvio para o vermelho no espectro de fluorescência de TMV, mostrando desnaturação (Vital, 1996; Bonafé *et al.*, 1998). Estudou-se o efeito da pressão na desnaturação do TMV a 25 °C em presença de uréia até 2,5 M e os resultados obtidos estão mostrados na Fig. 8.

O centro de massa apresentou desvio para o vermelho a partir de 1 kbar nas diferentes concentrações de uréia, sendo mais acentuado em concentrações mais elevadas de uréia. O retorno à pressão atmosférica apresentou recuperação parcial no valor de centro de massa, mostrando portanto reversibilidade parcial do processo de desnaturação. Utilizou-se a

aproximação do “estado estacionário”, análogo ao caso da dissociação do TMV, anteriormente discutido. Portanto, a relação entre a constante de desnaturação aparente à pressão p , $K_{den,p}^*$, e a variação de volume de desnaturação aparente, $\Delta V_{den,p}^{0*}$, é análoga à equação (26):

$$\ln K_{den,p}^* = \ln K_{atm}^* + \frac{p \Delta V_{den,p}^{0*}}{RT} \quad (27)$$

e, por outro lado, a constante de equilíbrio aparente para a desnaturação à pressão p será:

$$K_{den,p} = \frac{(n \alpha_{den,p} C)^n}{(1 - \alpha_{den,p}) C} \quad (28)$$

Para o cálculo de $\alpha_{den,p}$ através dos dados de centro de massa (Fig. 8), foram feitas correções de acordo com o rendimento quântico. Analogamente à equação (9), obtendo:

$$\alpha_{den,p} = [1 + Q (< \nu_p > - < \nu_{den} >) / (< \nu_n > - < \nu_p >)]^{-1} \quad (29)$$

onde Q é a razão entre o rendimento quântico da molécula desnaturada e da nativa, ν_{den} , ν_n e ν_p são, respectivamente, números de onda na emissão máxima da forma desnaturada, nativa e à pressão p .

Substituindo a equação (28) na equação (27) temos:

$$\ln((\alpha_{den,p}) / (1-\alpha_{den,p})) = \ln (K_{atm}^* / C^{(n-1)}) + p\Delta V_{den,p}^{0*} / RT \quad (30)$$

considerando-se $n = 1$ pois a desnaturação representa um processo de primeira ordem, esta relação torna-se:

$$\ln((\alpha_{den,p}) / (1-\alpha_{den,p})) = \ln K_{atm}^* + p\Delta V_{den,p}^{0*} / RT \quad (31)$$

sendo $\ln((\alpha_{den,p}) / (1-\alpha_{den,p})) = \ln K_{den,p}^*$, construiu-se o gráfico de $\ln K_{den,p}^*$ em função da pressão p , incluso na Fig. 8. Através deste gráfico, determinou-se o valor de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ para diferentes concentrações de uréia.

A Tabela 3 mostra os valores encontrados de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$. O aumento da concentração de uréia promoveu maior variação do centro de massa e diminuição do valor de $p_{1/2den}$. O vírus 2,5 kbar em presença de 2,5 M de uréia apresentou, portanto, maior desestabilização conformacional (desnaturação).

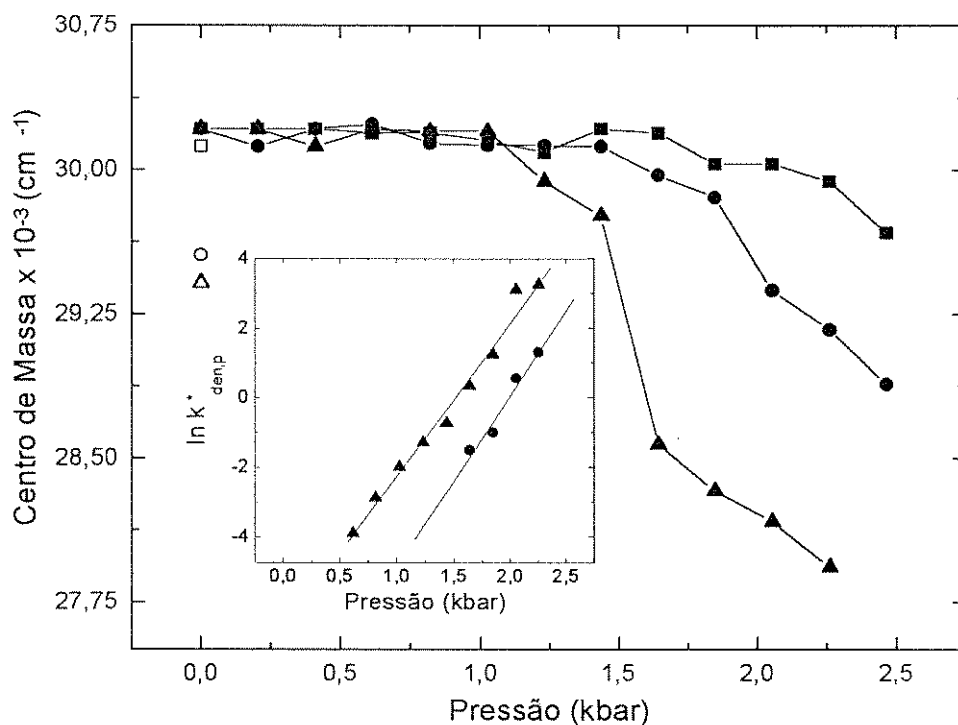


Figura 8: Efeito de pressão no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV em presença de uréia.

Os espectros de emissão foram obtidos entre 300 e 400 nm ($\lambda_{exc} = 285$ nm), e convertidos para número de ondas, em presença de concentrações de uréia de 1,5 (■), 2,0 (●) e 2,5 M (▲) a 25 °C. Os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica. Concentração viral de 1,0 mg/mL.

Inclusão: Efeito da pressão na desnaturação do TMV (1,0 mg/mL) na presença de uréia em concentrações de 2,0 (●) e 2,5 M (▲), expresso na forma logarítmica $\ln K_{den,p}^*$.

Tabela 3: Valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$ de desnaturação de 1,0 mg/mL de TMV referentes à alta pressão em diferentes concentrações de uréia.

Concentração de uréia (M)	$\Delta V_{den,p}^{0*}$ (mL/mol de subunidade)	$p_{1/2den}$ (kbar)
2,0	119,1	1,99
2,5	105,0	1,71

O efeito da pressão em diferentes concentrações de TMV em presença de uréia a 2,5 M foi estudado, analisando a intensidade de espalhamento de luz (Fig. 9) e o centro de massa do espectro de fluorescência (Fig. 10). Observou-se queda mais acentuada na intensidade de espalhamento em amostras com maiores concentrações virais, indicando dissociação. Este comportamento também foi observado em TMV submetido a alta pressão na ausência de uréia a 0 °C (Fig. 4). Não foi possível observar o espalhamento de luz para as amostras com 2,0 e 3,0 mg/mL após descompressão, devido à precipitação de material. Em concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL, a intensidade de espalhamento de luz (após retorno à pressão atmosférica) foi semelhante ao valor obtido antes do aumento de pressão, indicando reversibilidade. Através desses resultados obteve-se os valores de $p_{1/2dis}$, que foram semelhantes para as concentrações virais, $p_{1/2dis} = 2,2$ kbar.

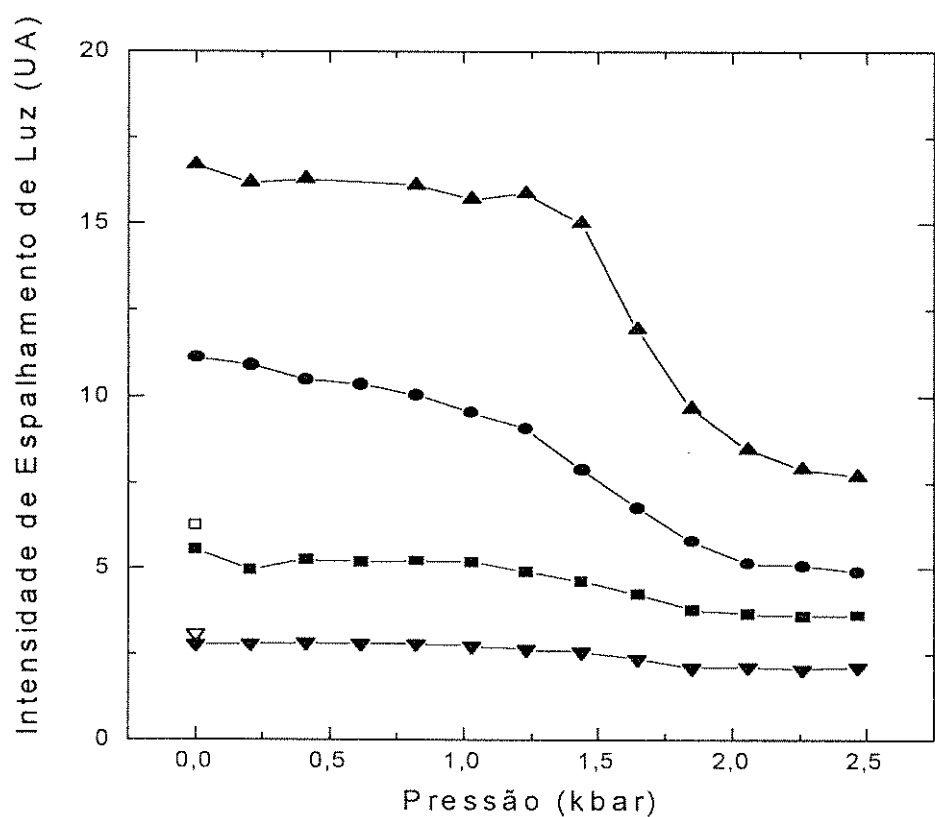


Figura 9: Efeito de pressão na intensidade do espalhamento de luz em presença de 2,5 M de uréia, em diferentes concentrações de TMV

A intensidade de espalhamento de luz a 90° foi medida entre 345 e 355 nm ($\lambda_{exc} = 350$ nm). Concentrações virais de 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (•) e 3,0 mg/mL (▲). Os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica.

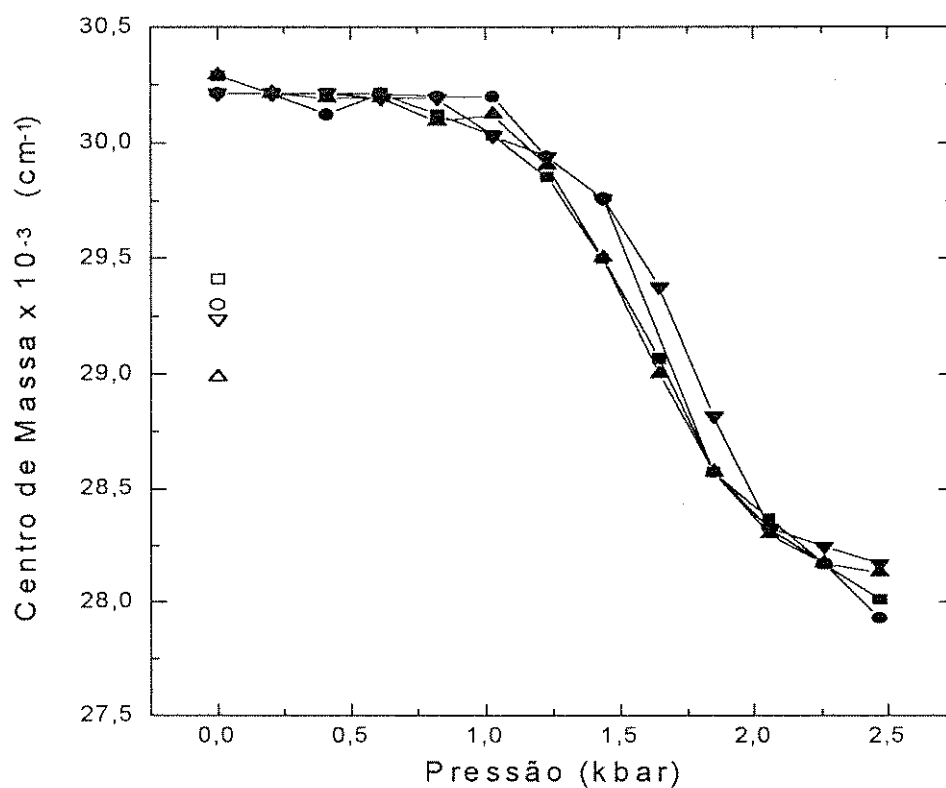


Figura 10: Efeito de pressão no centro de massa do espectro de fluorescência em presença de 2,5 M de uréia, em diferentes concentrações de TMV.

Espectro de emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm), convertido para número de ondas. Concentrações virais de 0,5 (▼), 1,0 (■), 2,0 (•) e 3,0 mg/mL (▲). Os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica.

Na Fig. 10 estudou-se a desnaturação nessas condições experimentais. Observou-se um desvio aproximadamente 2.250 cm^{-1} a 2,5 kbar do centro de massa semelhante nas diferentes concentrações virais utilizadas. Assim, como era esperado para um processo de ordem 1, não se observou efeito de concentração viral na desnaturação por uréia e pressão. O retorno à pressão atmosférica promoveu recuperação parcial no valor do centro de massa sugerindo reversibilidade parcial.

Utilizando os valores de centro de massa obteve-se o gráfico de $\ln K_{den,p}^*$ em função da pressão (Fig. 11) e, pelos coeficientes angular e linear de cada reta, os valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$, foram obtidos como mostra a Tabela 4.

Tabela 4: Valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ e $p_{1/2den}$ por uréia 2,5 M e alta pressão em diferentes concentrações de TMV.

Concentração de TMV (mg/mL)	$\Delta V_{den,p}^{0*}$ (mL/mol de subunidade)	$p_{1/2\ den}$ (kbar)
0,5	103,0	1,5
1,0	105,0	1,7
2,0	90,5	1,6
3,0	107,4	1,6

Os valores de $\Delta V_{den,p}^{0*}$ de $p_{1/2den}$ não variam significativamente, demonstrando que o processo de desnaturação não depende da concentração viral.

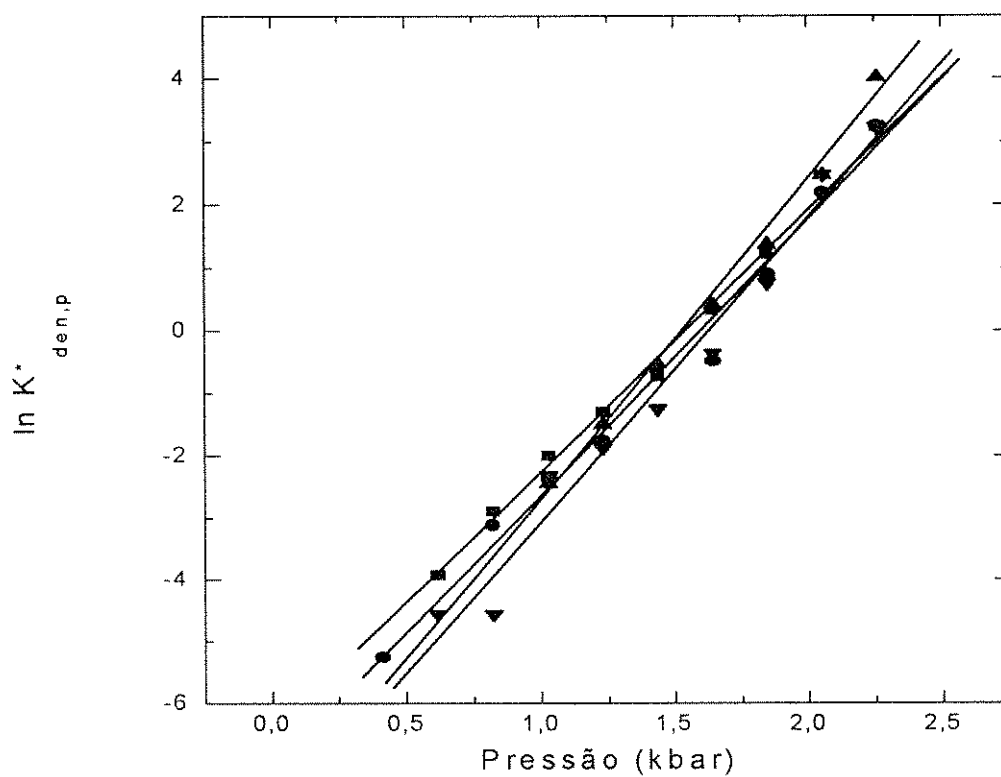


Figura 11: Efeito de pressão na desnaturação do TMV em presença de uréia 2,5 M.

Concentrações virais de 0,5 (∇), 1,0 ($\blacksquare$), 2,0 ($\bullet$) e 3,0 mg/mL ($\blacktriangle$).

Os valores foram baseados nos dados de centro de massa (Fig. 10), expresso na forma logarítmica $\ln K_{den,p}^*$, segundo equações (29) e (31).

3- Efeito de alta pressão e baixa temperatura em TMV na ausência e presença de uréia.

A alta pressão promove dissociação/desnaturação mais significativa do TMV em temperatura ambiente apenas em presença de pelo menos 2,5 M de uréia. Por outro lado, a -19 °C e 2,5 kbar na ausência de uréia, ocorre uma dissociação do vírus sem desnaturação significativa (Vital, 1996; Bonafe *et al.*, 1998). Investigou-se o efeito de baixa temperatura em diferentes pressões monitorando-se o espalhamento de luz e a intensidade de fluorescência. Inicialmente, incubou-se o vírus a temperatura de 25 °C, aumentou-se a pressão até um determinado valor, mantendo-se nesta condição por 60 minutos, diminuindo-se em seguida a temperatura de 5 em 5 °C até -10 °C num período de 10 minutos antes de efetuar as medidas espectroscópicas.

A Fig. 12 mostra a variação da intensidade do espalhamento de luz em função da temperatura em 1,75 e 2,0 kbar. Observa-se a 2,0 kbar que o abaixamento de temperatura promove maior diminuição da intensidade do espalhamento de luz comparando-se com 1,75 kbar, indicando maior dissociação viral. O retorno à pressão atmosférica promoveu parcial recuperação apenas de intensidade de espalhamento de luz.

A monitorização da fluorescência (Fig. 13) mostra que ocorreu uma diminuição acentuada de intensidade total com o aumento da pressão, e posterior aumento de fluorescência com o abaixamento de temperatura,

sugerindo diminuição das colisões do fluoróforo com o solvente em baixa temperatura. O centro de massa do espectro de fluorescência (Fig. 14) praticamente não se alterou, mostrando que nestas condições não ocorreu significativa desnaturação.

Calculou-se a energia de dissociação do TMV induzida pelo abaixamento de temperatura a pressão fixa de 1,75 e 2,0 kbar, e os resultados estão na Tabela 5. Através dos dados de espalhamento de luz referentes à Fig. 9, obteve-se o grau de dissociação (α_p) e a partir desses valores e utilizando a equação (22), pode-se determinar o valor de variação de energia livre de dissociação aparente (ΔG_{dis}^*), pela relação:

$$\Delta G_{dis}^* = -RT \ln K_p^* \quad (32)$$

Considerando a dissociação do TMV pela temperatura à pressão p , como K_t^* , temos:

$$\Delta G_{dis}^* = -RT \ln K_t^* \quad (33)$$

E assim, a variação de entalpia aparente (ΔH_{dis}^*) e a variação de entropia aparente (ΔS_{dis}^*) podem ser expressas como na equação abaixo:

$$\Delta G_{dis}^* = \Delta H_{dis}^* - T\Delta S_{dis}^* \quad (34)$$

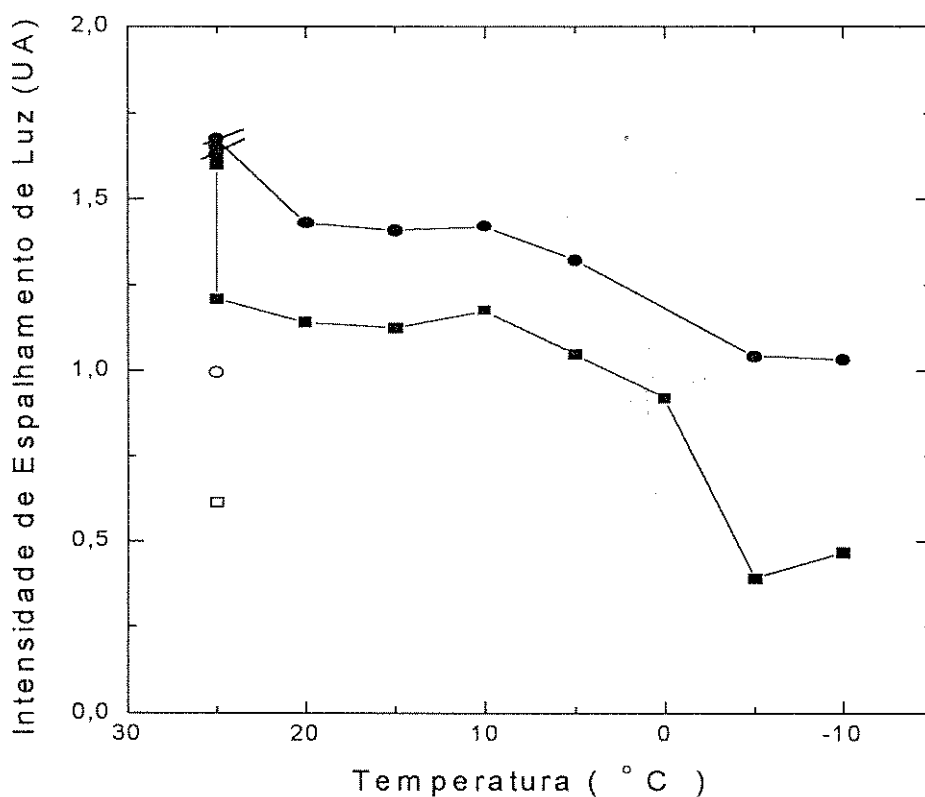


Figura 12: Efeito de pressão e baixa temperatura na intensidade do espalhamento de luz do TMV.

A intensidade de espalhamento de luz a 90° foi medida entre 345 e 355 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm), em pressão de 1,75 (●) e 2,0 kbar (■). Concentração viral de 69 $\mu\text{g/mL}$. Símbolos cheios cortados correspondem à condição inicial de pressão atmosférica e 25 °C. Os símbolos abertos correspondem ao retorno à 25 °C e pressão atmosférica. As medidas foram realizadas nas mesmas condições das Fig. 13 e 14.

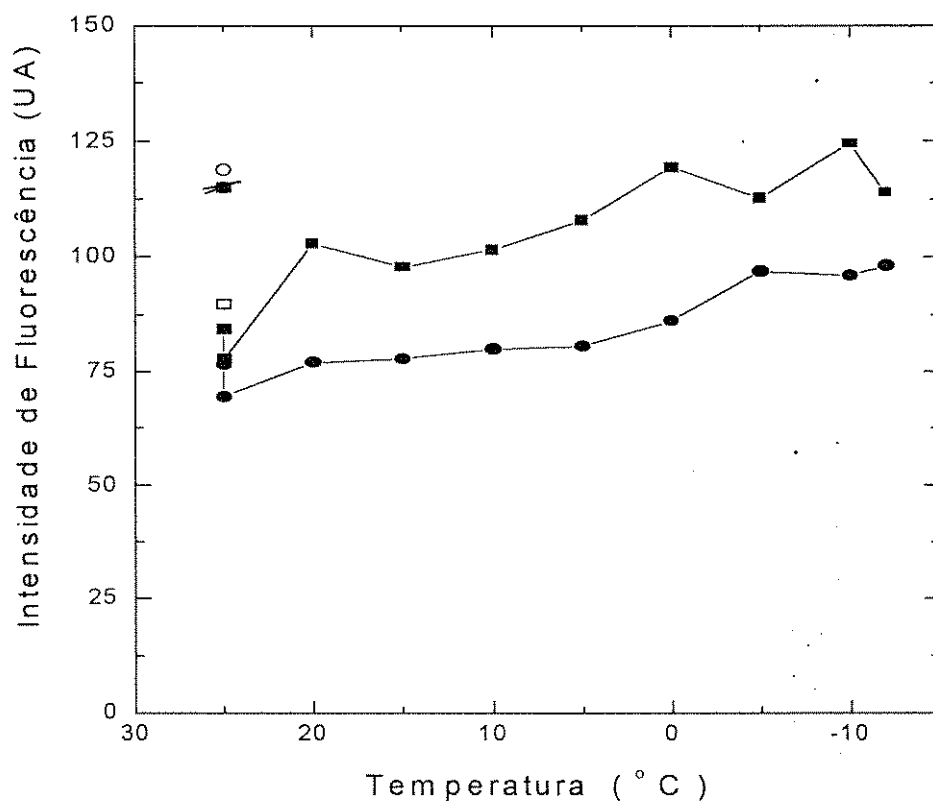


Figura 13: Efeito de pressão e baixa temperatura no espectro de fluorescência do TMV.

Intensidade de fluorescência entre 300 e 400 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 285$ nm), em pressão de 1,75 (●) e 2,0 kbar (■). Concentração viral de 69 $\mu\text{g/mL}$. Símbolos cheios cortados correspondem à condição inicial de pressão atmosférica e 25 °C, e os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica e 25 °C. As medidas foram realizadas nas mesmas condições das Fig. 12 e 14.

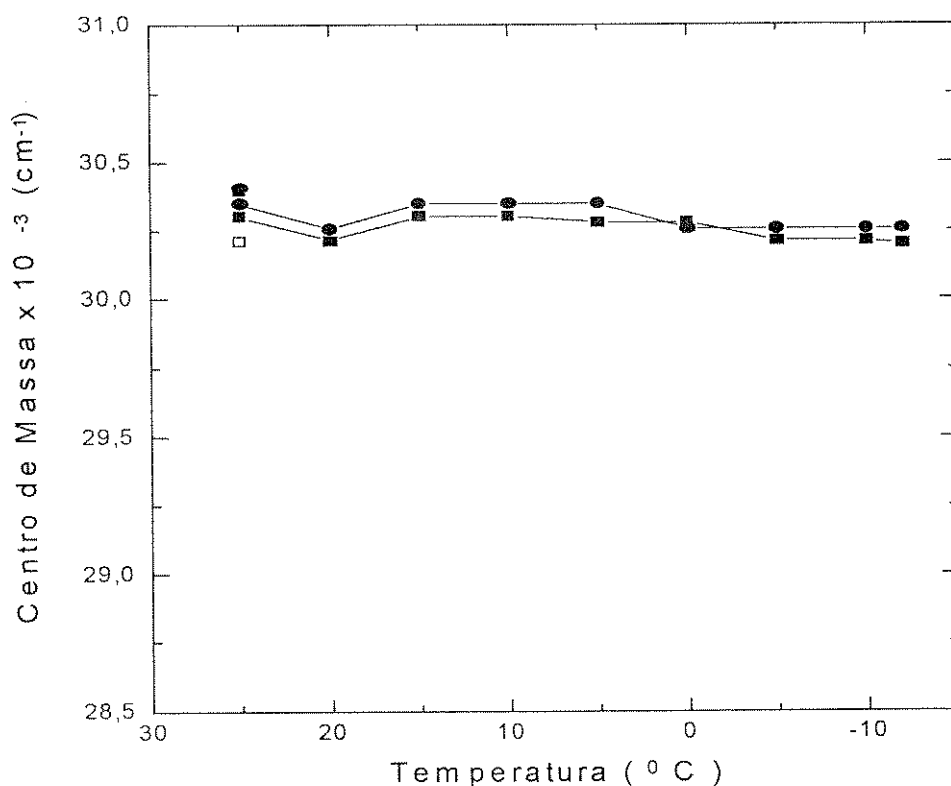


Figura 14: Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV.

Espectro de emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{exc} = 285$ nm), convertido para número de ondas, em pressão de 1,75 (•) e 2,0 kbar (■). Concentração viral de 69 $\mu\text{g/mL}$. Os símbolos abertos correspondem ao retorno a 25 °C e pressão atmosférica. As medidas foram realizadas nas mesmas condições das Fig. 12 e 13.

ou

$$\Delta G_{dis}^*/T = \Delta H_{dis}^*/T - \Delta S_{dis}^*$$

(35)

Pela equação (35) e com os dados da Tabela 5, pode-se construir o gráfico de van't Hoff (Fig. 15), $\Delta G_{dis}^*/T$ em função de $1/T$, obtendo-se, através das retas, os valores de variação de entropia (ΔS_{dis}^*) e entalpia (ΔH_{dis}^*) aparente de dissociação.

Tabela 5 : Cálculo para os valores de ΔH_{dis}^* e ΔS_{dis}^* referentes ao TMV submetido a 1,75 kbar e baixa temperatura.

Pressão (kbar)	I_{esp} (UA)	T (°C)	T (K)	1/T (1/K)	α	$\ln K_d$	ΔG (kcal/mol)*	$\Delta G^*/T$ (kcal/mol.K)
0	1631,37	25			0			
1,75	1631,37	25	298	0,0033	0			
1,75	1650,77	25	298	0,0033	0,0324			
1,75	1674,53	25	298	0,0033	0,0721			
1,75	1429,16	20	293	0,0034	0,3380	-28945	16861,6	57,5185
1,75	1409,75	15	288	0,0034	0,3705	-28749	16462,1	57,1305
1,75	1419,48	10	283	0,0035	0,3542	-28845	16230,3	57,3206
1,75	1323,02	5	278	0,0036	0,5155	-28045	15501,8	55,7319
1,75	1042,89	0	273	0,0037	0,9839	-26665	14474,1	52,9895
1,75	1033,27	-5	268	0,0037	0,9999	-26623	14186,3	52,9044
	--	-10	263	0,0038				

Obs.: (1) $n = 2130$
(2) $C = [TMV] = 0,5 \text{ mg/mL} = 1,25 \times 10^{-8} \text{ M}$
(3) $\ln K_d = n \ln n + (n + 1) \ln (\alpha) + n \ln C - \ln (1 - \alpha)$
(4) $\Delta G = -RT \ln K_{dis}$, onde $R = 0,0019872 \text{ kcal/ (K} \cdot \text{mol)}$

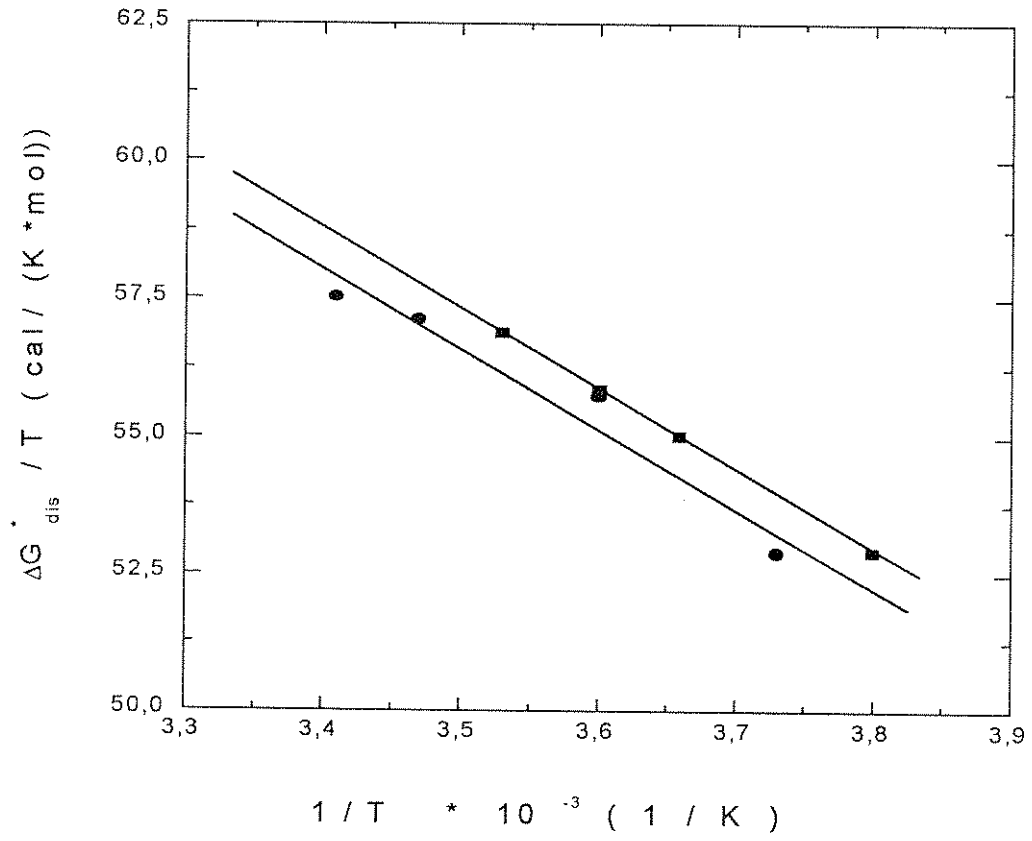


Figura 15: Gráfico de van't Hoff relacionado à dissociação do TMV.

Os valores foram baseados nas intensidades de espalhamento de luz da Fig. 13, aplicando-se a equação (25), em pressões de 1,75 (●) e 2,0 kbar (■). Concentração viral de 69 $\mu\text{g/mL}$.

A regressão linear do gráfico de van't Hoff para 1,75 kbar corresponde a $\Delta G^{\circ}/T = -14499,3/T + 107,3$, que corresponde a valores de $\Delta H^{\circ}_{dis} = -6,3$ kcal/mol de TMV, $\Delta S^{\circ}_{dis} = -50,3$ cal/(K.mol de TMV) e de $T\Delta S^{\circ}_{dis} = -15,0$ kcal/mol de TMV (Tabela 6). Esses resultados são próximos aos obtidos em experimentos realizados à 2,5 kbar (Vital, 1996), colocados na Tabela 6. Observa-se que a associação do TMV é um processo entropicamente dirigido.

Tabela 6: Entalpia (ΔH°_{dis}) e entropia (ΔS°_{dis}) aparentes de dissociação do TMV a diferentes pressões.

Pressão (kbar)	ΔH°_{dis} (kcal/ mol de subunidade)	ΔS°_{dis} (cal/K.mol de subunidade)	$T\Delta S^{\circ}_{dis}$ (kcal/molde subunidade)
1,75	-6,3	-50,3	-15,0
2,0	-6,9	-51,4	-15,3
2,5*	-8,2	-50,3	-15,0

*Vital (1996).

Estudou-se o efeito de baixa temperatura na desnaturação de TMV à 2,5 kbar e em presença de concentrações de uréia de 0,5 a 1,75 M. Acima desta concentração, nessas condições o TMV já se encontra em grau de desnaturação muito elevado. Incubou-se o TMV por 60 minutos a 2,5 kbar, diminuindo-se então a temperatura de 5 em 5 °C, obteve-se os espectros de fluorescência. A Fig. 16 mostra o gráfico do centro de massa em função da temperatura obtido a partir desses espectros. Observa-se que o desvio do centro de massa é mais significativo com o aumento da pressão apenas em concentrações de 1,5 e 1,75 mg/mL de uréia, obtendo-se adicional desvio com o

abaixamento de temperatura. Após retorno a 25 °C e a pressão atmosférica ocorreu recuperação parcial do valor do centro de massa, sugerindo desnaturação parcial.

A partir dos valores do centro de massa, calculou-se o grau de desnaturação, determinando-se a variação de energia livre de desnaturação aparente (ΔG_{den}^*) através da seguinte equação:

$$\Delta G_{den}^* = -RT \ln K_p^* \quad (36)$$

Representando, assim, a variação de entalpia (ΔH_{den}^*) e variação de entropia (ΔS_{den}^*) de desnaturação aparente como:

$$\Delta G_{den}^* = \Delta H_{den}^* - T\Delta S_{den}^* \quad (37)$$

ou

$$\Delta G_{den}^*/T = \Delta H_{den}^*/T - \Delta S_{den}^* \quad (38)$$

A Tabela 7 mostra os valores obtidos através do gráfico de $\Delta G_{den}^*/T$ em função de $1/T$ (Fig. 17). Observa-se que não há diferença significativa entre os valores de ΔH_{den}^* e $T\Delta S_{den}^*$ para as diferentes concentrações de uréia utilizada, indicando que este processo não é entropicamente dirigido.

Tabela 7 : Valores de ΔH_{den}^* e ΔS_{den}^* do TMV a 2,5 kbar e baixa temperatura em diferentes concentrações de uréia.

Concentração de uréia (M)	ΔH_{den}^* (kcal/mol de subunidade)	ΔS_{den}^* (cal/K·mol de subunidade)	$T\Delta S_{den}^*$ (kcal/mol de subunidade)
1,5	- 4,5	- 14,7	- 4,4
1,75	- 11,1	- 34,2	- 10,2

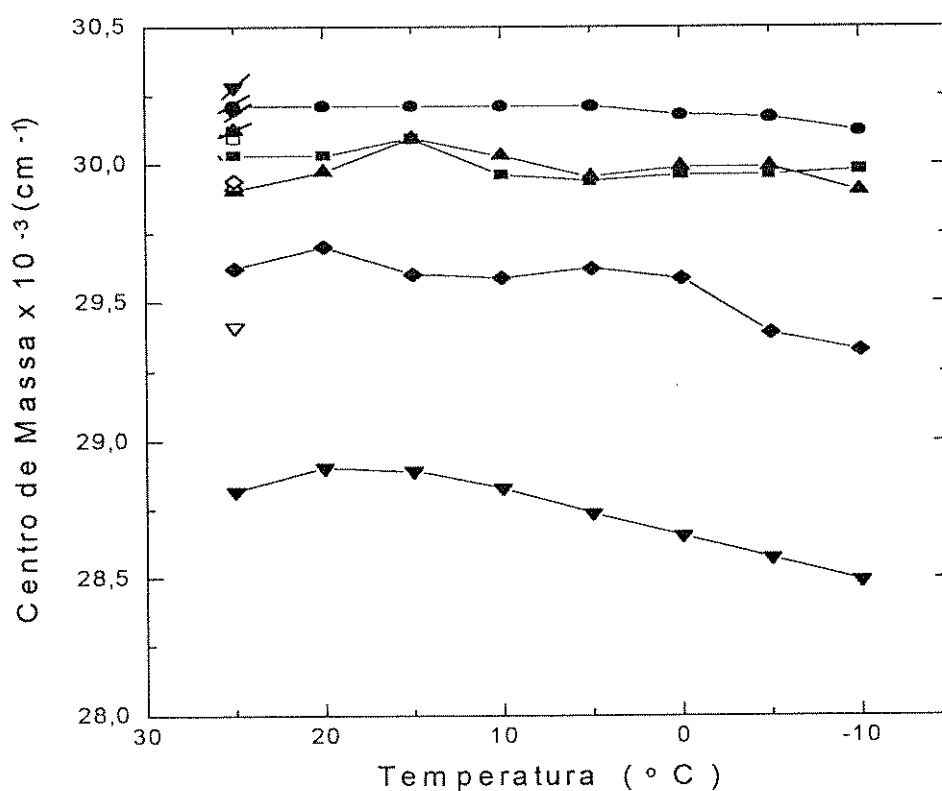


Figura 16: Efeito de pressão e baixa temperatura no centro de massa do espectro de fluorescência do TMV em presença de uréia.

Espectro de emissão entre 300 e 400 nm ($\lambda_{exc} = 285$ nm), convertido para número de ondas em ausência (•), e em presença de uréia 0,5 (■), 1,0 (▲), 1,5 (◆) e 1,75 M (▼). Concentração viral de 1 mg/mL. Símbolos cheios cortados correspondem à condição inicial de pressão atmosférica e 25 °C, e os símbolos abertos correspondem ao retorno à pressão atmosférica e 25 °C.

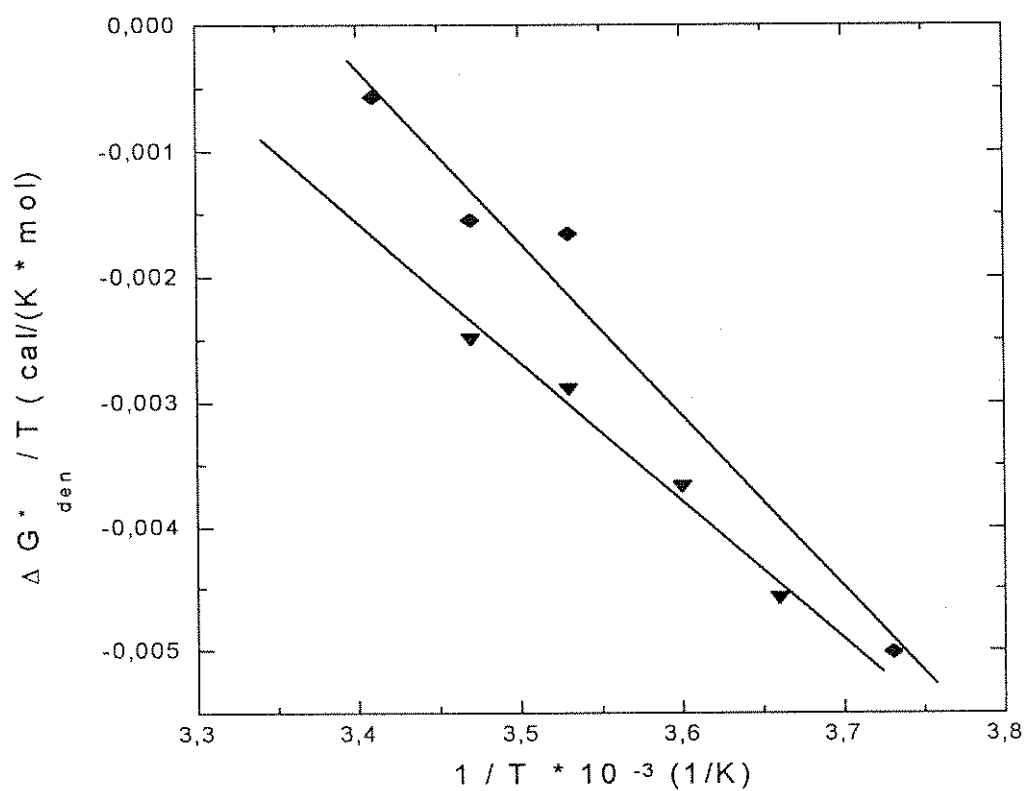


Figura 17: Gráfico de van't Hoff relacionado à desnaturação do TMV em uréia e alta pressão.

Os valores foram baseados nos dados de centro de massa (Fig. 16), e nas equações (29) e (31), em presença de uréia 1,5 (♦) e 1,75 M (▼). Concentração viral de 1 mg/mL.

DISCUSSÃO

1 - Efeito de pressão em TMV.

O TMV submetido a 2,5 kbar e baixa temperatura apresenta dissociação, sem ocorrência de processo de desnaturação (Fig. 4 e 6). A pressão promove desnaturação em presença de uréia em concentrações subdesnaturantes (Fig. 8). O retorno à pressão atmosférica induz reversibilidade parcial. Bonafé e colaboradores (1998) verificaram que o vírus apresenta pouca dissociação a 2,5 kbar e 25 °C, com reversibilidade total.

A presença de RNA modifica a estrutura tridimensional da proteína capsídica. Ocorre presença de uma α hélice adicional devido a interações com o RNA, além de outras diferenças estruturais mostradas através da cristalografia de raios X (Fig. 1) (Hith & Richards, 1981). A proteína capsídica livre de RNA agregada como cilindro helicoidal sofre dissociação em níveis de pressão relativamente baixos (Jaenicke *et al.*, 1981). Ocorre completa dissociação a 0,6 kbar, a 26,2 °C e a 29,7 °C, pH 6,5 o $(p_{1/2})_0$ é de 0,4 kbar, com ΔV_{dis}^0 de aproximadamente 86 mL/mol de subunidade. A diferença de variação de energia livre aparente de estabilização ($\Delta \Delta G^*$) causada pelo RNA viral pode ser estimada através desses dados e de nossos resultados, utilizando a equação (Silva e Silveira, 1993):

$$\Delta\Delta G^*/n = \Delta G_R^*/n_R - \Delta G_0/n_0 \quad (39)$$

onde $\Delta G_R^*/n_R$ representa a variação de energia aparente de associação de TMV em presença de RNA, e $\Delta G_0/n_0$ é a variação de energia livre sem RNA.

Relacionando as equações (2) e (14), $\ln K_p = \ln K_{atm} + p\Delta V_{dis}^0 / RT$ e $\Delta G_{dis} = -RT \ln K_p$, tem-se que:

$$\Delta G_{dis} = -[RT \ln K_{atm} + (p\Delta V_{dis}^0)] \quad (40)$$

Substituindo ΔG_{dis} por ΔG_R^* e ΔG_0 , temos:

$$\Delta G_R^* = -[RT \ln K_{atm}^* + (p_R \Delta V_R^*)] \quad (41)$$

e

$$\Delta G_0 = -[RT \ln K_{atm} + (p_0 \Delta V_0)] \quad (42)$$

Substituindo a equação (39) pelas equações (41) e (42) temos:

$$\Delta\Delta G^*/n = -[(p_R \Delta V_R^*/n_R) - (p_0 \Delta V_0/n_0)] \quad (43)$$

Representando a pressão p como $(p_{1/2})_R$, pode-se escrever a equação (42) como:

$$\Delta\Delta G^{\circ}/n = - [((p_{1/2})_R \Delta V_R^{\circ}/n_R) - ((p_{1/2})_0 \Delta V_0^{\circ}/n_0)] \quad (44)$$

sendo $(p_{1/2})_R$ e $(p_{1/2})_0$ valores da pressão onde 50% do vírus está dissociado em presença e ausência de RNA, respectivamente, $\Delta V_R^{\circ}/n_R$ e $\Delta V_0^{\circ}/n_0$ são as variações de volume de dissociação aparente e de volume de dissociação por subunidade de proteína capsídica em presença e ausência de RNA, respectivamente.

Através da extrapolação de $\ln K_p$ em função da pressão à temperatura ambiente, o $(p_{1/2})_R$ corresponde a cerca de 7 kbar, e $\Delta V_R^{\circ}/n_R$ variação de volume de dissociação aparente, corresponde a 16,3 mL/mol por subunidade (Bonafe *et al.*, 1998). Portanto, aplicando-se a equação (44) obtém-se $\Delta\Delta G^{\circ}/n$ de -1,7 kcal/mol de subunidade. A energia livre de estabilização aparente para a partícula viral corresponde portanto a 3600 kcal/mol de TMV.

A pressão hidrostática também tem sido utilizada para analisar as interações de proteínas e ácidos nucleicos (DNA), como por exemplo o sistema repressor Arc e DNA operador (Silva & Silveira, 1993; Foguel *et al.*, 1994). Recentemente, observou-se que o RNA estabiliza o bacteriófago R17 contra a desnaturação (Da Poian *et al.*, 1993). O CPMV (Da Poian *et al.*, 1994) também apresenta alta estabilidade a alta pressão em temperatura ambiente, comparando-se com a proteína capsídica purificada. A energia livre de estabilização é de aproximadamente 0,988 kcal/mol de subunidade. Na presença de uréia, alta pressão induz desnaturação irreversível na ausência de

RNA, ao contrário do que ocorre quando o RNA está presente. Por outro lado, Da Poian e colaboradores (1995) mostraram que alta pressão e baixa temperatura no CPMV em presença de RNA promove dissociação irreversível. Esses achados podem estar relacionados à liberação de RNA pela proteína. O CPMV (Gaspar *et al.*, 1997) apresenta dissociação quando submetido à alta pressão em temperatura ambiente, com reversibilidade no retorno à pressão atmosférica. O RNA tem papel importante nessa reassociação. Por outro lado, a diminuição da temperatura a 2,5 kbar promove desnaturação irreversível.

A reassociação após despressurização é verificada em proteínas diméricas (Silva *et al.*, 1986; Ruan e Weber, 1988; Silva, 1992) e tetraméricas (King e Weber, 1986; Ruan e Weber, 1989). A proteína tetramérica gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é dissociada em alta pressão tanto em 25 °C quanto a 0 °C (Cioni *et al.*, 1997). No retorno à pressão atmosférica observou-se processo de reassociação mais lento para proteína pressurizada à baixa temperatura. Proteínas multiméricas, como a hemoglobina gigante de *Glossoscolex paulistus* (eritrocruorina) (Silva *et al.*, 1989) e a hemocianina de *Megalobulimus ovatus* (Bonafé *et al.*, 1994), sofrem dissociação em alta pressão, após retorno à pressão atmosférica, permanecem dissociadas por vários dias. Ambas as proteínas apresentam estabilização da forma associada, e deslocamento da curva de dissociação para maiores pressões, com reassociação significativa após retorno à pressão atmosférica em presença de cálcio. O glicerol também promove estabilização da forma

associada da eritrocruorina e favorece o processo de reassociação pós pressão, porém não apresenta tais efeitos em hemocianina.

2 - Alta pressão em diferentes concentrações de TMV: heterogeneidade quanto à energia livre de dissociação.

Alta pressão hidrostática em diferentes concentrações de TMV à 0 °C induziu dissociação. A variação de volume de dissociação é calculado através da equação (2). Variando-se a pressão em concentração fixa de TMV, podemos reescrever a equação $\ln K_p = \ln K_{atm} + p\Delta V_{dis}^0/RT$ como:

$$\ln K_p = \ln K_{atm} + p \Delta V_p/RT \quad (45)$$

Como a dissociação do TMV não está em um equilíbrio verdadeiro, mas no estado estacionário (ver reação 15), temos os parâmetros aparentes:

$$\ln K_p^* = \ln K_{atm}^* + p \Delta V_p^*/RT \quad (46)$$

onde ΔV_p^* é a variação de volume de dissociação aparente calculado pela dissociação por pressão.

Através do gráfico de $\ln K_p^*$ em função da pressão foram obtidos os valores de ΔV_{dis}^* e $p_{1/2}$ (pressão a qual 50% do vírus se encontra dissociado), para as diferentes concentrações virais (Tabela 2). Notou-se que não houve

variação significativa do ΔV_{dis}^* e $p_{1/2}$ com o aumento de concentração. Essa dependência pode ser deduzida, isolando-se p da equação (8):

$$p_{1/2} = \frac{RT}{\Delta V_p^*} \ln \left(\frac{n^n (\alpha_p)^n}{1 - \alpha_p} \right) + \frac{RT}{\Delta V_p^*} \ln \frac{C^{(n-1)}}{K_{atm}} \quad (47)$$

onde R é a constante dos gases, $82,057 \text{ cm}^3 \text{ atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, α_p é o grau de dissociação à pressão p e n é a ordem de dissociação. Verifica-se que $p_{1/2}$ depende da concentração C , sendo assim, uma variação de concentração do vírus de C_1 para C_2 , à pressão fixa, resulta em mudança do valor de $p_{1/2}$ e, portanto, pode-se calcular $\Delta p_{1/2}$ a partir da equação abaixo:

$$\Delta p_{1/2} = p_{1/2}(C_2) - p_{1/2}(C_1) = \frac{RT}{\Delta V_c^*} (n-1) \ln \frac{C_2}{C_1} \quad (48)$$

ΔV_c^* representa a variação de volume de dissociação aparente calculado através da dependência de concentração na curva de dissociação por pressão.

O primeiro termo da equação (47) é independente da concentração, assim a diferença " $p_{1/2}(C_2) - p_{1/2}(C_1)$ ", esta equação pode ser escrita como:

$$\Delta p_{1/2} = \frac{((n-1)/n) RT \ln (C_2/C_1)}{(\Delta V_c^*/n)} \quad (49)$$

Como anteriormente mencionado, existem diferentes maneiras de avaliar a variação de volume de dissociação, (ver equações 46 e 47). Definimos acima ΔV_p e ΔV_c como a variação de volume calculada, respectivamente, a partir da curva de dissociação por pressão e a partir da variação de $p_{1/2}$ em diferentes concentrações de proteínas. Em dímeros ocorre uma dependência de concentração na curva de dissociação, com $p_{1/2}$ desviando para altas pressões. Nesses casos o ΔV_p se aproxima do ΔV_c , com comportamento estocástico (Da Poian *et al.*, 1993). Em proteínas tetraméricas, assim como oligômeros com mais subunidades e partículas virais, observou-se crescente falta de dependência de concentração na curva de dissociação por pressão, verificada através do $\Delta p_{1/2}$ experimental, com conseqüente discrepância entre ΔV_p e ΔV_c , ou comportamento determinístico (Bonafé *et al.*, 1994). Proteínas multiméricas estudadas nessa abordagem são eritrocruorina (Silva *et al.*, 1989) e a hemocianina (Bonafe *et al.*, 1994), e além disso o Bacteriófago R17 (Da Poian *et al.*, 1993). Ocorre uma transição de comportamento estocástico para determinístico a partir de proteínas com mais de duas subunidades, e as partículas passam a ter propriedades semelhantes a corpos macroscópicos, como heterogeneidade quanto à energia livre de dissociação (Erijman e Weber, 1993)

Um interessante achado em relação a essa heterogeneidade é que concentrações crescentes de uréia promovem aproximação do ΔV_p em relação ao ΔV_c , restabelecendo pelo menos de modo parcial dependência de concentração na curva de dissociação por pressão. Isso pode ser explicado baseando-se em uma homogeneização das partículas virais quanto à energia livre de dissociação (Da Poian *et al.*, 1993; Weber *et al.*, 1996).

Para o caso do TMV, $n = 2130$ subunidades e $\Delta V_{dis}^{0*} = 14,1 \pm 0,5$ mL/mol de subunidade e, segundo a equação (47), o valor de $\Delta p_{1/2}$ esperado para uma variação de 10 vezes na concentração do vírus é de 3,5 kbar. Segundo os resultados obtidos (Tabela 2), não se observou variação de $p_{1/2}$ nas diferentes concentrações estudadas ($\Delta p_{1/2} = 0$). Essa não dependência de concentração de TMV na curva de dissociação por pressão deve estar relacionada com o fenômeno de heterogeneidade do TMV quanto à energia livre de associação, a exemplo do que ocorre em outros agregados multiméricos (Ruan & Weber, 1989; Silva & Weber, 1988). Isso sugere que ocorre comportamento determinístico, onde as partículas virais tem propriedades de corpos macroscópicos individuais, ao contrário do comportamento estocástico em outros sistemas como proteínas diméricas.

3 - Alta pressão em diferentes concentrações de TMV na presença de uréia: desnaturação por pressão.

Embora o modo pelo qual a uréia interage com a proteína não seja bem compreendido, postula-se uma interação direta de uréia com a cadeia polipeptídica, ou também a solubilização de grupos apolares da proteína (Scholtz *et al.*, 1995).

Alta pressão em presença de uréia 2,5 M promoveu um desvio de aproximadamente 2.250 cm^{-1} do centro de massa do espectro de fluorescência, com valor do $p_{1/2}$ de 1,71 kbar. Não foi possível obter valores das intensidades espalhamento de luz, conseqüentemente a dissociação, devido a problemas técnicos. Em menores concentrações observou-se desnaturação por pressão em pressões superiores, com maiores valores de $p_{1/2den}$.

O valor calculado do volume de desnaturação aparente por pressão em presença de uréia ($\Delta V_{den,p}^*$) obtido através do centro de massa do espectro de fluorescência, aumentou significativamente quando variou-se a concentração de uréia de 1,5 a 2,5 M.

A despressurização mostrou parcial renaturação, segundo os valores de centro de massa pós retorno à pressão atmosférica. O efeito de pressão em presença de uréia 2,5 M, praticamente não variou em diferentes concentrações de TMV (Fig. 8 e 10), com $p_{1/2den}$ de 1,61 kbar. Isso está de acordo com o

processo de desnaturação, que é esperado ser independente de concentração de proteína.

Estudos utilizando CPMV também mostram efeito de alta pressão dependente de concentrações maiores de uréia (Da Poian *et al.*, 1994). Em ausência de uréia, pressão de 2,5 kbar promoveu desvio para o vermelho do espectro de fluorescência de aproximadamente 100 cm^{-1} , sendo que na presença de uréia 2,5 M o desvio aumentou para 700 cm^{-1} .

4 - Alta pressão e baixa temperatura em TMV na ausência e presença de uréia: dissociação e desnaturação

Estudos realizados em nosso laboratório utilizando alta pressão e baixa temperatura em TMV (Vital, 1996; Bonafe *et al.*, 1998) permitiram o cálculo de parâmetros termodinâmicos como a variação de entropia ($T\Delta S_{dis}^*$) e entalpia (ΔH_{dis}^*) de dissociação aparentes, respectivamente -14,2 e -8,23 kcal/mol. A combinação do efeito de alta pressão e baixa temperatura favorece a dissociação ou desnaturação de proteínas (Foguel *et al.*, 1996; Cioni *et al.*, 1997), complexos de proteína - DNA (Silva e Silveira, 1993; Foguel *et al.*, 1994) e vírus (Da Poian *et al.*, 1995; Vital, 1996; Gaspar *et al.*, 1997).

Um dos enfoques do presente trabalho foi o estudo da dissociação do TMV pelo abaixamento de temperatura em pressões menores que 2,5 kbar. Assim, através da extrapolação dos parâmetros termodinâmicos ΔH^* e $T\Delta S^*$ à pressão atmosférica, pode-se minimizar os efeitos da deriva conformacional das

subunidades (Weber, 1993). Em pressões de 1,75 e 2,0 kbar foram obtidos os valores de $T\Delta S_{dis}^*$ e ΔH_{dis}^* semelhantes aos obtidos para 2,5 kbar (Vital, 1996). A variação de entropia de dissociação é maior que a variação de entalpia em diversas proteínas oligoméricas já estudadas, e os valores de $T\Delta S$ de associação são grandes e positivos, sendo responsáveis pela predominância de agregados (Weber, 1993).

A dimerização e o enovelamento do Repressor Arc também é favorecido pela entropia (Foguel *et al.*, 1994), assim como o Bacteriófago P22, que só se dissocia por pressão a temperaturas abaixo de 0 °C (Foguel *et al.*, 1994). Estudos utilizando Troponina C (TnC) submetida a alta pressão e baixa temperatura mostraram que ocorre mudança do domínio - N da TnC para uma conformação similar à da forma ligada ao Ca^{+2} (Foguel *et al.*, 1996). A alta pressão combinada com baixa temperatura leva ao abaixamento da entropia em solução, favorecendo a ligação de resíduos apolares com água (Kauzmann, 1959; Weber, 1993). Ocorre, ainda, exposição de partes hidrofóbicas da proteína e dissociação ou desnaturação de suas subunidades, originando uma maior organização da água. Pela equação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, nota-se que a entropia ($T\Delta S$) é dependente da temperatura na obtenção da energia livre de Gibbs, portanto, com a diminuição da temperatura as interações água-água e proteína-proteína são desfavorecidas (Weber, 1993; Foguel *et al.*, 1995).

Quando se estudou o efeito da temperatura na desnaturação de uréia e pressão no TMV, incubando o mesmo em diversas concentrações até 2,5 M de uréia e diminuindo-se a temperatura, obteve-se desnaturação viral em

concentrações de uréia de 1,5 e 1,75 M. Nesse último caso, obteve-se $T\Delta S_{den}^*$ e ΔH_{den}^* de, respectivamente, -10,8 e -11,1 kcal/mol. O valor de $T\Delta S_{den}^*$ se aproxima de ΔH_{den}^* . Portanto a variação de energia livre aparente de desnaturação por uréia é próxima de zero.

A partir de nossos resultados pode-se propor que a dissociação e desnaturação do TMV induzidos por alta pressão a baixa temperatura, e na presença de uréia 2,5 M ocorram de acordo com o esquema apresentado na Fig. 18.

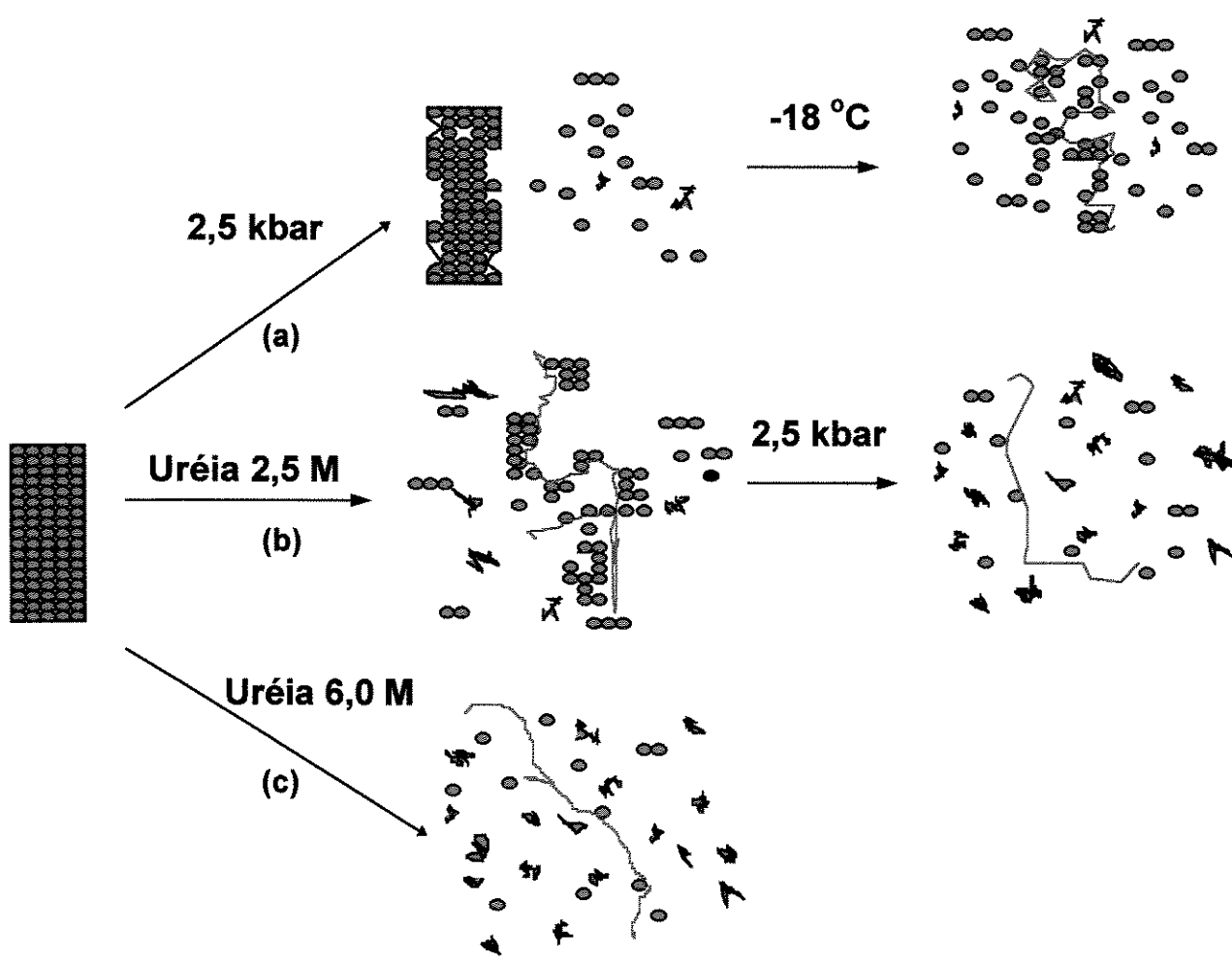


Figura 18. Esquema do processo de dissociação e desnaturação do TMV induzido por alta pressão.

(a) TMV a 2,5 kbar, ocorre pouca dissociação, e com o abaixamento de temperatura observa-se dissociação significativa, sem ocorrência de desnaturação; (b) TMV em presença de uréia 2,5 M, observa-se pouca desnaturação, e com o aumento de pressão (2,5 kbar) ocorre desnaturação viral; (c) TMV em presença de uréia 6,0 M (Bonafe *et al.*, 1998), observa-se desnaturação viral, semelhante a (b).

-  Proteína capsídica desnaturada
-  RNA
-  Proteína capsídica

PERSPECTIVAS

- efeito de alta pressão em diferentes concentrações de TMV na presença de uréia, investigando a dependência de concentração nesse processo.
- determinação da entalpia e entropia de dissociação em diferentes pressões.
- efeito de alta pressão em TMV em presença de glicerol.
- efeito de alta pressão e baixa temperatura na proteína capsídica isolada.
- efeito de alta pressão em diferentes concentrações de proteína capsídica isolada, em ausência e presença de uréia.
- análise dos produtos de dissociação através de gel filtração em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asselin, A. e Zaitlin, M. (1978). Characterization of a second protein associated with virions of tobacco mosaic virus. *Virology* **91**, 173-181.
- Cioni, P. e Strambini, G. B. (1997). Pressure-induced dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate. Dehydrogenase: heterogeneous kinetics and perturbations of subunit structure. *Biochemistry* **36**, 8586-8593.
- Bonafe, C. F. S., Villas-Boas, M. S., Suarez, M. C. e 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.
- Bonafe, C. F. S.; Araujo, J. R. e Silva, J. L. (1994). Intermediate states of assembly in the dissociation of gastropod hemocyanin by hydrostatic pressure. *Biochemistry* **33**, 2651-2660.
- 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., e Vega, J.. Tobacco Mosaic virus disassembly by high hydrostatic pressure in combination with urea and low temperature. *Biochemistry* **37**, nº 31,xxx-yyy.

- Da Poian, A. T.; Oliveira, A. C.; Gaspar, L. P. e Silva, J. L. (1993). Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. *J. Mol. Biol.* **231**, 999-1008.
- Da Poian, A. T.; Johnson, J. E. 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., e Silva, J. L. (1995). Cold denaturation of an icosahedral virus. The role of entropy in virus assembly. *Biochemistry* **34**, 2672-2677.
- Erijman, L; Lorimer, G. H. e Weber, G. (1993). Reversible dissociation and conformational stability of dimeric ribulose biphosphate carboxylase. *Biochemistry* **32**, 5187-5195.
- Foguel, D., e Silva, J. L. (1994). Cold denaturation of a repressor-operator complex: The role of entropic in protein DNA recognition. *Biochemistry* **91**, 8244-8247.
- Foguel, D. e Weber, G. (1995). Pressure induced dissociation and denaturation of hallophocyanin at subzero temperatures. *J. Biol. Chem.* **270**, 28759-28766.

- Foguel, D.; Chaloub, R. M.; Silva, J. L., Crofts, A. R. e Weber, G. (1992). Pressure and low temperature effects on the fluorescence emission spectra and lifetimes of the photosynthetic components of cyanobacteria. *Biophys.J.* **63**, 1613-1622.
- Foguel, D., Teschke, C. M., Prevelige, P. E. e, Silva, J. L. (1995). Role of entropic interactions in viral capsids: single amino acids substitutions in P22 bacteriophago coat protein resulting in loss of capsid stability. *Biochemistry* **34**, 1120-1126.
- Foguel, D., Suarez, M. C., Barbosa, C., Rodrigues, J. J., Sorenso, M. M., Smillie, L. B., e Silva, J. L. (1996). Mimicry of the calcium induced conformational state of troponin C by low temperature under pressure. *Biochemistry* **93**, 10642-10646.
- Gaspar, L. P.; Johnson, J. E.; Silva, J. L., and 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.
- Hirth, L. e Richards, K. E. (1981). Tobacco mosaic virus: model for structure and function of a simple virus. *Adv. Virus Res.* **26**, 145-199.

- Jaenicke, R.; Ludemann, H. D. e Schade, B. C. (1981). High pressure effects on the endothermic association of tobacco mosaic virus protein. *Biophys. Struct. Mech.* **7**, 195-203
- Kauzmann, W. (1959). Some factors in interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **13**, 1-63.
- King, L. e Weber, G. (1986a). Conformational drift and cryoinactivation of lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **25**, 3637-3640.
- King, L. e Weber, G. (1986b). Conformational drift of lactate dehydrogenase. *Biochemistry* **25**, 3632-3637.
- Klug, A. (1972). Assembly of tobacco mosaic virus. *Fed. Proc.* **31**, 30-42.
- Lauffer, M. A., Ansevir, A. T., Cartwright, T. E. e Brinton, C. C. (1958). *Nature* **181**, 1338-1339.
- Lavenga, B. H. (1978). Thermodynamics of irreversible processes. *The Macmillan Press Ltd.*, London.
- Neuman, R. C. Jr.; Kauzmann, W. e Zipp, A. (1973). Pressure dependence of weak acid ionizations in aqueous buffers. *J. Phys. Chem.* **77**, 2687-2691.

Noordam, D. (1973). In Identification of plant viruses. Methods & experiments.
Centre for Agricultural and Documentation Wafeningen.

Paladini, A. A. (1980). Enolase dissociation induced by high pressure. A study
by fluorescence polarization. *Ph. D. Thesis. University of Illinois, USA.*

Paladini, A. A. e Weber, G. (1981). Absolute measurements of fluorescence
polarization at high pressures. *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 419-427.

Raghavendra, K.; Salunke, D. M.; Caspar, D. L. D. e Schuster, T. M. (1986).
Disk aggregates of tobacco mosaic virus protein in solution: electron
microscopy observations. *Biochemistry* **25**, 6276-6279.

Raghavendra, K.; Kelly, J. A.; Khairallah, L. e Schuster, T. M. (1988). Structure
and function of disk aggregates of the coat protein of tobacco mosaic virus.
Biochemistry **27**, 7583-7588.

Ruan, K. e Weber, G. (1988). Dissociation of yeast hexokinase by hydrostatic
pressure. *Biochemistry* **27**, 3295-3301.

- Ruan, K. e Weber, G. (1989). Hysteresis and conformational drift of pressure-dissociated glyceraldehydephosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **28**, 2144-2153.
- Scheele, R. B. e Lauffer, M. A. (1967). Acid-basic titrations of tobacco mosaic virus and tobacco mosaic virus protein. *Biochemistry* **6**, 3076-3081.
- Scholtz, J. M.; Barrick, D.; York, E. J.; Stewart, J. M. e Baldwin, R. L. (1995). Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 185-189.
- Shire, S. J.; Steckert, J. J; Adams, M. L. e Schuster, T. M. (1979). Kinetics and mechanism of tobacco mosaic virus assembly: direct measurement of relative rates of incorporation of 4S and 20S protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2745-2749.
- Silva, J. L. e Weber, G. (1988). Pressure-induced dissociation of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **199**, 149-159.
- Silva, J. L. e Silveira, C. F. (1993). Energy coupling between DNA binding and subunit association is responsible for the specificity of DNA- Arc interaction. *Protein Science* **2**, 945-950.

Silva, J. L. e Weber, G. (1993). Pressure stability of proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **44**, 89-113.

Silva, J. L., Miles, E. W. e Weber, G. (1986). Pressure dissociation and conformational drift of the beta dimer of tryptophan synthase. *Biochemistry* **25**, 5780-5786.

Silva, J. L., Villas-Bôas, M. S., Bonafé, C. F. S. e Meirelles, N. C. (1989). Anomalous pressure dissociation of large protein aggregates. Lack of concentration dependence and irreversibility at extreme degrees of dissociation of extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **262**, 15863-15868.

Silva, J. L., Silveira, C. F., Correia Jr., A. e Pontes, L. (1992). Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of Arc Repressor. *J. Mol. Biol.* **223**, 545-555.

Silva, J. L., Foguel, D., Da Poian, A. T. e Prevelige, P. E. (1996). The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 166-175.

Suarez, M. C. (1995). Estados conformacionais do domínio N-terminal recombinante da troponina C e da tropomiosina induzidos por alta pressão hidrostática e baixas temperaturas. Tese de mestrado. Departamento de Bioquímica Médica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

Vital, C. (1996). Efeito de pressão hidrostática e baixa temperatura no vírus do mosaico do tabaco (TMV). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

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. (1993). Thermodynamics of the association and the pressure dissociation of oligomeric proteins. *J.Phys.Chem.* **97**, 7108-7114.

Weber, G. e Drickamer, H. G. (1983). The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 89-112.

Weber, G.; Da Poian, A. T. e Silva, J. L. (1996). Concentration dependence of the subunit association of oligomers and viruses and modification of the latter by urea binding. *Biophys. J.* **70**, 167-173.

Xu, G. J. e Weber, G. (1982). Dynamics and time-averaged chemical potential of proteins: Importance in oligomer association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5268-5271.

Tobacco Mosaic Virus Disassembly by High Hydrostatic Pressure in Combination with Urea and Low Temperature^{†,‡}

Carlos F. S. Bonafé,^{*,§} Claudia M. R. Vital,[§] Rosiani C. B. Telles,[§] Maria C. Gonçalves,^{||} Maria S. A. Matsuura,[§] Francisco B. T. Pessine,^{||} Daniel R. C. Freitas,[§] and Jorge Vega[‡]

Departamento de Bioquímica, and Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, and Departamento de Físico Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received February 12, 1998; Revised Manuscript Received June 1, 1998

ABSTRACT: We investigated the effect of low temperature and urea combined with high pressure on tobacco mosaic virus (TMV). The evaluation of its aggregation state and denaturation process was studied using gel filtration, transmission electron microscopy, and spectroscopic methods. The incubation at 2.5 kbar induced 18% dissociation, and decreasing of temperature to $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ promoted additional dissociation to 72%, with stabilization of the dissociation products. Under such conditions, extensive denaturation did not occur. The apparent enthalpy and entropy of dissociation (ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{\text{dis}}^*$) were -9.04 kcal/mol subunit and -15.1 kcal/mol subunit, respectively, indicating that the TMV association is an entropically driven process. The apparent free energy of stabilization given by the presence of RNA is at least -1.7 kcal/mol subunit. Urea-induced dissociation of TMV samples and incubation at high-pressure promoted a higher degree of dissociation. The volume change of dissociation decreased in magnitude from -16.3 to -3.1 mL/mol of dissociated subunit, respectively, in the absence and presence of 2.5 M urea, suggesting exposure of the protein-protein interface to the solvent. High-pressure induced remarkable TMV denaturation in the presence of 2.5 M urea, with a volume change of -101 mL/mol of denatured subunit. The apparent enthalpy and entropy of denaturation (ΔH_{den}^* and $T\Delta S_{\text{den}}^*$) by 1.75 M urea at 2.5 kbar was -11.1 and -10.2 kcal/mol subunit, respectively, demonstrating that the TMV protein coat presents an apparent free energy of denaturation by urea close to zero. Although the processes could not be assumed to be pure equilibria, these thermodynamic parameters could be derived by assuming a steady-state condition.

Tobacco mosaic virus (TMV)¹ is a rod-shaped virus, 3000 Å long and 180 Å in diameter. Approximately 2130 identical protein subunits of molecular weight of $17\,500$ form a helix, protecting a single 6.4 kb RNA molecule. The refined structure of TMV at 2.9 Å resolution has been described (1). This virus is a much studied model of subunit assembly and disassembly (2). Despite the large number of studies of this virus, at this moment, the thermodynamics of the TMV assembly and denaturation are not well understood. High hydrostatic pressure is an excellent tool to investigate protein-protein interactions since pressures up to 2.5 kbar induce significant dissociation of oligomeric proteins and viruses with few direct effects on protein conformation (3).

Some decades ago, Lauffer and Dow (4) studied the effect of pressure on TMV, observing at 7.5 kbar a pressure inactivation in minutes, with precipitation of a material depleted in nucleic acid after longer periods. Latter studies with the TMV protein coat suggested reversible depolymerization induced by decreasing temperature, with decreasing entropy (5). The direct effect of high pressure on the TMV protein coat demonstrated significant dissociation of helical rods and double disks at 1.5 kbar (6).

The pressure-induced dissociation of proteins follows the following thermodynamic relation:

$$K_p = K_{\text{atm}} \exp(p\Delta V_{\text{dis}}^0/RT) \quad (1)$$

where p is the pressure, ΔV_{dis}^0 is the volume change of dissociation, K_p and K_{atm} are the equilibrium dissociation constants at pressure p and atmospheric pressure, respectively, R is the universal gas constant, and T is the absolute temperature.

The logarithmic form of this equation:

$$\ln K_p = \ln K_{\text{atm}} + p\Delta V_{\text{dis}}^0/RT \quad (2)$$

allows the calculation of K_{atm} and ΔV_{dis}^0 through a plot of $\ln K_p$ as a function of pressure (7).

[†] This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), proc. 93-1395/3; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), proc. 400177/93; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP-UNICAMP) proc. 1036/96.

[‡] We dedicate this paper to the memory of Professor Gregorio Weber.

^{*} Author to whom correspondence should be addressed.

[§] Departamento de Bioquímica.

^{||} Departamento de Físico Química.

[‡] Departamento de Fisiologia Vegetal.

¹ Abbreviations: bis-ANS, bis-(8-anilino-1-naphthalene-1-sulfonate); TMV, tobacco mosaic virus; BMV, brome mosaic virus; CPMV, cowpea mosaic virus.

B Bonafe et al.

Biochemistry

In the present study, we investigated the dissociation of TMV by pressure in the presence of urea and at subzero temperatures. The virus presented structural stability at 2.5 kbar, which was eliminated in the presence of subdenaturing concentrations of urea or at subzero temperatures. Under these latter conditions, there was no detectable denaturation. The apparent thermodynamic parameters of dissociation and denaturation were analyzed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals. All reagents were of analytical grade. Distilled water was filtered and deionized through a Millipore water purification system to 18 M Ω resistance. Unless stated otherwise, the experiments were performed in the presence of standard buffer 0.05 M tris chloride, in 0.150 M NaCl, pH 7.5.

Methods. TMV Purification. The virus was isolated from Turkish tobacco plants infected with the common strain of the virus. The purification method was described previously (8).

Light-Scattering and Fluorescence Studies under Pressure. The high-pressure bomb has been described previously (9). Light-scattering and fluorescence spectra were recorded on a SLM Aminco SPF-500C spectrofluorometer (Urbana, IL).

Light scattering at 340 nm was measured at 90° in the spectrofluorometer by selecting the same wavelengths for both the excitation and emission monochromators. The degree of dissociation α was related to the intensity of light scattering at pressure p , S_p , by

$$\alpha_p = (S_i - S_p)/(S_i - S_f) \quad (3)$$

where S_f and S_i are the intensities of light scattering for dissociated and associated forms, respectively.

Fluorescence spectra at pressure p were calculated by the specification of the center of mass (ν_p).

$$\nu_p = \sum_i \nu_i F_i / \sum_i F_i \quad (4)$$

where F_i stands for the fluorescence emitted at wavenumber ν_i , and the summation is carried out over the range of appreciable values of F . The degree of denaturation at pressure p , $\alpha_{\text{den},p}$, is related to ν_i by the expression

$$\alpha_{\text{den},p} = [1 + Q((\nu_p) - (\nu_{\text{des}}))/((\nu_n) - (\nu_p))]^{-1} \quad (5)$$

where Q is the ratio of the quantum yields of denatured and native forms, ν_p is the center of mass at pressure p , and ν_{des} and ν_n are the corresponding quantities for denatured and native forms (10).

Extrinsic fluorescence studies were performed by using bis-ANS, and the emission spectra were taken with $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 420$ –650 nm.

Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography. High-performance liquid chromatography gel filtration was performed in a prepacked SynChropack GPC 1000 column of 250 $\times$ 4.6 mm i.d., obtained from SynChrom, Inc. (Linden, IN). A Hewlett-Packard series 1050 system was utilized. Typically, a flow rate of 0.3 mL/min was used.

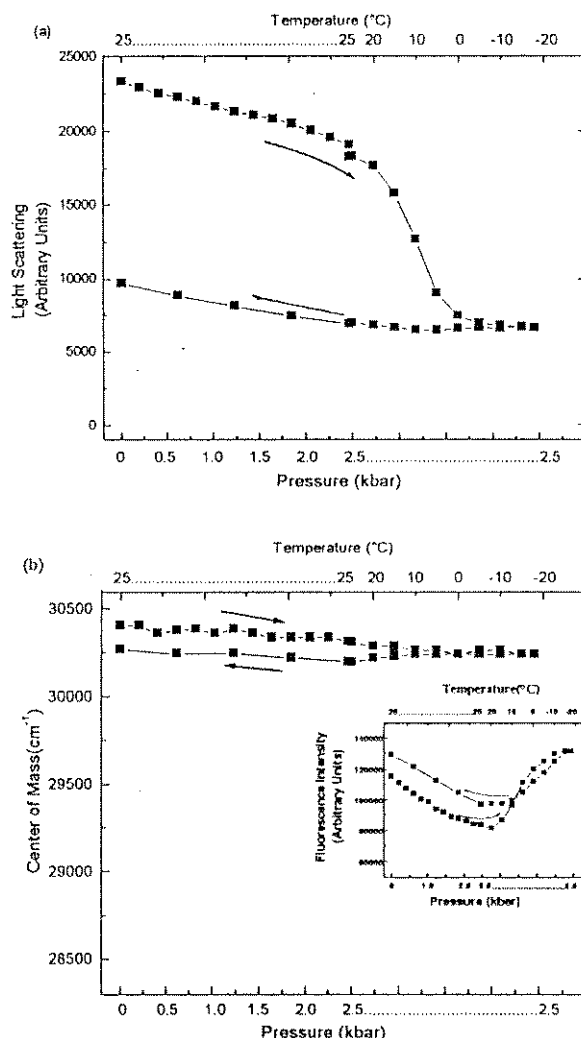


FIGURE 1: Effect of pressure and low temperature on light-scattering and fluorescence properties of TMV. A solution with a viral concentration of 1.0 mg/mL in Tris-Cl buffer, pH 7.5, and 150 mM NaCl was subjected to high pressure, to low temperature at 2.5 kbar and, later, returned to 25 °C and atmospheric pressure. Each spectroscopic data was collected 5 min after the pressure or temperature value had stabilized. The average interval of time needed for the temperature decrease was 15 min, and for the temperature increase, it was but a few minutes. The standard deviations are smaller than the symbols used. (a) Light-scattering intensity at 90° of the incident light, $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm. (b) Center of mass of emission fluorescence spectra, calculated as indicated in the Materials and Methods, eq 4. $\lambda_{\text{ex}} = 285$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 300$ –400 nm. (Inset) Intensity of emission fluorescence spectra.

nm. The void volume (V_0) of the column was measured with purified TMV and the total volume (V_t) with a solution of albumin.

Electron Microscopy. Transmission electron microscopy was performed in a ZEISS CEM-902 equipment. Negative staining was performed with 1% uranyl acetate.

RESULTS

Effect of High Pressure and Low Temperature on TMV

Biochemistry

Tobacco Mosaic Virus Disassembly by Pressure C

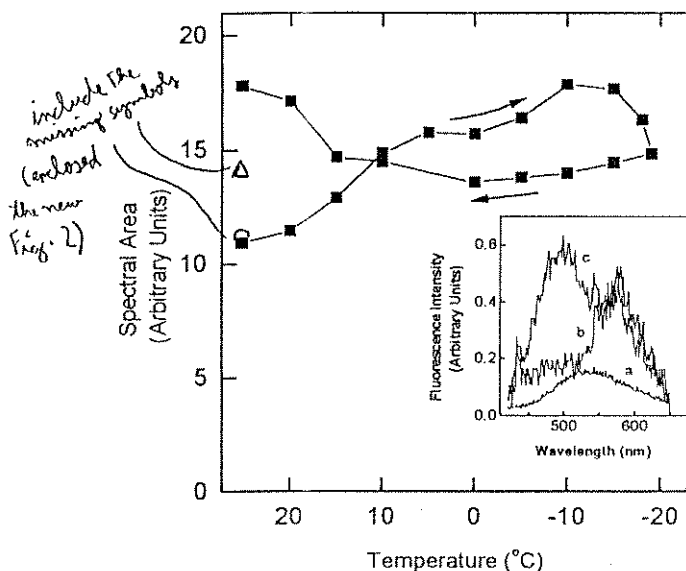


FIGURE 2: Effect of pressure and low temperature on the fluorescence of bis-ANS and TMV, $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ – 650 nm. Open symbols indicate atmospheric pressure, before (O) and after (Δ) the pressure and temperature changes. The standard deviations are smaller than the symbols used. (Inset) Fluorescence emission spectra of $2 \mu\text{M}$ bis-ANS free in solution (a), or in the presence of TMV at atmospheric pressure and 25°C (b), or at 2.5 kbar and -15°C (c). Other conditions were as in Figure 1.

on a 1.0 mg/mL TMV solution in Tris-Cl buffer at pH 7.5 . Light scattering showed a decrease of intensity with pressure and temperature, Figure 1a. The aggregation state of TMV was based on light-scattering intensity (see Materials and Methods) with degree of dissociation α corresponding to 0 for TMV at atmospheric pressure and $\alpha = 100\%$ at 2.5 kbar in the presence of 6.0 M urea. A pressure of 2.5 kbar induced 18% TMV dissociation, and a temperature decrease to -19°C at 2.5 kbar induced a further dissociation to 72% . The return of temperature to 25°C and further return to atmospheric pressure induced poor recovery of light-scattering intensity, suggesting stabilization of dissociated products of TMV at least during the experimental observations. The reversibility was close to 70% when the virus solution was cooled to not less than 0°C (data not shown) and, in the absence of a temperature change, the process was totally reversible (Figure 6a, upper curve, and Figure 6c).

Fluorescence studies indicated negligible red shift of emission spectra, Figure 1b, suggesting no significant denaturation even at conditions where a high degree of dissociation exists (-19°C at 2.5 kbar). This spectroscopic parameter is very informative and is based on the exposure of aromatic residues to the bulk solvent in the denaturation process. The consequence is a red shift due to high dipole-dipole interactions between the excited molecule and the solvent, leading to a decrease in energy emission. Figure 1b, inset, shows the decreasing fluorescence intensity with pressure and further fluorescence intensity increasing as the temperature decreases. These results suggest that the partial dissociation induced by pressure exposes aromatic residues to solvent-promoting quenching through collisions with the solvent molecules. The lowering of temperature should

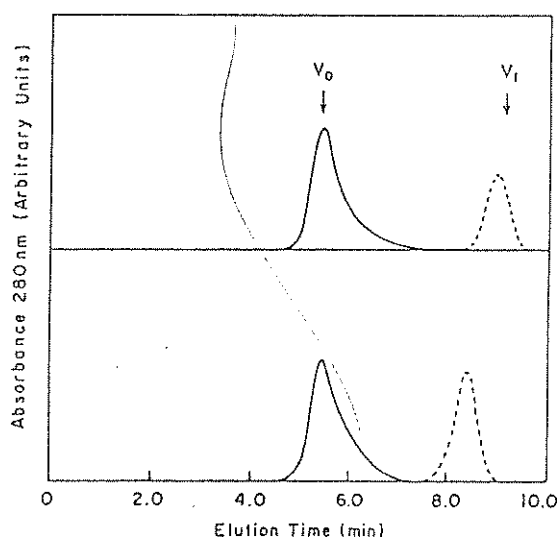


FIGURE 3: Gel filtration analysis of TMV (column Synchropack GPC 1000). (a) Virus incubation at atmospheric pressure (continuous line) and after incubation at 2.5 kbar and -18°C , 1 or 20 days (dashed line). (b) Virus incubation in the presence of 2.5 M urea and atmospheric pressure for 2 days (continuous line), and 2 days after incubation at 2.5 kbar in the presence of 2.5 M urea (dashed line). V_0 and V_1 correspond to dead and final volume of column, that are respectively the elution of native TMV (4×10^7 Da) and albumin (6.6×10^4 Da). Other conditions were as in Figure 1.

The use of bis-ANS as an extrinsic probe showed no detectable changes of the fluorescence intensity with pressure up to 2.5 kbar, Figure 2. Further decreases in temperature promoted increases in the fluorescence signal. This can be due to more interactions between the probe and TMV through exposure of hydrophobic sites or positive residues of coat protein. Figure 2, inset, shows the emission fluorescence spectra corresponding to incubation of the sample at 2.5 kbar and -15°C compared to the control, and of Bis-ANS in water.

Gel filtration chromatography in GPC 1000 of native TMV showed a single peak corresponding to a molecular mass above 10^7 Da, while incubation at 2.5 kbar and -15°C and further return to 25°C and atmospheric pressure (corresponding to the experiments of Figures 1 and 2) showed a peak of low molecular mass, Figure 3a.

Transmission electron microscopy images were in agreement with spectroscopic and gel filtration results. Figure 4a shows the purified TMV and Figure 4b the absence of viral structure after incubation at 2.5 kbar and -18°C . The incubation of TMV at 2.5 kbar at 25°C and return to atmospheric pressure, Figure 4c, also shows the presence of structures compatible with the native form of TMV. The incubation of TMV in the presence of 6.0 M urea at 2.5 kbar, Figure 4d, induced absence of viral structure as the incubation at low temperature.

As will be shown, the apparent volume change of dissociation ΔV_{dis}^0 , -16.3 mL/mol of subunit, can be calculated by plotting $\ln K_d^0$ as a function of pressure (Figure 7b, lower curve). The partial reversibility of TMV dissociation, at least on the observed time scale, indicates that a more appropriate methodology for calculation of the thermodynamic parameters should be considered. We have applied

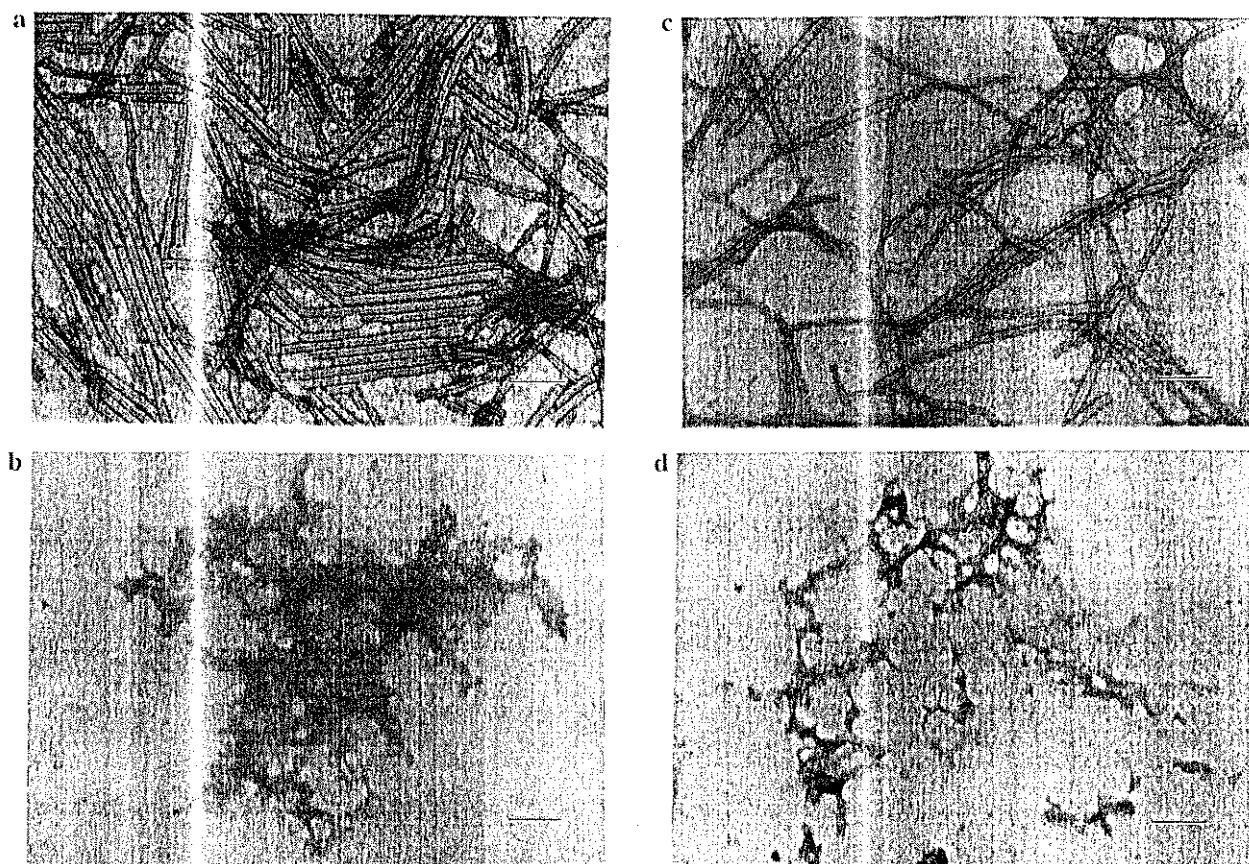
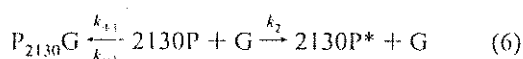


FIGURE 4: Transmission electron microscopy of TMV subjected to pressure and low temperature. TMV (1.0 mg/mL) (a) incubated at atmospheric pressure, (b) after incubation for 1 h at 2.5 kbar and -18°C , (c) 1 day after 1 h incubation at 2.5 kbar and 25°C , and (d) 6.0 M urea and subjected to 2.5 kbar for 1 h. Negative staining: 1% uranyl acetate. Other conditions as in Figure 1. The bar corresponds to 100 nm.

treatment of our data. Assuming the dissociation process of TMV as the following reaction:



where the virion $P_{2130}G$ goes to a reversible dissociation to coat protein P and the genetic material (RNA) G and after to an irreversible step due to a deeper change in conformation of free subunits P^* . This form should not be very different from the native one based on the negligible red shift of the emission fluorescence spectra, like the one observed in the presence of urea, as will be showed further. k_{+1} , k_{-1} , and k_2 are rate constants. The apparent steady state occurred for the dissociation process at least during the time scale of minutes to hours. The relationship of rate constants and degree of dissociation α is given by

$$k_{+1}[(1 - \alpha)C] = (k_{-1} + k_2)(2130 \times \alpha C)^{2130} \alpha C \quad (7)$$

where C is the molar concentration of whole virions. Therefore, the apparent dissociation constant K_p^* at pressure p can be written as

$$K_p^* = k_{+1}/(k_{-1} + k_2) = 2130^{2130} C^{2130} \alpha^{2131}/(1 - \alpha) \quad (8)$$

This consideration is similar to previous approach with

constants determined for reactions close to or at equilibrium (3, 15). The apparent free energy of dissociation calculated from K_p^* became

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = -RT \ln K_p^* \quad (9)$$

Similarly, we can consider viral dissociation by temperature at a given pressure as K_T^* , and the calculation of the apparent thermodynamic parameters is basically the same:

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = -RT \ln K_T^* \quad (10)$$

The apparent enthalpy and entropy of dissociation, respectively ΔH_{dis}^* and ΔS_{dis}^* , can be derived based on the equation

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = \Delta H_{\text{dis}}^* - T\Delta S_{\text{dis}}^* \quad (11)$$

or

$$\Delta G_{\text{dis}}^*/T = \Delta H_{\text{dis}}^*(1/T) - \Delta S_{\text{dis}}^* \quad (12)$$

with the asterisks indicating a steady-state condition instead of equilibrium state. Equation 12 allows the construction of a van't Hoff plot, Figure 5. The calculation of ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{\text{dis}}^*$ at 2.5 kbar gave, respectively, -9.04 and -15.1

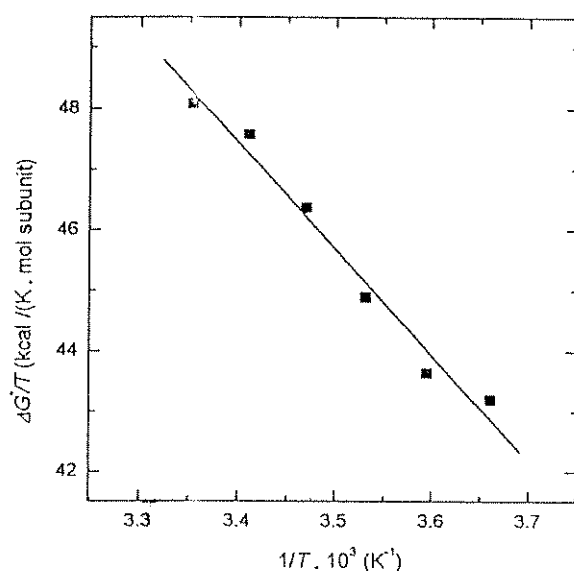


FIGURE 5: van't Hoff plot of TMV dissociation at 2.5 kbar based on the experiments of Figure 1a and eq 12. The values of the degree of dissociation were calculated from eq 3, considering $\alpha = 1$, the light-scattering intensity in the presence of 6.0 M urea and under 2.5 kbar. The standard deviations are smaller than the symbols used.

Values of K_p^* corresponding to lower values of n result in similar numerical results for ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{dis}^*$ per mole of subunit, with no substantial deviation. As an example, we corroborate this for $n = 1000$, $K_p^* = 1000^{1000} C^{1000} \alpha^{1001} / (1 - \alpha)$, which differs by less than 5% in ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{dis}^*$ from the values obtained when $n = 2130$. Thus, even if the irreversible step occurs at lower values of n , the thermodynamic calculations are virtually unaltered.

Effect of High Pressure and Urea at Different Concentrations on TMV. The effect of urea on the TMV subjected to high pressure was followed by light-scattering and fluorescence studies (Figure 6). TMV at atmospheric pressure presented decreasing of light-scattering intensity at 1.0 M urea suggesting deaggregation even at subdenaturing concentrations and at 4.0 M reached a minimum light-scattering intensity corresponding to a high degree of dissociation (Figure 6a, inset). Figure 6a shows that pressure has induced dissociation at different urea concentrations (three upper curves). Since at 4.0 M urea and above the dissociation was near to 100%, there was no additional effect of pressure on the light-scattering intensity. The partial recovery of light-scattering intensity values indicates partial reversibility of the dissociation process.

Fluorescence detection showed that urea up to 2.5 M in concentration did not significantly change the center of mass of emission spectra of TMV (Figure 6b, inset), indicating very little denaturation. These results are expected since urea is usually subdenaturing at this concentration. An approximately maximum red shift in the fluorescence emission was reached at a urea concentration of 6.0 M. The high-pressure effect on the center of mass was especially sensitive in the experiment with 2.5 M urea, Figure 6b, showing clearly the shift from a near native form of coat proteins and partially dissociated TMV to a highly denatured form. The partial recovery of center of mass values indicates a partial reversibility of TMV denaturation. Urea at higher

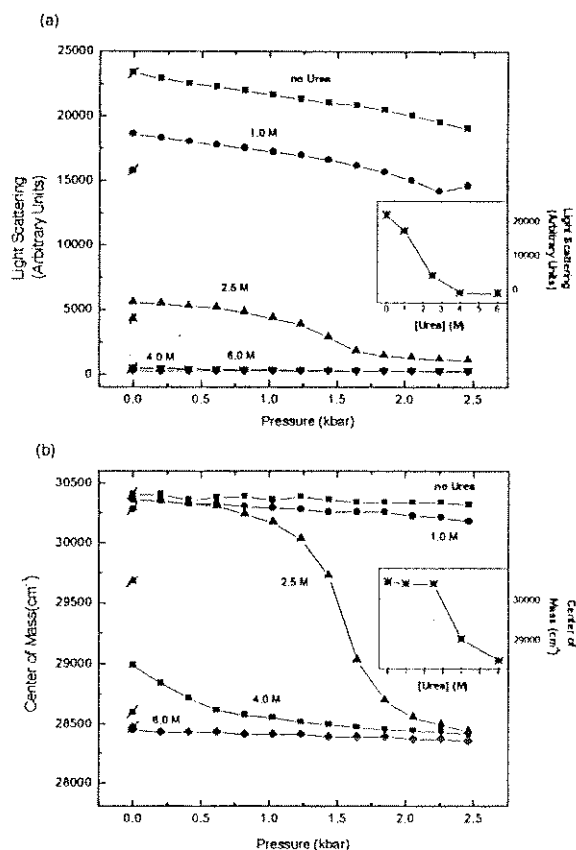


FIGURE 6: Effect of pressure and urea on light-scattering and fluorescence properties of TMV. The cut symbols correspond to effect of urea at atmospheric pressure. (■) Absence of urea and (●) 1.0, (▲) 2.5, (▼) 4.0 and (◆) 6.0 M urea. The standard deviations are smaller than the symbols used. (a) Light-scattering intensity detected as described in the Figure 1a, at different urea concentrations. (inset) Effect of urea concentration on TMV light-scattering at atmospheric pressure. (b) Center of mass of emission fluorescence spectra between 300 and 400 nm, $\lambda_{ex} = 285$ nm, calculated as indicated in the Materials and Methods, eq 4. Effect of urea concentration on TMV center of mass at atmospheric pressure. Other conditions as in Figure 1. Insets: Effect of urea at atmospheric pressure on light scattering (a) and on center of mass of emission fluorescence spectra (b).

concentrations induced a high degree of denaturation already at atmospheric pressure.

The partial reversibility of the denaturation process suggests a more appropriate approach considering a steady-state condition similar to a dissociation process. In this circumstance, the relationship of the apparent denaturation constant by pressure, $K_{den,p}^*$, and the apparent volume change of denaturation, ΔV_{den}^{0*} , analogous to eq 2, is

$$\ln K_{den,p}^* = \ln K_{atm}^* + p\Delta V_{den}^{0*}/RT \quad (13)$$

The ΔV_{den}^{0*} (eq 13) was calculated from the slope of Figure 7a, $\ln K_{den,p}^*$ as a function of pressure, as -103.5 mL/mol subunit.

Analogously, the dissociation process is given by

$$\ln K_p^* = \ln K_{atm}^* + p\Delta V_{dis}^{0*}/RT \quad (14)$$

also based on eq 2. The apparent volume change of dissoci-

F Bonafe et al.

Biochemistry

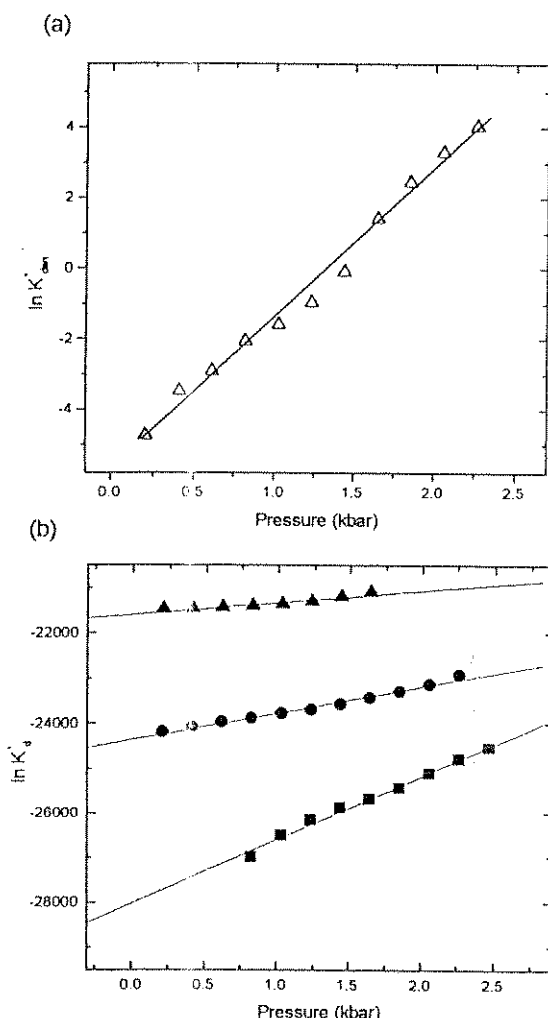


FIGURE 7: (a) Effect of pressure on the denaturation of TMV in the presence of 2.5 M urea, based on center of mass (Figure 6b), curve corresponding to presence of 2.5 M urea. The calculation of $\ln K_{den,p}^*$ versus pressure was based on the experiments of Figure 6b, center of mass data, and on eq 5. (b) Effect of pressure and urea on dissociation of TMV. The calculation of $\ln K_p^*$ versus pressure was based on the experiments of Figure 6, light-scattering data, and on eq 14. (●) Absence of urea and (●) 1.0 M, (▲) 2.5 M urea. The standard deviations are smaller than the symbols used.

Table 1: Apparent Volume Change of Dissociation at Different Urea Concentrations Calculated from Eq 14 and Figure 7b

[urea] (M)	$\ln K_p^*$ atm	ΔV_{dis}^{0*} (mL/mol subunit)
—	-28025	16.3
1.0	-24357	6.77
2.5	-21592	3.07

ation ΔV_{dis}^{0*} and $\ln K_p^*$ can be calculated by plotting the logarithmic form of K_p^* versus pressure (Figure 7b). Table 1 shows ΔV_{dis}^{0*} and $\ln K_{atm}^*$ values calculated for the samples with urea concentrations up to 2.5 M. ΔV_{dis}^{0*} decreases and $\ln K_{atm}^*$ increases with the increase of urea concentration.

Pressure in the absence of urea induced a negligible denaturation process at different viral concentrations from

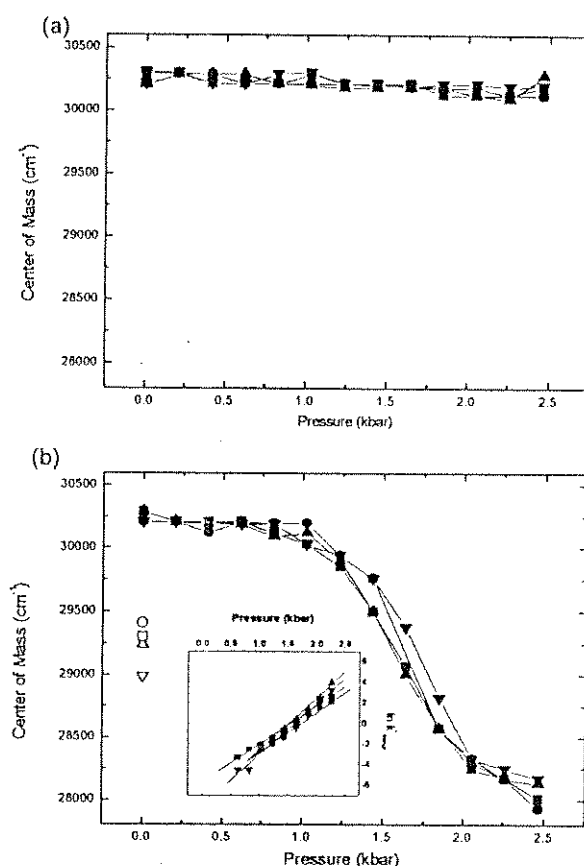


FIGURE 8: (a) Effect of pressure on center of mass of emission fluorescence spectra in different viral concentrations of TMV in the absence of urea. (b) Effect of TMV concentration on the pressure denaturation in the presence of 2.5 M urea, based on center of mass. (Inset) $\ln K_{den,p}^*$ versus pressure based on eq 5. TMV concentration: 0.5 (▲), 1.0 (●), 2.0 (■), and 3.0 mg/mL (▼). The standard deviations are smaller than the symbols used.

0.5 to 3.0 mg/mL, Figure 8a demonstrated through no shift of the center of mass of the emission fluorescence spectra. However, in the presence of 2.5 M urea, there was pressure-induced denaturation, Figure 8b. As expected for a first-order process, there was no concentration dependence on the pressure denaturation. To obtain the ΔV_{den}^{0*} based on eq 13, Figure 8b, inset, shows the $\ln K_{den,p}^*$ as a function of pressure for several TMV concentrations. The $p_{1/2,den}$ value was 1.60 ± 0.08 kbar, and ΔV_{den}^{0*} taken from the slopes of the curves gave a value of 101.0 ± 7.3 mL/mol subunit.

Decreasing the temperature down to -10°C at 2.5 kbar did not induced the denaturation process in the presence of urea up to 1.0 M, Figure 9a. At higher urea concentrations, denaturation was observed upon decreasing the temperature. Figure 9b shows the van't Hoff plot at a pressure of 2.5 kbar in the presence of 1.75 M urea. The values for apparent enthalpy (ΔH_{den}^*) and entropy of denaturation ($T\Delta S_{den}^*$) were -11.1 and -10.2 kcal/mol subunit, respectively [$\Delta S_{den}^* = -36.3$ cal/(K mol of subunit)].

The effect of urea on TMV was also monitored by extrinsic fluorescence from bis-ANS (not shown). The interaction of virus with this probe was more intense at urea concentrations between 2.5 and 4.0 M.

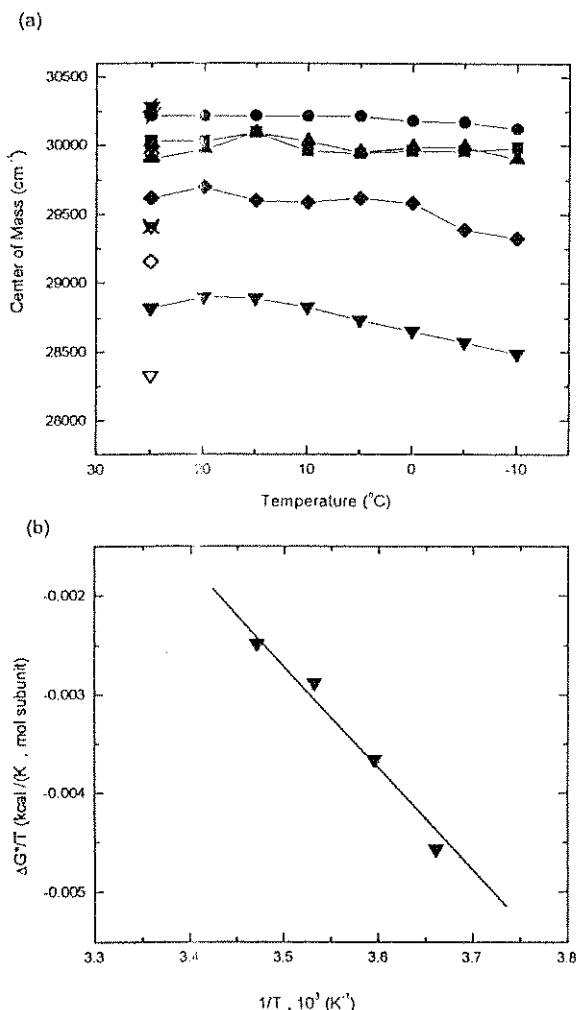


FIGURE 9: (a) Effect of temperature on center of mass of emission fluorescence spectra at 2.5 kbar and different urea concentrations. (●) Absence of urea and (■) 0.5, (▲) 1.0, (◆) 1.5, and (▼) 1.75 M urea. (Cut symbols) Samples at initial conditions at atmospheric pressure. (Open symbols) return to 25 °C at 2.5 kbar. (Crossed symbols) return to atmospheric pressure. TMV concentration: 1.0 mg/mL. (b) van't Hoff plot of TMV denaturation at 2.5 kbar and 1.75 M urea based on the experiment of panel a. The values of the degree of denaturation were calculated from eq 5, considering $\alpha_{\text{den}} = 1$, the center of mass in the presence of 6.0 M urea and under 2.5 kbar. The standard deviations are smaller than the symbols used.

Gel filtration analysis showed that 2.5 M urea incubation of TMV does not promote dissociation to molecular masses lower than 10^7 Da, which corresponds to the exclusion volume of column. TMV incubated at 2.5 kbar in the presence of 2.5 M urea presented elution corresponding to lower molecular masses (Figure 3b).

The transmission electron microscopy showed that urea at 2.5 M promoted some TMV deaggregation at atmospheric pressure (Figure 10, panels a and b), and pressure incubation resulted in significantly more dissociated viral structures (Figure 10, panels c and d). The incubation in the presence of 6.0 M urea at 2.5 kbar promoted extreme viral dissociation based on structural images (see Figure 4d).

DISCUSSION

High Pressure on TMV: Little Dissociation. The incubation of TMV at pressures up to 2.5 kbar resulted in only 18% dissociation with negligible changes in the emission fluorescence spectra, indicating very little denaturation of subunits under these conditions. The extrinsic fluorescence studies with bis-ANS also demonstrated the absence of important changes in the tertiary structure of the coat protein, since there was no detectable difference between the fluorescence intensity of the probe at 2.5 kbar and atmospheric pressure. The transmission electron microscopy images of previously pressurized virus showed the same pattern as the native TMV.

The absence of RNA enormously decreases the stability of TMV, favoring pressure dissociation. TMV protein coat as double disks (10 mg of protein/mL) dissociates in the pressure range 0.1–0.5 kbar at 25.0 °C in pH 7.0 phosphate buffer (6). Helical rods (2.2 mg of protein/mL) did undergo dissociation in the range 0.1–0.6 kbar at 26.2 °C or 0.2–1.0 kbar at 29.7 °C in pH 6.5 phosphate buffer, with 50% dissociation, $(p_{1/2})_0 = 0.4$ kbar, and a volume change of dissociation (ΔV_{dis}^0) of about 86 mL/mol subunit. These data allow the estimation of the apparent free energy of stabilization given by viral RNA, based on the following equation (adapted from ref 16):

$$\Delta \Delta G_{\text{dis}}^* = -[(p_{1/2}^*)_R \Delta V_{\text{dis},R}^*/n - (p_{1/2})_0 \Delta V_{\text{dis}}^0/n] \quad (15)$$

where $(p_{1/2}^*)_R$ is the midpoint for pressure dissociation of the virion, that corresponds to about 7.0 kbar (extrapolation data, Figure 7b, lower curve), $\Delta V_{\text{dis},R}^*/n$ the apparent volume change of virion dissociation, calculated as -16.3 mL/mol subunit. The calculation of the apparent free energy of stabilization is -1.7 kcal/mol subunit, although there were some differences of pH and protein concentration between these experiments that, if corrected, should increase the apparent free energy of stabilization by RNA. The whole viral particle corresponds to an apparent free energy of stabilization of 3600 kcal/mol TMV.

The study of the icosahedral virus brome mosaic virus (BMV) (0.06 mg of virus/mL) presented a red shift in the emission fluorescence spectra of aromatic residues and significant changes in the interaction with bis-ANS at high pressure and on transmission electron microscopy during and after high-pressure incubation (17). Other icosahedral viruses, such as R17 bacteriophage (18) and cowpea mosaic virus (CPMV) (16) presented higher stability at high pressure. In the latter investigation, the important role of RNA on the stabilization of viral particle was shown by comparison of properties between purified coat protein and virus. The value of the free energy of stabilization was calculated as 0.988 kcal/mol subunit, which corresponds to a magnitude similar to TMV.

Namba et al. (1) have described the interaction of TMV protein coat and RNA based on X-ray fiber diffraction methods at 2.9 Å resolution. The phosphate groups are, in general, neutralized by arginine residues. Hydrophobic interactions occur between the bases and the protein, as well base-specific hydrogen bonds with the protein. The important energy of stabilization in TMV due to presence of RNA should be related to those interactions.

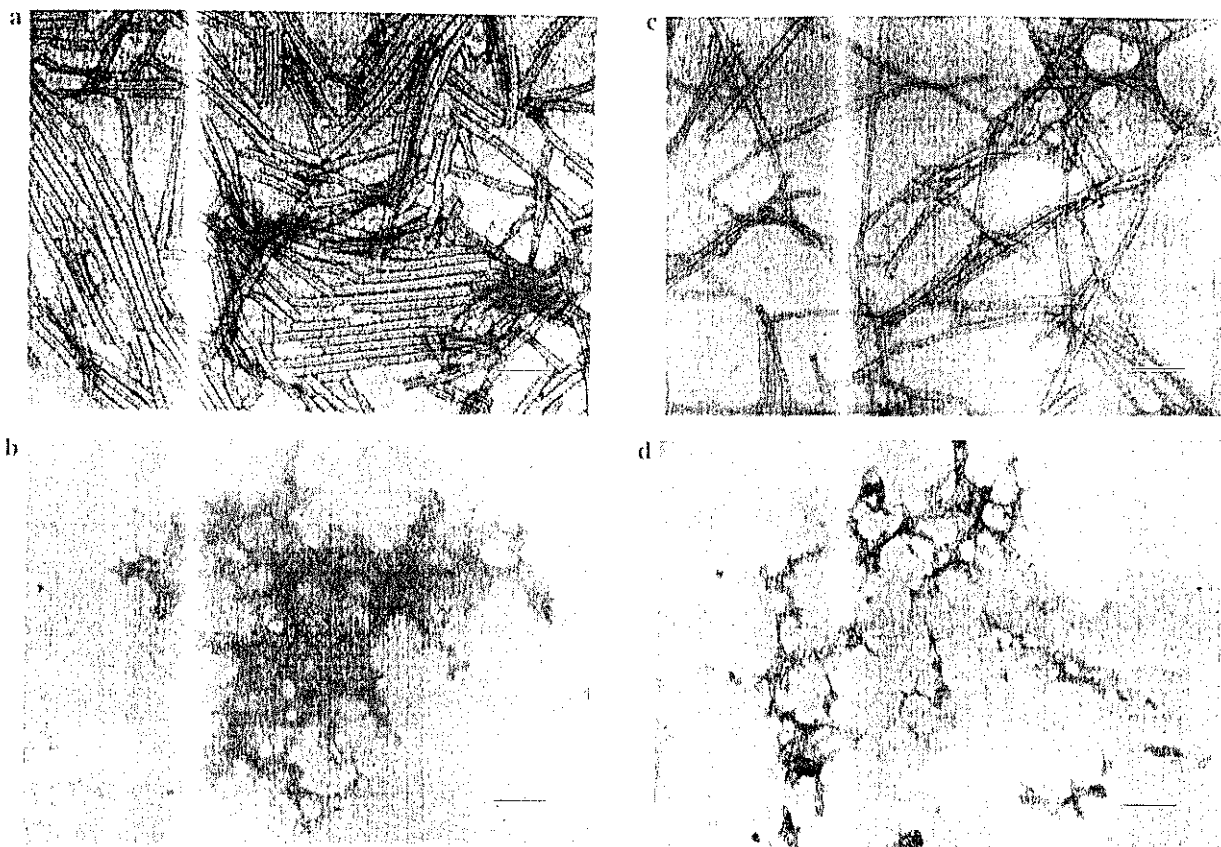
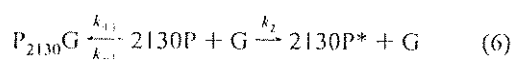


FIGURE 4: Transmission electron microscopy of TMV subjected to pressure and low temperature. TMV (1.0 mg/mL) (a) incubated at atmospheric pressure, (b) after incubation for 1 h at 2.5 kbar and -18°C , (c) 1 day after 1 h incubation at 2.5 kbar and 25°C , and (d) 6.0 M urea and subjected to 2.5 kbar for 1 h. Negative staining: 1% uranyl acetate. Other conditions as in Figure 1. The bar corresponds to 100 nm.

treatment of our data. Assuming the dissociation process of TMV as the following reaction:



where the virion $P_{2130}G$ goes to a reversible dissociation to coat protein P and the genetic material (RNA) G and after to an irreversible step due to a deeper change in conformation of free subunits P^* . This form should not be very different from the native one based on the negligible red shift of the emission fluorescence spectra, like the one observed in the presence of urea, as will be showed further. k_{+1} , k_{-1} , and k_2 are rate constants. The apparent steady state occurred for the dissociation process at least during the time scale of minutes to hours. The relationship of rate constants and degree of dissociation α is given by

$$k_{+1}[(1-\alpha)C] = (k_{-1} + k_2)(2130 \times \alpha C)^{2130} \alpha C \quad (7)$$

where C is the molar concentration of whole virions. Therefore, the apparent dissociation constant K_p^* at pressure p can be written as

$$K_p^* = k_{+1}/(k_{-1} + k_2) = 2130^{2130} C^{2130} \alpha^{2131}/(1-\alpha) \quad (8)$$

This consideration is similar to previous approach with cowpea mosaic virus (CPMV) (14) and similar to dissociation

constants determined for reactions close to or at equilibrium (3, 15). The apparent free energy of dissociation calculated from K_p^* became

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = -RT \ln K_p^* \quad (9)$$

Similarly, we can consider viral dissociation by temperature at a given pressure as K_T^* , and the calculation of the apparent thermodynamic parameters is basically the same:

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = -RT \ln K_T^* \quad (10)$$

The apparent enthalpy and entropy of dissociation, respectively ΔH_{dis}^* and ΔS_{dis}^* , can be derived based on the equation

$$\Delta G_{\text{dis}}^* = \Delta H_{\text{dis}}^* - T\Delta S_{\text{dis}}^* \quad (11)$$

or

$$\Delta G_{\text{dis}}^*/T = \Delta H_{\text{dis}}^*(1/T) - \Delta S_{\text{dis}}^* \quad (12)$$

with the asterisks indicating a steady-state condition instead of equilibrium state. Equation 12 allows the construction of a van't Hoff plot, Figure 5. The calculation of ΔH_{dis}^* and $T\Delta S_{\text{dis}}^*$ at 2.5 kbar gave, respectively, -9.04 and -15.1 kcal/mol subunit [$\Delta S_{\text{dis}}^* = -52.6$ cal/(K mol of subunit)].

duces some imprecision due to the fact that we are not dealing with a pure equilibrium, the results are undoubtedly correct in both sign and order of magnitude.

The dissociation and denaturation effect of pressure combined with subdenaturing concentration of urea and its reversibility were observed in other protein aggregates (16, 18). Da Poian et al. (14) demonstrated the dissociation/denaturation of CPMV by decreasing the temperature to -18°C when the virus is incubated at 2.5 kbar in up to 1.0 M urea concentrations, following the red shift of the center of mass of fluorescence spectra. These results were taken as a dissociation process in the calculation of thermodynamic parameters, since dissociation and denaturation occurred concurrently. For TMV these processes could be separated.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Prof. Jerson Lima da Silva and Prof. Martha Sorenson and Prof. Carol H. Collins for helpful suggestions.

REFERENCES

1. Namba, K., Pattanayek, R., and Stubbs, G. (1989) *J. Mol. Biol.* 208, 307–325.
2. Wu, X., and Shaw, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 29981–2984.
3. Silva, J. L., and Weber, G. (1993) *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44, 89–113.
4. Lauffer, M. A., and Dow, R. B. (1941) *J. Biol. Chem.* 140, 509–518.
5. Lauffer, M. A., Ansevin, A. T., Cartwright, T. E., and Brinton Jun, C. C. (1958) *Nature* 181, 1338–1339.
6. Jaenicke, R., Lüdemann, H.-D., and Schade, B. C. (1981) *Biophys. Struct. Mech.* 7, 195–203.
7. Ruan, K., and Weber, G. (1988) *Biochemistry* 27, 3295–3301.
8. Asselin, A., and Zaitlin, M. (1978) *Virology* 91, 173–181.
9. Paladini, A. A., and Weber, G. (1981) *Rev. Sci. Instrum.* 52, 419–427.
10. Silva, J. L., Villas-Boas, M. S., Bonafe, C. F. S., and Meirelles, N. C. (1989) *J. Biol. Chem.* 262, 15863–15868.
11. Denbigh, K. G. (1951) *The Thermodynamics of the Steady-State*, Methuen and Co., Ltd., and John Wiley and Sons, Inc., London and New York.
12. de Groot, S. R. (1951) *Thermodynamics of Irreversible Processes*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
13. Lavenga, B. H. (1978) *Thermodynamics of Irreversible Processes*, The Macmillan Press Ltd., London.
14. Da Poian, A. T., Oliveira, A. C., and Silva, J. L. (1995) *Biochemistry* 34, 2672–2677.
15. Bonafe, C. F. S., Araujo, J. R., and Silva, J. L. (1994) *Biochemistry* 33, 2651–2660.
16. Da Poian, A. T., Johnson, J. E., and Silva, J. L. (1994) *Biochemistry* 33, 8339–8346.
17. Silva, J. L., and Weber, G. (1988) *J. Mol. Biol.* 199, 149–159.
18. Da Poian, A. T., Oliveira, A. C., Gaspar, L. P., and Silva, J. L. (1993) *J. Mol. Biol.* 231, 999–1008.
19. Weber, G. (1993) *J. Phys. Chem.* 97, 7108–7115.
20. Privalov, P. L., and Makhatazdz, G. I. (1993) *J. Mol. Biol.* 232, 660–679.
21. Buzzel, A. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 1636–1641.
22. Buzzel, A. (1962) *Biophys. J.* 2, 223–233.
23. Blowers, L. E., and Wilson, T. M. A. (1982) *J. Gen. Virol.* 61, 137–141.
24. Bonafe, C. F. S., Villas-Boas, M. S., Suarez, M. C., and Silva, J. L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13210–13216.
25. Robinson, C. R., and Sliagar, S. G. (1995) *Methods Enzymol.* 259, 395–427.

BI980349N