



Estudis fisicoquímics de diferents seqüències peptídiques del virus de l'Hepatitis G

Maria Teresa Alay Romero



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT
FARMÀCIA

DEPARTAMENT
FISICO QUÍMICA

ESTUDIS FISICOQUÍMICS DE DIFERENTS SEQÜÈNCIES
PEPTÍDIQUES DEL VIRUS DE L'HEPATITIS G.

MARIA TERESA ALAY ROMERO 2014

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FÍSICO QUÍMICA
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE
MEDICAMENTS

ESTUDIS FÍSICOQUÍMICS DE DIFERENTS SEQÜÈNCIES
PEPTÍDIQUES DEL VIRUS DE L'HEPATITIS G.

Memòria presentada per Maria Teresa Alay Romero per optar
al títol de doctor per la universitat de Barcelona

Maria Antònia Busquets i Viñas
Directora

Josefa Prat i Aixalà
Directora

Maria Teresa Alay Romero
Doctorand

María Luisa García López
Tutora

Agraïments

No puc dir que sembla ahir quan vaig decidir començar aquesta tesi, perquè no ho sembla.

Perquè ha passat molt de temps des d'aquell moment, perquè he hagut de créixer, i perquè moltes circumstàncies m'han fet créixer, i han fet créixer, que no envellir, a tots aquells que van començar amb mi aquesta aventura. Han crescut aquells que m'han acompanyat i que per una raó o una altre ara no hi són, i aquells que han aparegut els últims anys i encara m'encoratgen...

Més a prop o més lluny, més eufòrica o més desanimada, sempre, d'una forma o altre, he romàs al Departament de fisicoquímica. I d'una forma o altre m'he mantingut en contacte amb molts amics, tutors, mentors, estimats..., què han compartit aquest camí a vegades desert, a vegades florit, a vegades solitaris, a vegades ple d'amics, i fins i tot inexistent, però al final del tot recuperat.

Finalment, jo estic molt feliç, perquè com deia Louis L'Amour "Allò important no és la fi del camí, si no el camí. Qui viatja massa apressa es perd l'essència del viatge".

Aquesta travessa ha estat una de les més importants de la meua vida, més que pel seu resultat o pels resultats acadèmics adquirits, perquè aquesta m'ha acompanyat d'una forma discreta però vital, al llarg dels anys més importants en quan a creixement personal i coneixement de mi mateixa. Per aquest motiu, aquest agraïments no estan únicament dedicats a aquells individus que m'han fet créixer professionalment, sinó que també són directament proporcionals a aquelles persones que ha tingut influència en la meua manera de veure i viure la vida.

Tot això, m'agradaria agrair-ho:

Als meus pares que em van recolzar de tot cor en el seu moment per a que realitzés aquesta tesis. Ells van estar al meu costat des de l'inici, i sempre sense intervenir d'una forma incisiva, i malgrat els problemes que tinguessin, em van protegir, encoratjar i acompanyar per a què fes aquest

treball. A ells, segur, els hagués agradat veurem en el dia de la lectura, tant o més que en altres situacions de la meua vida en les que, malauradament, no han pogut estar.

A la meua tia Mari, al Xavier i a l'Amaia, per tots els moments que hem compartit i seguirem compartint i que sens dubte ens enfortiran com sempre ho han fet.

A la Dra. Asunción Alsina, que amb la seva alegria, incentivació, insistència i força constants ha fet que aquesta tesi fos possible.

A l'Enric, li agraeixo la seva forma de ser, que actualment valoro molt i envejo, i la seva vitalitat i manera de pensar. Sense ell segur que mai m'hagués ficat en aquesta aventura. I a la seva mare, a tots dos, els quals han viscut, patit i sofert aquesta tesi i part de les seves conseqüències més que ningú.

A les directores d'aquest treball. A la Dra. Maria Antonia Busquets, per ser una guia, una mentora, un ajut incomparable, i sobretot per ser la meua "estimada" amiga. A la Dra. Josefina Prat, pel seu recolzament incondicional, la seva visió positiva, la seva energia i ganes de treballar i la seva inestimable estima.

Al Dr. Joan Estelrich, amb el qui com deia Miguel Hernández, "con quién tanto quería", atès que ell, amb el seu imponderable acompanyament i el coneixement que té sobre temes fisicoquímics i no fisicoquímics, m'ha fet estimar la història, la fisicoquímica de la xocolata, la fluorescència i la ciència.

A la Dra. Vicky Girona, perquè ella va ser el motor precursor d'aquest treball i gràcies a ella també ha estat possible la seva continuació.

A les Doctores Montserrat Pujol, Montserrat Muñoz, Yolanda Cajal, Conxita Mestres, Tere Montero, al Dr. Jordi Hernández i a la resta del Departament de Fisicoquímica, pels bons moments, tertúlies, tasques i penes dels que hem participat.

A la Dra. Núria Cortadelles pel treball conjunt que vam realitzar en microscòpia electrònica, malgrat els pocs resultats que vam obtenir.

Als companys de la Unitat de Laboratoris Docents (ULD): Lluís Alzina, Lúcia, Visi, les dues Trinis i en Jordi Rourera. Per l'invaluable suport, alegria i bons moments que hem passat junts, i perquè tots sense ells això tampoc hagués estat possible.

A tots els amics i col·legues del laboratori, molts d'ells ja doctors, amb

els que ens hem anat trobant al llarg d'aquests anys. Adrià, Raimon, Carles, Axel, Alba, Carmeta, Eli, Helena, Konrad, Ignasi i Titi. Amb ells he compartit sopars inoblidables, tastets de vins deliciosos, problemes sentimentals, canvis de parelles, primers pisos, canvis de feina, naixements de fills i moltes altres situacions, que espero seguim compartint.

A la Roser, la institució del Departament de Fisicoquímica, amb la que durant anys vam viure conjuntament penes i alegries, i aquells moments en companyia de la seva filla.

Als meus amics de tot arreu, aquells que sovint em pregunten per aquesta tesi des de les illes d'Escòcia, les muntanyes de Japó, els castells de Romania, les platges de Tailàndia, com bolets dels boscos del Montseny o al costat de casa meva...

I molt especialment al Llorenç, que durant aquests darrers anys m'ha estimat, suportat, recolzat, asserenat, i il·luminat amb la seva particular forma de veure la vida, totalment clara, neta, simple i bonica. I a més a més, m'ha ajudat en la redacció i format d'aquesta tesi. Ell m'ha acompanyat en aquest, i altres processos de creació, que actualment ens ocupen i enriqueixen el dia a dia.

Índex

I. INTRODUCCIÓ	19
1. Hepatitis: Etiologia, agents causals i vies de transmissió . . .	20
2. Hepatitis G: HGV o GBV-C	20
3. Relació entre el Virus de la immunodeficiència humana (VIH) i el GBV-C	23
4. Interès dels pèptids sintètics de l'embolcall de GBV-C . . .	24
5. Models de Membrana	24
5.1. Monocapes lipídiques.	25
5.2. Tècniques de caracterització de les interaccions mo- leculars lípid-pèptid mitjançant monocapes	28
5.2.1. Cinètiques de penetració	28
5.2.2. Isotermes de compressió	29
5.2.3. Estudis amb isotermes de compressió: Mo- nocapes mixtes	32
5.3. Bicaptes: Liposomes	33
5.4. Tècniques de caracterització de les interaccions mo- leculars lípid-pèptid mitjançant liposomes	36
5.4.1. L'espectroscòpia UV-visible tècnica a per a l'estudi de la interacció lípid-pèptid	36
5.4.2. La fluorescència com a tècnica espectroscòpica per a l'estudi de la interacció lípid-pèptid	37
5.4.2.1. Fusió de membranes: Transferència d'Energia per Ressonància	38
5.4.2.2. Polarització de fluorescència	39
5.4.2.3. Assaig d'alliberació de continguts vesiculars	41
5.4.3. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)	42
6. Estudis conformacionals: Espectroscòpia de dicromisme circu- lar (CD)	44

II. OBJECTIUS	49
III. RESULTATS	53
IV. DISCUSSIÓ	97
1. Selecció de pèptids	98
2. Selecció de lípids	99
3. Estudis d'activitat superficial dels pèptids	100
4. Efecte dels pèptids en monocapes	102
4.1. Cinètiques de penetració	102
4.2. Isotermes de compressió	103
4.3. Isotermes mixtes: Estudis de miscibilitat	104
5. Efecte del pèptids en bicapes	107
5.1. Espectroscòpia UV-Visible	107
5.2. Espectroscòpia de fluorescència	111
5.2.1. Fluorescència intrínseca	111
5.2.2. Fluorescència amb MC ₅₄₀	112
5.2.3. Anisotropia amb MC ₅₄₀ , DPH i TMA-DPH	112
5.2.4. Transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET)	116
6. Estudis conformacionals: Dicroisme Circular	118
V. CONCLUSIONS	121
VI. BIBLIOGRAFIA	125

Índex de figures

I.1.	Model de l'estructura del virus GBV-C.	22
I.2.	Poliproteïna del virus de l'hepatitis G	22
I.3.	Disposició de les molècules en la monocapa d'adsorció . . .	26
I.4.	Disposició de les molècules en la monocapa d'extensió . . .	27
I.5.	Esquema d'un experiment de cinètiques de penetració a àrea constant	28
I.6.	Esquema d'un experiment de penetració a pressió constant	29
I.7.	Isoterma de compressió	30
I.8.	Representació gràfica dels estats de les capes monomoleculars en una interfície aire/aigua	31
I.9.	Estructura dels liposomes.	34
I.10.	Esquema de l'assaig de transferència d'energia per ressonància.	38
I.11.	Esquema de funcionament de la tècnica de polarització de fluorescència.	40
I.12.	Estructura química i localització en la bicapa	41
I.13.	Determinació de la permeabilització de vesícules lipídiques.	42
I.14.	Esquema de la transició de fase dels fosfolípids	43
I.15.	Espectres de dicroisme circular de las estructures que es troben en proteïnes i pèptids.	47
IV.1.	Activitat superficial de les seqüències peptídiques E2 (125-139) i E2 (120-139)	101
IV.2.	Variació de la pressió superficial dels pèptis E2 (120-139) i E2 (125-139) en funció de la pressió inicial	102
IV.3.	Isotermes de compressió dels pèptids.	104
IV.4.	Isotermes mixtes per a E2 (125-139) i E2 (120-139)/fosfolípid a diferents relacions molars	105
IV.5.	Valors d'àrea molecular en funció de la fracció molar de pèptid.	106
IV.6.	Valors de la variació de l'Energia de Gibbs de barreja en funció de la fracció molar de pèptid.	107

IV.7. Espectre d'absorció de SUVs de MC ₅₄₀ -DPPC abans i després d'afegir E2 (125-139)	109
IV.8. Espectre d'absorbància de MC ₅₄₀ /DPPC (1:300) en presència de 12 μ m E2 (125-139) en funció de la temperatura.	110
IV.9. Canvis en l'anisotropia de DPH i TMA-DPH en front a la temperatura	115
IV.10 Percentatge de barreja de lípids respecte la relació molar de pèptid E (99-118)/ lípid.	117

Índex de taules

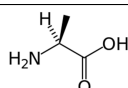
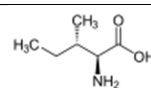
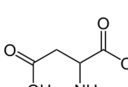
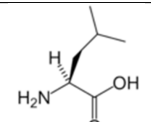
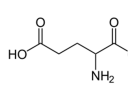
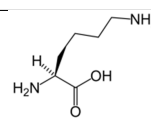
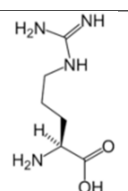
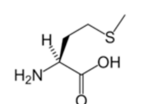
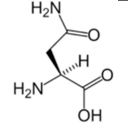
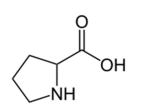
I.1. Valors del mòdul de compressibilitat a diferents estats de la monocapa	32
I.2. Descripció dels tipus de liposomes, mida, propietats i aplicacions.	35
IV.1. Característiques dels fosfolípids emprats en la present tesi. En tots els casos, les cadenes hidrocarbonades estan saturades.	99
IV.2. Pressió màxima d'inserció dels lípids en monocapes de DPPC, DPPG i DPTAP.	103
IV.3. Coeficient de partició i relació entre intensitats a diferents temperatures i per liposomes de diferents composicions. . .	112
IV.4. Resum dels resultats d'anisotropia de fluorescència per a les distintes sondes i seqüències peptídiques.	116

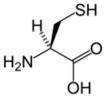
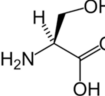
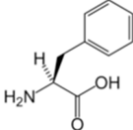
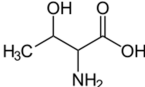
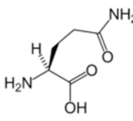
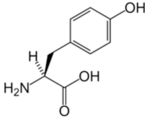
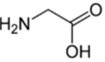
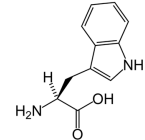
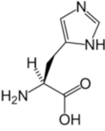
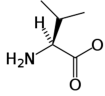
Abreviatures, acrònims i símbols

A	Absorbància
AA	Aminoàcid
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
Anti-E2	Anticossos anti proteïna E2
ANTS	Àcid 8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic
CD	Dicroisme circular
DSC	Calorimetria diferencial de rastreig
ΔH	Increment d'entalpia
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DMTAP	Dimiristoiltrimetilpropilamonio
DPX	Bromur de N, N'-p-xilenobis (piridini)
$\Delta T_{1/2}$	Amplitud del pic del termograma en el punt mitjà
ϵ	Coefficient d'absortivitat molar
EDT	1,2-Etanoditiol
ELISA	Assaig immunoenzimàtic
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
GBV-A	GB virus A
GBV-B	GB virus B
GBV-C/HGV	Hepatitis G virus
HAV	Hepatitis A virus
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hepatitis C virus
HDV	Hepatitis D virus
HEV	Hepatitis E virus
HGV	Hepatitis G virus
Hepes	Àcid N-(2-hidroxiètil) piperacina-N'-(2-etanosulfònic)

HFIP	Hexafluoroisopropanol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
λ	Longitud d'ona
LUVs	Vesícules unilamel·lars grans
MC ₅₄₀	Merocianina 540
MLVs	Vesícules multilamel·lars
NBD-PE	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) -1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PBS	Dissolució amortidora de fosfats
PC	Fosfatidilcolina
PG	Fosfatidilglicerol
POPC	Palmitoiloleoilfosfatidilcolina
POPG	Palmitoiloleoilfosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
RET	Transferència d'energia per ressonància
Rho-PE	Rodamina B 1,2-dihexaetanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SFV	Semliki Forest virus
SIDA	Síndrome de la immunodeficiència humana adquirida
SUVs	Vesícules unilamel·lars petites
tBu	Alcohol terc-butil
TFA	Àcid trifluoroacètic
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilà
T_m	Temperatura de transició de gel a cristall líquid
UV-VIS	Espectroscòpia ultraviolada-visible
HIV	Virus de la immunodeficiència humana

Aminoàcids, Abreviatura i estructura

Aminoàcid			Estructura	Aminoàcid			Estructura
Alanina	Ala	A		Isoleucina	Ile	I	
Àcid aspàrtic	Asp	D		Leucina	Leu	L	
Àcid glutàmic	Glu	E		Lisina	Lys	K	
Arginina	Arg	R		Metionina	Met	M	
Asparagina	Asn	N		Prolina	Pro	P	

Aminoàcid			Estructura	Aminoàcid			Estructura
Cisteïna	Cys	C		Serina	Ser	S	
Fenilalana	Phe	F		Treonina	Thr	T	
Glutamina	Gln	Q		Tirosina	Tyr	Y	
Glicina	Gly	G		Triptòfan	Trp	W	
Histidina	His	H		Valina	Val	V	

I. INTRODUCCIÓ

1. Hepatitis: Etiologia, agents causals i vies de transmissió

L'hepatitis és una malaltia inflamatòria que afecta el fetge. La seva etiologia pot ser d'origen infecció (viral o bacteriana), immunitari (per autoanticossos, hepatitis autoimmune) o tòxic (per alcohol, verins o fàrmacs, entre d'altres). També és considerada, depenent de la seva etiologia, una malaltia de transmissió sexual. Pel que fa a les hepatitis d'origen infecció, el grup de virus que les causen anomenats virus hepatotrops, són aquells que només provoquen hepatitis. Fins a la data actual se'n coneixen 6 tipus: A, B, C, D, E, F i G (Bradley et al. 1993). Els més importants són els A, B, C i, en menor mesura, el D i l'E, sent F i G els últims descrits i els menys estudiats.

Les vies de transmissió de les hepatitis de tipus viral, depenen de l'espècie del virus que les causa. Els A (HAV) i E (HEV) tenen una transmissió de tipus fecal-oral; els B (HBV) i D (HDV) parenteral (transfusions, ferides, xeringues contaminades) o per contacte sexual.

El virus C (HCV) també es transmet per via parenteral, sobretot per contaminació amb sang infectada (ocasiona el 90% de les hepatitis post transfusió). El D, es considera defectuós perquè necessita el virus de l'hepatitis B per a existir. El virus causant de la forma G es coneix poc i es creu que es transmet a través de la sang, sobretot en persones que usen drogues endovenoses, i en persones que presenten altres malalties i tractaments. Finalment, el virus de l'hepatitis F, és el més recent i podria ser una variant del virus G.

2. Hepatitis G: HGV o GBV-C

A principis dels anys 90, tot i el coneixement dels virus causants d'hepatitis encara hi havia moltes hepatitis classificades com a no-A, no-E. Entre elles es va descobrir de forma simultània per dos laboratoris diferents el virus de l'hepatitis G, que va ser anomenat GB virus C (GBV-C) i hepatitis G virus (HGV), respectivament.

El grup que li va donar el primer dels noms va clonar i seqüenciar dos nous *Flavivirus* (GBV-A i GBV-B) aïllats de tamarindes inoculats prèviament amb sèrum procedent d'un pacient les inicials del qual eren GB i que patia

una hepatitis no-A no-E. Mitjançant proves immunoenzimàtiques realitzades a partir de proteïnes recombinats procedents d'aquests virus, es va identificar en altres persones seropositives, en les que tampoc no es va poder demostrar la infecció amb GBV-A o GBV-B, però si la presència d'un nou *Flavivirus*, inicialment anomenat GBV-C (Simons, 1995). L'altre grup d'investigadors va publicar la seqüència genètica d'un virus ARN relacionat amb l'hepatitis, al que van anomenar virus de l'hepatitis G (VHG) (Linnen et al., 1996). La comparació de les seqüències genètiques del virus GBV-C i del VHG va mostrar una homologia del 96%, el que indicava que eren dues soques del mateix virus (Halasz et al., 2001).

La principal via de transmissió del GBV-C és a través de la sang o dels seus derivats. L'elevada exposició a productes relacionats amb la sang en pacients en hemodiàlisi, trasplantats d'òrgans o en persones amb addicció a drogues planteja el gran risc d'adquirir aquest virus. Altres possibles vies d'infecció poden ser els contactes sexuals o la transmissió vertical mare fill. La infecció amb el GBV-C és freqüent i es pot identificar mitjançant la detecció de ARN en el sèrum (Dawson et al., 1996). El virus pot romandre molts anys en el pacient, sense cap evidència de símptomes clínics o malaltia, tant en pacients immunodeprimits com en població sana (Lefrère et al., 1999).

El GBV-C semblava ser asimptomàtic en humans, tot i que alguns autors l'havien relacionat amb l'hepatitis C crònica i fins i tot amb l'hepatitis fulminant (Sallie et al., 1996; Kanda et al., 1997). Tot i això, en els últims estudis realitzats amb aquest virus s'ha demostrat que és incapaç de replicar-se en els hepatòcits o de causar malalties hepàtiques agudes o cròniques (Stapleton, 2003; Kupfer et al. 2005; Brown, 2005). Per aquest motiu, s'ha simplificat el seu nom únicament com a GBV-C (Figura I.1) i s'ha proposat d'incloure'l en el quart gènere de la família *Flaviviridae*, el gènere *Pegivirus* (Bhattarai et al., 2012).

De forma similar amb els 69 virus que conformen aquesta família, el GBV-C es caracteritza per estar constituït per un embolcall extern que protegeix al material víric genètic format per una cadena senzilla d'ARN de polaritat positiva. El GBV-C té un genoma que consta de 9.400 nucleòtids que codifiquen per una única poliproteïna de 2.900 aminoàcids la qual per la seva part codifica per a dues proteïnes estructurals E1 i E2) i per quatre de no estructurals (NS2, NS3, NS4, NS5) (Figura I.2).

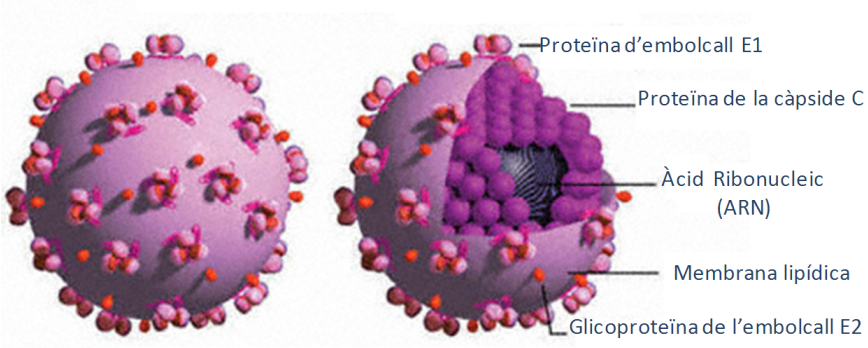


Figura I.1.: Model de l'estructura del virus GBV-C.

Font: ww.prn.org

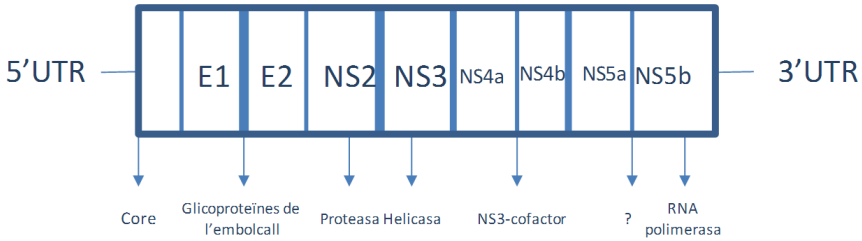


Figura I.2.: Poliproteïna del virus de l'hepatitis G que conté la regió no codificada (5'UTR i 3'UTR; UTR = *untranslated region*) i la regió que va a codificar les proteïnes: E1, E2, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a i N5b.

Font: pròpia

3. Relació entre el Virus de la immunodeficiència humana (VIH) i el GBV-C

Pel fet de compartir les mateixes vies de transmissió, la prevalença de GBV-C en població infectada per VIH és alta. Fins un 39% dels individus positius al VIH poden presentar infecció activa pel GBV-C i un 47% presenta anticossos anti-E2 (Stapelton, 2003). Així, s'ha observat que la infecció concomitant amb aquest dos virus, implica una reducció de la progressió de la Síndrome de la immunodeficiència humana adquirida, SIDA (Xiang et al., 2001; Macalalad et al., 2002; Polgreen, 2003). La virèmia del GBV-C en aquests individus està associada a una disminució de la mortalitat, a una progressió més lenta cap el desenvolupament de la SIDA i a una més elevada supervivència dels malalts un cop s'ha instaurat aquesta malaltia (Polgreen et al., 2003; Tillmann et al. 2001; Xiang et al, 2001). Així mateix, també s'ha descrit que la pèrdua del virus GBV-C, sobretot sense desenvolupar anticossos anti-E2, produeix una acceleració en la infecció per VIH (Van der Bij et al., 2005; Björkman et al., 2004).

Els estudis que s'han dut a terme fins ara, apunten a l'existència d'un mecanisme múltiple pel qual la infecció pel GBV-C millora l'evolució dels pacients infectats per VIH. En models de coinfecció per aquests dos virus, es suggereix que el GBV-C té un efecte antiviral directe sobre el VIH. Es pensa que alguna proteïna o ARN del virus GBV-C actua augmentant les concentracions de quimiocines el que altera la densitat de CCR5 en sang perifèrica, receptor en sang perifèrica a quimiocines i al VIH, el que provoca la disminució de la replicació del VIH (Xiang et al., 2001; Xiang et al., 2004).

D'altra banda, Jung et al. (2005) amb els experiments de transfecció amb ARN infecciosos, suggereixen que la replicació GBV-C no és necessària per a la supressió del VIH, i que només amb l'expressió d'almenys una de les glicoproteïnes E1 i E2 de l'embolcall i les proteïnes no estructurals NS2 i NS3, és suficient per a induir la inhibició de la replicació del VIH. Això indica que les proteïnes de l'embolcall del virus (E1, E2) GBV-C poden estar implicades en la inhibició de la replicació del VIH.

Resumint, tot i que el mecanisme d'acció, mitjançant el qual el GBV-C exerceix aquesta acció inhibidòria sobre el VIH no està del tot clar, hi ha evidències de que la infecció per GBV-C pot reduir la progressió de la

malaltia fruit de la infecció per VIH.

4. Interès dels pèptids sintètics de l'embolcall de GBV-C

A efectes pràctics, i en relació al que s'ha esmentat en l'apartat anterior, el GBV-C ha guanyat gran interès recentment a causa dels seus aparents efectes beneficiosos contra la progressió de la SIDA (Bhattarai, et al., 2012; Zhang et al., 2006; Shankar et al., 2008).

Per aquesta raó, cada vegada són més nombrosos els esforços dirigits a l'anàlisi de la coinfecció amb aquests dos virus. En molts dels estudis, pèptids que corresponen a fragments ben coneguts de les proteïnes del virus GBV-C estan sent utilitzats per al diagnòstic, aplicacions immunològiques o farmacològiques, entre d'altres.

S'ha descrit que la reactivitat enfront dels pèptids sintètics GBV-C està fortament associada amb les infeccions pel VIH (Mohr et al., 2010; Gómara et al., 2011). Anticossos contra la regió E2 de GBV-C han demostrat evitar la virèmia per GBV-C i indiquen infecció passada (Tanaka et al., 1998). També ha estat documentada la utilitat dels pèptids sintètics de l'embolcall i de les proteïnes no estructurals del GBV-C per inhibir l'entrada a les cèl·lules de certes soques del VIH-1 (Koedel et al., 2011) i per al diagnòstic serològic de la infecció entre els hemodialitzats i els pacients infectats per hepatitis C crònica (Gómara et al., 2010). Mohr et al. han suggerit que, estaria molt justificat, realitzar proves amb la proteïna E2 GBV-C com un candidat a vacuna contra VIH-1 Ag (Fauci et al., 2008).

Tenint en compte l'ús potencial dels pèptids sintètics en teràpies anti-virals, cal fer un intent per entendre amb més profunditat la interacció molecular de fragments de la proteïna E2 de l'embolcall del virus GBV-C amb les membranes cel·lulars.

5. Models de Membrana

La membrana cel·lular és un sistema biològic complex que consisteix en l'associació de dues capes monomoleculares de lípids amb molècules de proteïnes incorporades. És ben conegut que l'estructura bàsica de les mem-

branes ve definida per les característiques dels seus components lipídics, els quals li confereixen la seva naturalesa amfipàtica proporcionant una zona hidrofòbica entre dues superfícies hidrofíliques, amb una unitat bàsica de gruix de $5\text{-}8\text{nm}$ (Graham et al., 1997).

Per entendre el paper dels lípids i les proteïnes en sistemes biològics complexos a un nivell molecular detallat, és convenient l'estudi de models simplificats. En aquest sentit, per a extrapolar el que podria ser la interacció entre seqüències peptídiques i les membranes cel·lulars s'han usat models sintètics de membrana (Zhang et al., 2001). Aquests permeten definir i alhora estudiar l'efecte del peptid en relació a diferents composicions lipídiques i alhora controlar altres factors que poden afectar a la seva estabilitat i interacció, com són el grau de curvatura i la càrrega.

5.1. Monocapes lipídiques.

Les pel·lícules monomoleculares de fosfolípids en la interfície aire/aigua són els models de membrana més senzills per a estudiar les interaccions entre lípids i peptids i/o altres molècules biològicament actives. El seu espessor correspon al d'una molècula i venen a representar la meitat de la membrana cel·lular (Verger et al., 1982; Pilon et al., 1987; Grainger et al., 1992; Maget-Dana, 1999). El principal avantatge d'aquest model davant d'altres sistemes més complexos radica en la possibilitat de controlar l'ordenació de les molècules modificant l'àrea molecular i la pressió superficial de la monocapa. Les dades obtingudes a partir de la variació d'aquests paràmetres ofereixen una informació valuosa de les interaccions lípid-lípid, lípid-subfase i lípid-molècula activa; i fins i tot sobre la conformació de les molècules estudiades (Verger et al., 1982; Schwarz et al., 1992; Maget-Dana et al., 1999). A més a més, es pot conèixer amb exactitud la composició lipídica així com l'àrea exposada, i existeix una relació termodinàmica directa entre el model de membrana en monocapa amb el de bicapa. Per últim, cal destacar que els estudis de monocapes són de gran interès, donat que aquests sistemes estan recolzats per rigoroses anàlisis teòriques (Birdi, 1989; Brockman, 1999; Maget-Dana, 1999; Pérez et al., 2009).

En els estudis d'aquests sistemes es distingeixen clarament dos tipus de monocapes que difereixen segons el procés de la seva formació (Gaines, 1966), les d'adsorció de Gibbs i les d'extensió:

a) Monocapes d'adsorció de Gibbs.

A l'injectar en una subfase aquosa compostos amfipàtics, aquests, com a conseqüència de la seva polaritat, s'acumulen de forma espontània en la interfície aire/aigua formant una monocapa d'adsorció. Això produeix una disminució de la tensió superficial del solvent, establint-se a la interfase aire/aigua un equilibri dinàmic amb les molècules de la resta de la dissolució, que s'intercanvien contínuament entre elles. (Figura I.3). Un paràmetre característic d'aquests models és la pressió superficial (π) definida com la força per unitat de longitud que exerceixen les molècules que formen la monocapa contra les parets del recipient que conté la solució.

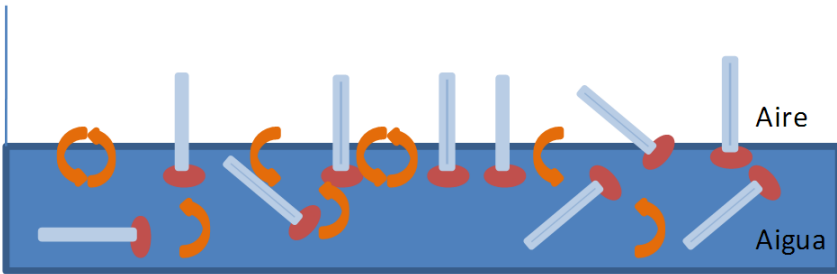


Figura I.3.: Disposició de les molècules en la monocapa d'adsorció

Font: Pròpia

En aquestes condicions d'equilibri, hi ha una relació entre la quantitat de solut adsorbit en la interfase i la variació de la tensió superficial que es produeix en el dissolvent que ve donada per l'equació de la isoterma d'adsorció de Gibbs:

$$\Gamma = \frac{1}{RT} \frac{\Delta\pi}{\Delta \ln c} \tag{I.1}$$

on, Γ és l'excés superficial, $\Delta\pi$ és la variació de pressió superficial, c la concentració en la subfase, R la constant del gasos i T la temperatura absoluta (298K). A partir de Γ es pot calcular l'àrea molecular (A) aplicant l' Eq. I.2, en la que N_A és el número d'Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ molècules \cdot mol $^{-1}$).

$$A = \frac{1}{N_A \Gamma} \tag{I.2}$$

El caràcter amfipàtic de molts pèptids els converteix en molècules amb determinada activitat superficial, i donat que la seva acció biològica requereix de la interacció amb les interfícies de les membranes lipídiques, la tècnica de les monocapes és convenient per a estudiar les seves propietats fisicoquímiques i biològiques ja que els experiments realitzats en la interfície aire/aigua proporcionen informació sobre la flexibilitat i l'activitat superficial de les molècules que s'estudien (Maget-Dana, 1999; Zhang et al., 2001, Ambroggio et al., 2004; Tian et al., 2006).

Aquest procediment no és l'habitual per a obtenir monocapes com a models de membrana sinó que és una forma de determinar l'activitat superficial de molècules, però s'ha inclòs en aquest apartat per ser la forma acadèmica de descriure els diferents tipus de monocapes.

b) Monocapes d'extensió

Es formen espontàniament al depositar substàncies amfipàtiques, insolubles en dissolvents aquosos, com els lípids de membrana, sobre la superfície d'un líquid polar. S'origina una pel·lícula similar a la de les monocapes d'adsorció, però en la que no s'hi produeix cap tipus d'intercanvi entre les molècules de la interfase aire/aigua i les del medi subjacent (Figura I.4).

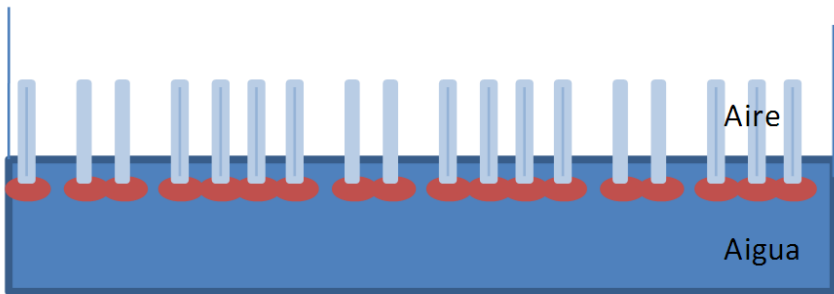


Figura I.4.: Disposició de les molècules en la monocapa d'extensió

Font: Pròpia

5.2. Tècniques de caracterització de les interaccions moleculars lípid-pèptid mitjançant monocapes

5.2.1. Cinètiques de penetració

Estudi de les interaccions intermoleculars entre pèptids i monocapes lipídiques, que consisteix en l'extensió d'una monocapa de lípid sobre una subfase aquosa a una pressió desitjada seguida de la incorporació d'una solució del pèptid a estudi en dita subfase, i s'enregistren els canvis en la pressió superficial al llarg del temps.

Si el pèptid s'insereix entre les molècules de lípid o pertorba d'alguna manera l'empaquetament lipídic, la pressió superficial es modificarà, fet que constituirà una prova directa de la interacció del pèptid i una monocapa en particular. La magnitud, dels canvis en els valors de pressió superficial es pot usar per a comparar el grau d'interacció entre diferents molècules. Els estudis consistents en el seguiment d'aquests canvis produïts en la pressió superficial en funció del temps d'interacció i manteniment constant de l'àrea superficial, es denominen cinètiques de penetració a àrea constant (Figura I.5).

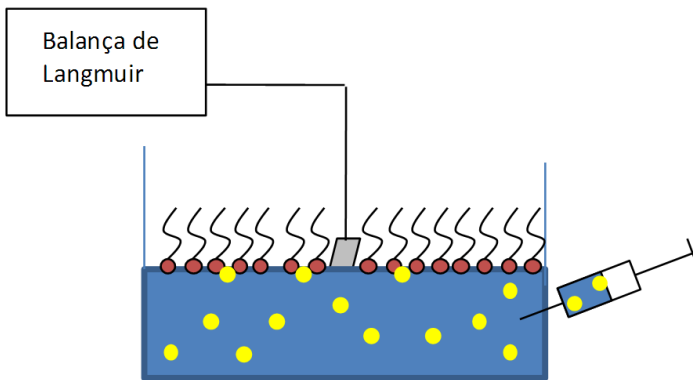


Figura I.5.: Esquema d'un experiment de cinètiques de penetració a àrea constant. Els pèptids s'injecten en la subfase i es mesura l'augment de pressió a mida que s'incorporen les molècules de pèptid a la monocapa.

Font: Pròpia

Si es manté la pressió superficial constant i es mesuren les variacions d'àrea superficial en funció del temps, es parla de cinètiques de penetració a pressió constant (Figura I.6).

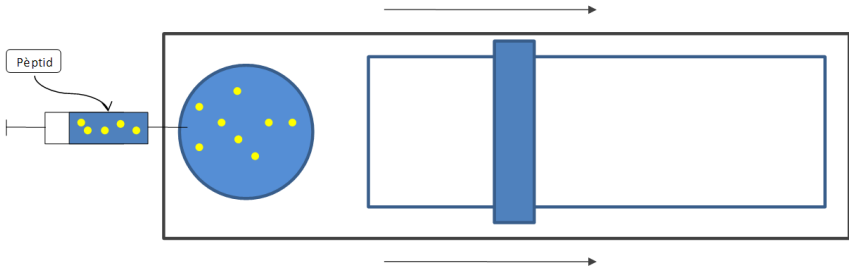


Figura I.6.: Esquema d'un experiment de penetració a pressió constant. Les molècules a estudiar s'injecten a la subfase en el compartiment esquerra de la cubeta, i es mesura la variació de l'àrea per mantenir la pressió constant.

Font: Pròpia

5.2.2. Isotermes de compressió

D'altra banda, si es disposa una monocapa de fosfolípids a la superfície d'una dissolució aquosa i es comprimeix mitjançant una barrera mòbil de forma que es vagi disminuint l'àrea superficial gradualment, les molècules que la formen s'apropen i eventualment es forma una monocapa comprimida i ordenada. La pel·lícula produïda per aquest mètode és coneguda com pel·lícula de Lagmuir, isoterma de compressió o corba pressió/àrea (Figura I.7).

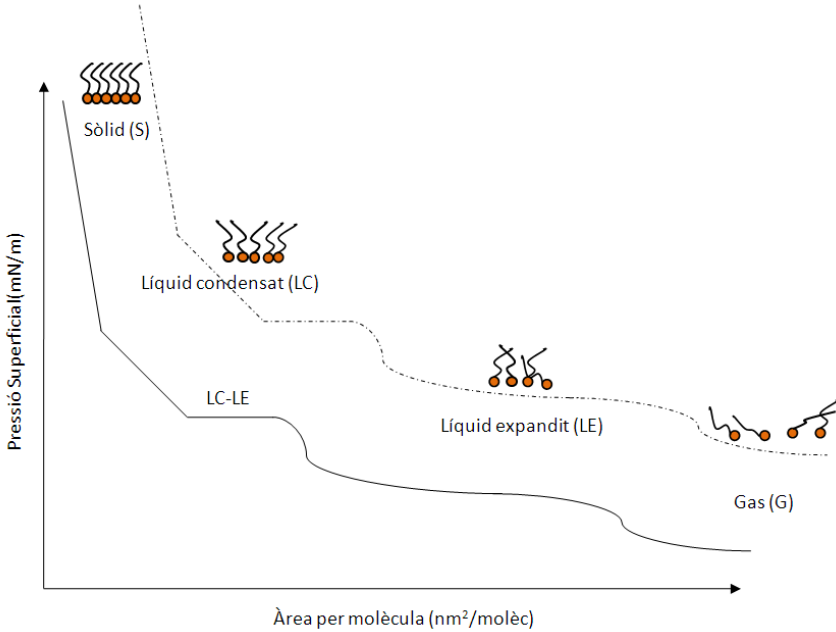


Figura I.7.: Isoterma de compressió on es representen els diferents estats que es pot trobar la monocapa.

Font: Pròpia

La reducció de l'àrea disponible per les molècules es tradueix en un augment de pressió. En el punt de màxima compressió (mínima àrea) se sol arribar al punt de col·lapse, característic per a cada molècula que depèn també de les condicions experimentals com temperatura i velocitat de compressió (Figura I.9). Aquest punt es caracteritza per una pressió de col·lapse (π_{col}) que és la màxima pressió superficial a la que una monocapa pot ser comprimida sense que es produeixi un moviment detectable de les molècules per a formar una nova fase.

Les molècules en una monocapa poden trobar-se en diferents estats superficials equivalents als estats sòlid, líquid i gas dels sistemes tridimensionals (Deveaux et al., 1912) i que corresponen a diferents graus de llibertat o ordenació moleculars, deguts a les forces intermoleculars existents a la pel·lícula i les que hi ha entre aquesta i la subfase (Figura I.8).

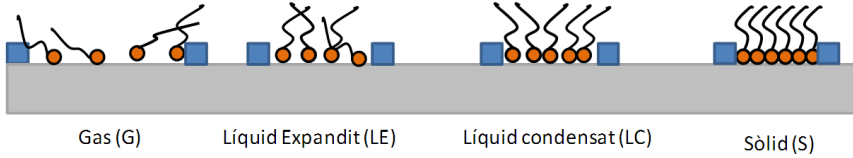


Figura I.8.: Representació gràfica dels estats de les capes monomoleculars en una interfície aire/aigua

Font: Pròpia

Les característiques fisicoquímiques d'una monocapa estesa en la superfície de l'aigua poden ser estudiades a partir dels canvis en la pressió superficial que es produeixen durant la compressió. La forma d'una isoterma de compressió (Figura I.7) és una característica de les molècules que formen la monocapa, fet que proporciona una valuosa informació sobre l'organització i interacció entre aquestes (Pérez et al., 2011).

A partir de les isoterms de compressió, es pot determinar l'estat de la monocapa a les diferents pressions mitjançant el càlcul del mòdul de compressibilitat (C_s^{-1}) per a les diferents àrees moleculars (Davies et al., 1963):

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right) T \quad (\text{I.3})$$

El mòdul de compressibilitat és zero en aigua i s'incrementa en augmentar la quantitat de material superficialment actiu. Aquest paràmetre també depèn de l'estat de la monocapa sent major per monocapes més condensades. Per tant, en funció del valor de C_s^{-1} es pot determinar l'estat de fase de la monocapa. Monocapes que tinguin un valor del mòdul de compressibilitat entre 12,5-50 mN/m es troben en un estat de líquid expandit o bidimensional, valors del mòdul de compressibilitat entre 100-250 mN/m indiquen que la monocapa està en forma de líquid condensat i això indica la formació de *loops* tridimensionals. Finalment, valors de C_s^{-1} inferiors a 12,5 mN/m indiquen un estats de fase gas de la monocapa, i per sobre de 250 mN/m la fase es considera sòlida.

Taula I.1.: Valors del mòdul de compressibilitat a diferents estats de la monocapa

Estat de la monocapa	C_s^{-1} (mN/m)
Gasós	0-12,5
Líquid expandit	12,6-50
Líquid intermedi	51-100
Líquid condensat	101-250
Sòlid	>250

5.2.3. Estudis amb isoterms de compressió: Monocapes mixtes

Quan es realitza la barreja de substàncies, les monocapes mixtes obtingudes poden ser de dos tipus, miscibles quan els components es barregen perfectament entre si o immiscibles quan es produeixen separacions entre ells (Gaines, 1966). En una monocapa amb dos components (A_1 , A_2), l'àrea ocupada per la barreja ideal ($A_{1,2}$) a qualsevol pressió superficial serà igual a:

$$A_{1,2} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \quad (\text{I.4})$$

on A_1 i A_2 són les àrees ocupades pels components en monocapes pures i X_1 i X_2 les seves fraccions molars en la monocapa.

En les monocapes reals es poden trobar les funcions d'excés (a π i T constants).

$$A_{ex} = A_{1,2} - (X_1 A_1 + X_2 A_2) \quad (\text{I.5})$$

on $A_{1,2}$ és l'àrea per molècula promig de la barreja dels components 1 i 2.

Quan la representació d' $A_{1,2}$ enfront de la fracció molar és una línia recta, significa que no es produeixen interaccions específiques entre les substàncies de la barreja. Una desviació a la linealitat indica un comportament no ideal, i per tant, l'existència d'interaccions entre els components.

La mesura de la pressió de col lapse al llarg de tot el rang de composicions molars en les monocapes mixtes és també una prova de la miscibilitat entre molècules. Quan els dos components són immiscibles, les monocapes mixtes col·lapsen a la mateixa pressió superficial independentment de la composició

molar. En canvi, per a les monocapes miscibles la pressió de col lapse varia en funció de la composició.

D'altra banda, l'energia lliure d'excés, serveix per a conèixer la desviació del comportament ideal de les monocapes mixtes. Les equacions aplicades per a determinar-la són derivades de les de Goodrich i Pagano (Goodrich, 1957; Pagano, et al., 1972).

$$AG_m^{ex} = \Delta G_m - \Delta G_{m(ideal)} \quad (I.6)$$

$$AG_m^{ex} = \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_{1,2} d\pi - X_1 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_1 d\pi - X_2 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (I.7)$$

on $A_{1,2}$ és l'àrea per molècula mitjana de la monocapa mixta, A_1 i A_2 són les àrees per molècules mitjana en les monocapes pures d'1 i 2, X_1 i X_2 són les fraccions molars de els components purs 1 i 2.

Si la monocapa és ideal $\Delta G_m = 0$. Quan el valor de ΔG_m no és igual a zero vol dir que existeixen desviacions del comportament ideal. Aleshores si $\Delta G_{ex} < 0$ significa que existeix una interacció d'atracció electrostàtica o que les interaccions entre les molècules 1 i 2 són majors que les dels components purs. Si $\Delta G_{ex} > 0$, indica un predomini de repulsions electrostàtiques entre els components de la barreja o que les atraccions són menors que les existents en els components purs.

5.3. Bicipes: Liposomes

Els liposomes són vesícules formades per una o més bicapes de fosfolípids que engloben un espai aquós intern, la seva grandària pot anar de pocs nm fins a alguns micròmetres. Es formen com a conseqüència de les propietats amfipàtiques dels fosfolípids. En un medi aquós s'organitzen espontàniament en forma de bicapes, situant la seva part més polar en contacte amb el medi aquós, mentre que la seva part apolar s'ubica a la part interior de la bicapa evitant el contacte amb l'aigua i donat lloc a un sistema termodinàmicament més favorable (Figura I.9) (Szoka et al., 1978; Tanford, 1980; Lasic 1988).

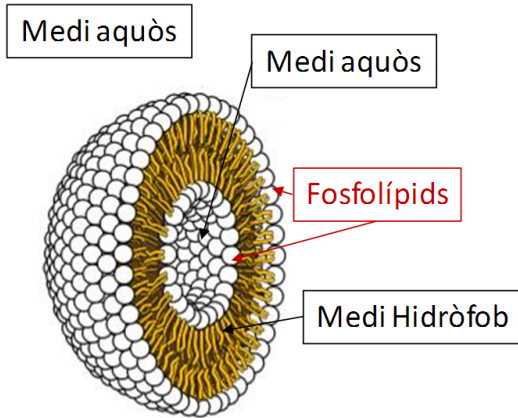


Figura I.9.: Estructura dels liposomes.

Font: Pròpia

Els liposomes es poden classificar, entre d'altres conceptes, en funció del nombre de bicapes que els formen, de la seva grandària (Vance et al., 1996) o del mètode d'obtenció (Taula I.2).

Els liposomes es poden preparar per diversos mètodes, essent els més comuns per sonicació (Gregoriadis, 1984), extrusió (Olson et al, 1979), *swelling* (Needham i Evans, 1988), electroformació (Angelova et al. 1986) o evaporació en fase reversa (Szoka et al. 1978). Normalment, s'obtenen per hidratació dels fosfolípids seguit d'agitació mecànica (Lasic et al. 1991). Tots aquests mètodes es basen en l'organització espontània dels lípids i condueixen a una distribució simètrica dels mateixos en les monocapes interna i externa que formen la bicapa.

El procés de preparació dels liposomes requereix la seva caracterització fisicoquímica consistent fonamentalment en la mesura de la mida i índex de polidispersió (DLS, TEM, SEM, *Freeze fracture*), quantificació de lípid (mètodes de Marshall i McClare) i potencial zeta.

Taula I.2.: Descripció dels tipus de liposomes, mida, propietats i aplicacions.

Tipus	Acrònim	Mida i característiques	Aplicacions	Referències
Liposomes multilamelars (Multilamellar Vesicles)	MLVs	1 - 5 μm Formats per vàries lamelles concèntriques (entre 7 i 9) Poblacions molt heterogènies.	Degut a la seva estructura es troben limitats a l'estudi d'organització de la bicapa. Estudis de calorimetria.	Akbarzadeh, A (2013)
Liposomes unilamelars gegants (Giant Unilamellar Vesicles)	GUVs	1 a varis μm	Emprats per a investigacions físiques i biològiques com canvis de forma dels liposomes, propietats elàstiques de les membranes lipídiques, interacció del citoesquelet amb membranes i estructures dinàmiques de biomembranes.	Moscho, (1996) Yamashita, (2002) Walde, (2010) Collins, (2013)
Liposomes unilamelars grans (Large Unilamellar Vesicles)	LUVs	> 100nm Presenten una pressió superficial similar a la de les membranes biològiques (30-32mN/m)	Són els models de membrana més estudiats per a comprendre les propietats físiques, químiques i mecàniques de les membranes biològiques. També com a <i>drug delivery systems</i> .	Akbarzadeh, A (2013) Patil, Y.P (2014)
Liposomes unilamelars petits (Small Unilamellar Vesicles)	SUVs	15 a 50 nm La seva elevada curvatura fa que siguin poc estables.	Tenen propietats semblants als LUVs però presenten una menor estabilitat i capacitat de retenció de substàncies hidrofíliques.	Gregoriadis (1984)

5.4. Tècniques de caracterització de les interaccions moleculars lípid-pèptid mitjançant liposomes

Els liposomes tenen gran valor com a models de membrana, donat que els components lipídics que els formen poden ser idèntics als que constitueixen les membranes cel·lulars. Per tant, són un bon model per a estudiar certs processos que es produeixen a les membranes biològiques, com són l'agregació, la fusió, la formació de canals, o la lisi de membranes entre d'altres. Amb el seu ús en diferents tècniques, es pot conèixer l'efecte que poden produir molècules bioactives sobre les bicapes.

D'altra banda, també es important l'efecte que les membranes tenen sobre els pèptids, ja que aquestes poden fer variar la conformació que adopten els pèptids al unir-se a elles. Per exemple, en el cas de pèptids fusogènics, els canvis conformacionals en el moment de la unió a la membrana són condicionants de la seva activitat fusiogènica (Lee et al.; 1992; Rapaport et al., 1994).

Per a estudiar l'efecte dels diferents fragments peptídics sintètics del virus de l'hepatitis G sobre aquests models de membranes s'han aplicat una sèrie de tècniques biofísiques fonamentalment basades en l'espectroscòpia UV-visible, espectroscòpia de fluorescència, i estudis per calorimetria diferencial d'escombrat (DSC).

5.4.1. L'espectroscòpia UV-visible tècnica a per a l'estudi de la interacció lípid-pèptid

Quan un feix de llum monocromàtica travessa una dissolució part de la radiació pot ser absorbida. El procés d'absorció ve donat per la llei de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc \quad (1.8)$$

on A és l'absorbància, I_0 i I són les intensitats de radiació electromagnètica incident i transmesa, ϵ és el coeficient d'extinció molar o coeficient d'extinció, b del gruix de cubeta i c la concentració.

La interacció dels pèptids amb cèl·lules o liposomes es pot avaluar a partir de la variació en l'absorbància mitjançant diferents assaigs.

5.4.2. La fluorescència com a tècnica espectroscòpica per a l'estudi de la interacció lípid-pèptid

En el cas concret de l'espectroscòpia de fluorescència, a part de la seva elevada sensibilitat, es pot aprofitar la fluorescència intrínseca deguda a la presència d'aminoàcids amb grups cromòfors. Els pèptids i proteïnes deuen la seves propietats fluorescents a tres aminoàcids aromàtics: triptòfan (*Trp*), tirosina (*Tyr*) i fenilalanina (*Phe*), per ordre decreixent de rendiment quàntic (ϕ). Els residus de *Trp* determinen el 90% de la fluorescència de les proteïnes. La *Tyr* és altament fluorescent en dissolució, però l'emissió és generalment feble en proteïnes degut a diversos factors, com la transferència d'energia a *Trp* i l'apantallament per altres grups de la cadena peptídica (Edelhoc et al., 1968a i b). El rendiment quàntic de la *Phe* és molt baix, i per tant, l'emissió de fluorescència deguda a aquest residu quasi mai no s'observa.

La *Tyr* i el *Trp* són molt sensibles a la polaritat del seu entorn, fent que les seves propietats fluorescents canviïn al interaccionar amb altres molècules com els fosfolípids constituents del liposomes. Pel cas concret del *Trp*, els residus dels aminoàcids que passen d'un entorn polar a un altre més apolar, originen un desplaçament del seu màxim d'emissió de fluorescència a longituds d'ona (λ) menors o desplaçament cap al blau (*blue shift*) (Christiaens et al., 2002). Així mateix, si aquests residus d'aminoàcid es troben més exposats al medi polar, el màxim d'emissió es desplaça a λ majors o desplaçaments cap el vermell (*red shift*). Generalment, els canvis en la λ màxima d'emissió s'acompanyen de variacions en la intensitat de fluorescència, és a dir, si es produeix un desplaçament a λ menors, s'incrementa, en canvi, un augment en la λ comporta la seva disminució (Lakovicz, 1983).

A part de la fluorescència intrínseca, es poden emprar sondes extrínseques que amplien el ventall d'estudis basats en aquesta tècnica. Així per exemple, l'espectre de fluorescència de la sonda *MC*₅₄₀ varia en funció del medi en el que es troba. Quan està en un entorn hidròfob, el seu màxim d'emissió es desplaçada cap al vermell i l'eficiència quàntica és més gran. Els canvis en el màxim de fluorescència de la *MC*₅₄₀ i/o en la intensitat de fluorescència proporcionen informació sobre microambient membrana (Lelkes et al., 1980; Kaschny et al., 1992), per aquest motiu s'ha utilitzat aquesta sonda per determinar modificacions en l'empaquetament molecular després de l'addició de pèptid. La fluorescència de la sonda és més gran en els

membranes fluides que es troben per sobre de la transició de fase dels lípids que les rígides.

A continuació es descriuen una sèrie de tècniques espectroscòpiques basades en l'ús de sondes fluorescentes intrínseques i/o extrínseques emprades habitualment en l'estudi de la interacció model de membrana-molècula bioactiva.

5.4.2.1. Fusió de membranes: Transferència d'Energia per Ressonància

La capacitat d'un pèptid per a fusionar membranes es pot mesurar realitzant l'assaig proposat per Struck (1981). La *RET* és un fenomen que es produeix quasi invariablement a causa del fet de que sota certes circumstàncies, l'energia absorbida per una determinada molècula (donador), pot ésser transferida a un altra fluorescent (acceptor) que es troba a una determinada distància. Per a que es produeixi aquest fenomen, és condició necessària, però no suficient, que l'espectre d'emissió del donador s'encavalqui amb l'espectre d'absorció de l'acceptor. D'aquesta manera, l'excitació de l'acceptor es produeix per la transferència directa d'energia del donador excitat i es manifesta com una reducció de la intensitat de fluorescència d'emissió del donador i el corresponent augment en l'emissió de l'acceptor (Figura I.10).

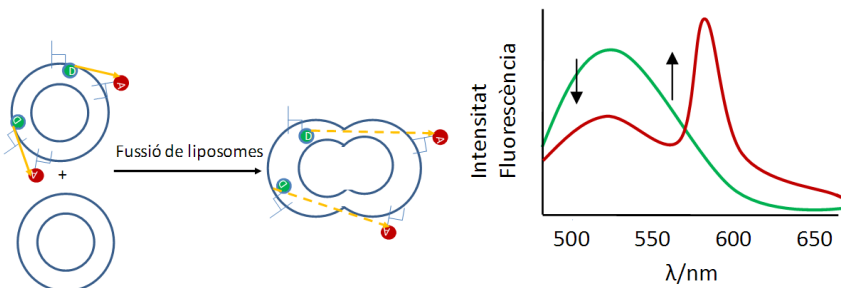


Figura I.10.: Esquema de l'assaig de transferència d'energia per resonància. A: acceptor d'energia, D: donador d'energia.

Font: Modificat de <http://probes.invitrogen.com/handbook/boxes/0432.html>

La importància d'aquest fenomen radica en el fet que l'eficiència de la transferència està en funció de la distància entre els compostos fluorescents, ja que aquesta disminueix de forma proporcional amb l'augment de la se-

paració entre donador i acceptor i pot utilitzar-se tant per a mesurar les distàncies moleculars, com per a detectar processos d'intercanvi i/o fusió entre fosfolípids incorporats a diferents preparacions liposòmiques (Maier et al., 2002).

L'eficàcia de la transferència, ϵ , queda descrita per la següent equació:

$$\epsilon = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (\text{I.9})$$

on R és la distància entre donador i acceptor, R_0 , és una constant relacionada amb cada parell donador-acceptor, que es coneix com a distància de Förster; on l'eficiència de la transferència és del 50% i que es pot calcular a partir de certs paràmetres dels espectres d'absorció i d'emissió de cadascuna de les dues molècules fluorescents.

El nivell de transferència d'energia per ressonància depèn de (Blumenthal et al., 2002):

- L'extensió de la superposició de l'espectre d'emissió del donador amb l'espectre d'absorció de l'acceptor.
- L'orientació relativa dels dipols de transició del donador i de l'acceptor.
- La distància entre el donador i l'acceptor.

5.4.2.2. Polarització de fluorescència La polarització (P) es defineix com la diferència d'intensitat de fluorescència observada quan els polaritzadors d'excitació o d'emissió estan en paral·lel, V_V , i en perpendicular, V_h , en el pla de polarització, dividit per la suma d'aquestes dues intensitats:

$$P = \frac{I_{V_V} - I_{V_h}}{I_{V_V} + I_{V_h}} \quad (\text{I.10})$$

L'anàlisi de dades basades en dades de polarització (P) poden ser difícils d'utilitzar ja que aquests valors no són additius, al contrari que els d'anisotropia que sí ho són. És per aquest motiu que habitualment, tot i que la tècnica en sí comunament es coneix com a polarització de fluorescència, es treballi amb els valors d'anisotropia que està relacionada amb la polarització mitjançant l'expressió:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad (\text{I.11})$$

Amb el que es pot calcular l'anisotropia de fluorescència com:

$$r = \frac{I_{V_V} - GI_{V_h}}{I_{V_V} + 2GI_{V_h}} \quad (\text{I.12})$$

Els valors d'anisotropia es corregeixen automàticament per a evitar la influència del sistema de detecció (factor de correcció, G).

$$G = \frac{I_{H_V}}{I_{H_h}} \quad (\text{I.13})$$

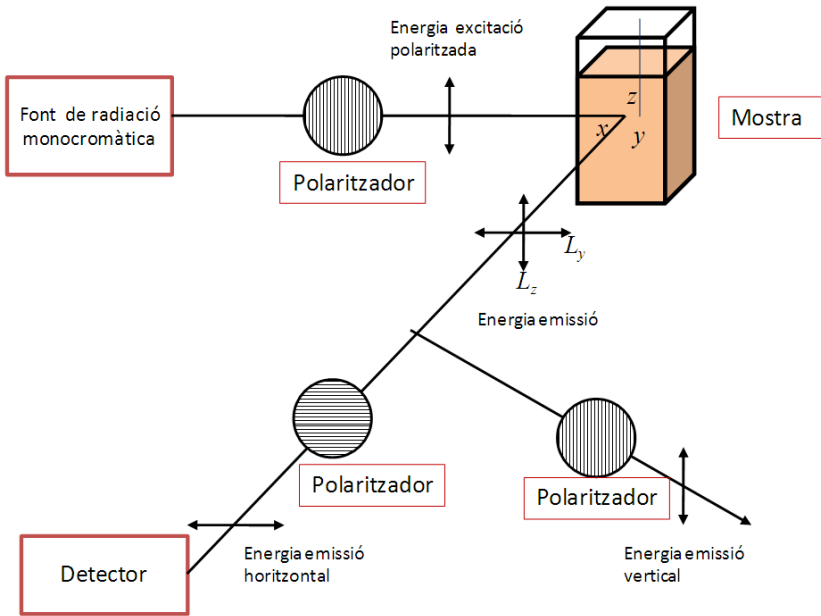


Figura I.11.: Esquema de funcionament de la tècnica de polarització de fluorescència.

Font: Pròpia

Un dels atractius d'aquesta tècnica és que permet l'anàlisi de les interaccions a distints nivells de profunditat en una bicapa. Per això es disposa de sondes fluorescents que s'ubiquen, segons la seva composició, en distints llocs de la bicapa (Figura I.12).

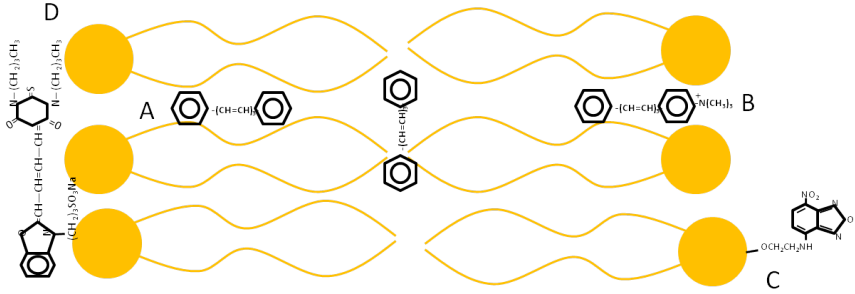


Figura I.12.: Estructura química i localització en la bicapa d'algunes de les sondes utilitzades per als estudis d'anisotropia de fluorescència: (A) DPH; (B) TMA-DPH; (C) NBD-PE; (D) MC₅₄₀.

Font: Pròpia

5.4.2.3. Assaig d'alliberació de continguts vesiculars La capacitat dels pèptids per a desestabilitzar membranes fosfolipídiques es pot estudiar mitjançant un assaig d'alliberació de marcadors fluorescents des del contingut vesicular (Ellens et al., 1984) basat en l'apantallament de fluorescència. Aquest consisteix en una transferència d'energia no radiant des d'espècies excitades a altres molècules, la qual cosa comporta la desactivació de l'estat excitat, que resulta en una disminució de la intensitat de fluorescència de l'espècie fluorescent. Un exemple n'és l'assaig de l'ANTS/DPX (Figura I.13) que consisteix en encapsular al interior dels liposomes la sonda fluorescent soluble amb aigua (ANTS) i un agent apantallant d'aquesta DPX, fent que no es produeixi emissió de la fluorescència. Si la molècula que s'estudia és capaç de desestabilitzar la membrana i alliberar les sondes, l'efecte de la dilució provoca que l'apantallant no sigui efectiu i, per tant, s'incrementa la intensitat d'emissió de fluorescència de l'ANTS. Existeixen altres marcadors fluorescents (calceïna i carboxifluoresceïna) que quan estan encapsulats dins dels liposomes i es troben en una elevada concentració no emeten fluorescència (autoapantallament). Si es trenquen els liposomes, la dilució de la sonda fa que augmenti l'emissió (Nicol et al., 2000; Peisajovich et al., 2000; Christiaens et al., 2004).

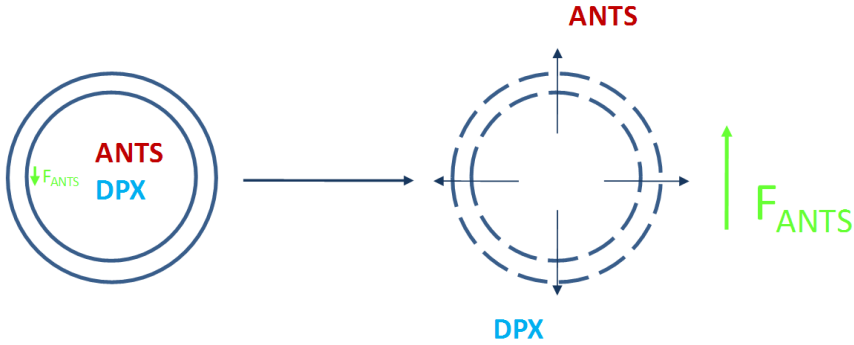


Figura I.13.: Determinació de la permeabilització de vesícules lipídiques. La dilució de l'ANTS i DPX co-encapsulats en alliberar-se al medi aquós causa un augment en la intensitat de fluorescència de l'ANTS.

Font: Pròpia

5.4.3. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

Les bicapes lipídiques formades per fosfolípids manifesten una transició calorimètrica principal des d'una fase en estat de gel, a baixes temperatures, en la qual les cadenes lipídiques es troben rígides i ordenades, a una fase d'estat fluid o de cristall-líquid a elevada temperatura, on les cadenes tenen un major moviment i el gruix de la bicapa és menor (Figura I.14). La transició de fase és un procés endotèrmic que pot ser detectat mitjançant tècniques físiques en variar la temperatura. Al realitzar un termograma s'observa un pic agut en el moment de la transició de fases. Aquest procés és cooperatiu, és a dir, que totes les molècules tenen el canvi de fase a la mateixa temperatura, la temperatura de transició (T_m , temperature melting). L'estudi d'aquestes transicions de fase proporciona un mètode valuós per caracteritzar les propietats de l'estat fluid, el qual és el més rellevant en les membranes biològiques.

La calorimetria diferencial d'escombrat (*Differential Scanning Calorimetry*, DSC) és una tècnica fonamental per investigar la transició de fase dels fosfolípids en models de membrana. El comportament termotròpic dels fosfolípids s'ha estudiat àmpliament, i aquest determina propietats com ara la permeabilitat, la fusió, la agregació i, fins i tot, la unió a proteïnes,

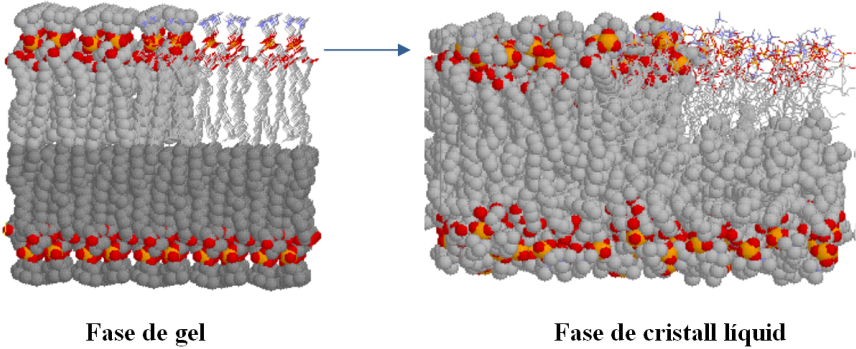


Figura I.14.: Esquema de la transició de fase dels fosfolípids

Font: <https://www.umass.edu/microbio/rasmol/cutlips.htm>

que afecten l'estabilitat dels liposomes i el seu comportament en sistemes biològics (Aranda et al., 1997, Poklar et al., 1999, Koynova et al., 1998).

La T_m d'un fosfolípid pur té un valor característic que augmenta en incrementar la longitud de la cadena hidrocarbonada, atès que les interaccions hidrofòbiques que es produeixen són majors. Si la bicapa està formada per fosfolípids insaturats la temperatura de transició és menor, ja que els enllaços de tipus *cis* eviten un gran empaquetament i fan que les interaccions de tipus Van der Waals siguin menors. En les membranes biològiques aquesta transició de fase és molt més àmplia ja que és més complexa per estar formada per molts components.

La modificació de la T_m d'un fosfolípid o barreja per la presència d'un determinat compost, indica la magnitud de la interacció i a més, a partir dels termogrames també es poden obtenir dades termodinàmiques del procés com l'entalpia associada a la transició de fases (ΔH) i l'amplitud del pic associat a la transició principal en el punt mig ($\Delta T_{1/2}$).

6. Estudis conformacionals: Espectroscòpia de dicroisme circular (CD)

La conformació que adopten els pèptids en distints medis és important per conèixer les seves característiques intrínseques i conseqüentment, el seu comportament a nivell de membrana. Els pèptids de seqüència aminoacídica curta, no presenten normalment una conformació definida. No obstant això, si són capaços de unir-se als models de membrana en estudi poden adoptar una conformació més ordenada, probablement similar a la que es troba a la proteïna nativa. En els pèptids de fusió s'ha descrit que, la conformació adoptada per aquests durant la unió a la membrana cel·lular és molt important per a la seva activitat fotogènica (Lee et al., 1992, Rapaport et al., 1994).

L'estructura secundària, està relacionada amb l'ordenament espacial dels aminoàcids pròxims entre si en la seqüència lineal. Quan les relacions estèriques són de naturalesa regular originen una estructura periòdica. L'hèlix α , el gir β i la làmina β són elements d'estructura secundària. En canvi, quan una proteïna o un pèptid no en tenen una de definida es diu que presenten una estructura desordenada o l'atzar.

Estructura d'hèlix α

La seqüència aminoacídica gira al voltant d'un eix i les cadenes laterals queden a la superfície de l'hèlix. Cada gir té una unitat repetitiva de 3,6 aminoàcids. L'hèlix es troba estabilitzada per enllaços d'hidrogen dels grups amida, entre l'hidrogen unit al nitrogen (electropositiu) del residu (i) i l'àtom d'oxigen (electronegatiu) del residu ($i + 4$).

Les hèlixs són amfipàtiques, tenen una zona polar en la superfície i una zona hidrofòbica en la cara interna. En les seqüències peptídiques les interaccions entre les cadenes laterals dels aminoàcids poden estabilitzar o desestabilitzar la α -hèlix. Residus com *Asn*, *Ser*, *Thr*, i *Leu* desestabilitzen l'hèlix. La *Pro*, en ser un aminoàcid en què el nitrogen es troba en un anell, li confereix molta rigidesa i no té hidrogen amb el qual poder formar el pont d'hidrogen. Per tot això, és el principal disruptor d' α -hèlixs (Richardson et al., 1988). D'altra banda, encara que la *Pro* sigui el principal agent desestabilitzador, en alguns casos pot contribuir a que els residus posteriors tinguin una conformació helicoïdal, ja que no necessita cap acceptor

d'hidrogen i això és beneficiós per a l'estabilitat de l'hèlix.

Estructura de gir β

Els girs β es produeixen quan la cadena peptídica canvia bruscament i, generalment es troben en zones superficials de les proteïnes. En el gir β estan involucrats 4 residus que formen un angle de 180°. El gir s'estabilitza per l'enllaç d'hidrogen que es produeix entre el grup C=O del residu (i) i el grup NH del residu ($i + 3$). En els girs és molt freqüent la presència de *Gly* i *Pro* en posicions ($i + 1$) i ($i + 2$).

Fulla plegada β

La cadena polipeptídica està pràcticament estesa en forma de làmina. La distància axial entre els aminoàcids és de 3,5 Å i està estabilitzada per ponts d'hidrogen entre grups NH i CO de les diferents cadenes polipeptídiques. Les cadenes adjacents a la fulla β poden estar dirigides a la mateixa direcció (fulles β paral·leles) o en direccions oposades (fulles β antiparal·leles).

Una de les tècniques més habituals per a la determinació de l'estructura secundària que adopten els pèptids és l'espectroscòpia de dicroisme circular (CD).

La llum pla polaritzada està composta per dos components, un circularment a la dreta (D) i un altre circularment a l'esquerra (I). Quan el feix de llum travessa un medi òpticament actiu, obtenen dades de dicroisme circular calculant la diferència entre la llum absorbida per un component respecte a un altre.

$$\Delta A = A_i - A_d \quad (\text{I.14})$$

on ΔA és la diferència entre les absorbàncies de la llum polaritzada circularment a la esquerra (A_i) i la llum polaritzada circularment a la dreta (A_d). ΔA segueix la llei de Lambert-Beer, per tant els valors estan relacionats amb la diferència entre els respectius coeficients d'absortivitat molar $\Delta A = \Delta \epsilon bc$.

El grup cromòfor majoritari present en els pèptids és el grup amida que es troba en l'enllaç peptídic, així com el grup aromàtic present en les cadenes laterals d'alguns aminoàcids (*Trp*, *Tyr*, *Phe*) (Woody 1996). En els espectres dels pèptids apareixen bandes característiques que depenen dels tipus

d'enllaços i del grau de ordenació adoptat. La polarització de la llum que surt en interaccionar amb les molècules quirals, en aquest cas els pèptids, és el·líptica perquè està formada per la combinació de dues ones circulars de sentits oposats i amb diferent amplitud. Els resultats es determinen en valors de el·lipticitat molar per residu ($mdeg\ cm^2\ d\ mol\ residu^{-1}$), i aquests s'obtenen a partir de la el·lipticitat molar dividit pel nombre de residus que componen el pèptid o proteïna. En una proteïna o pèptid ens podem trobar amb estructures desordenades o *random coil*, α -hèlix, làmina β o gir β (Figura I.15).

Les bandes característiques de cada estructura apareixen a diferents longituds d'ona i amb diferent intensitat:

- Una estructura desordenada o *random coil* apareix com un mínim intens a 198 *nm*.
- L'estructura d' α -hèlix es caracteritza per dues bandes negatives a 208 i 222 *nm* i una de positiva a 191-193 *nm*.
- La làmina β presenta una banda negativa entre 210-225 *nm* i una de positiva entre 190-200 *nm*.
- El gir β mostra la banda negativa a 200 *nm* i la positiva a 210 *nm*.

Les dades obtingudes de dicroisme circular es poden tractar mitjançant programes informàtics (per exemple, K2D, Contin, Lincomb-Brahms) que permeten una determinació quantitativa de l'estructura secundària dels pèptids (Lobley et al 2002, Whitmore et al., 2004, Greenfield et al., 1996). El percentatge d' α -hèlix també es pot determinar utilitzant el formalisme de Chen (Eq. I.15) (Chen et al., 1972), on s'assumeix que la màxima el·lipticitat teòrica d'un pèptid o proteïna a 222 *nm* depèn del nombre de residus i de l'el·lipticitat a 222 *nm* d'una hèlix d'infinita longitud.

$$\% \alpha - h\grave{e}l i x = \frac{[\theta]}{-39.500[1 - (2.757n)]} \quad (I.15)$$

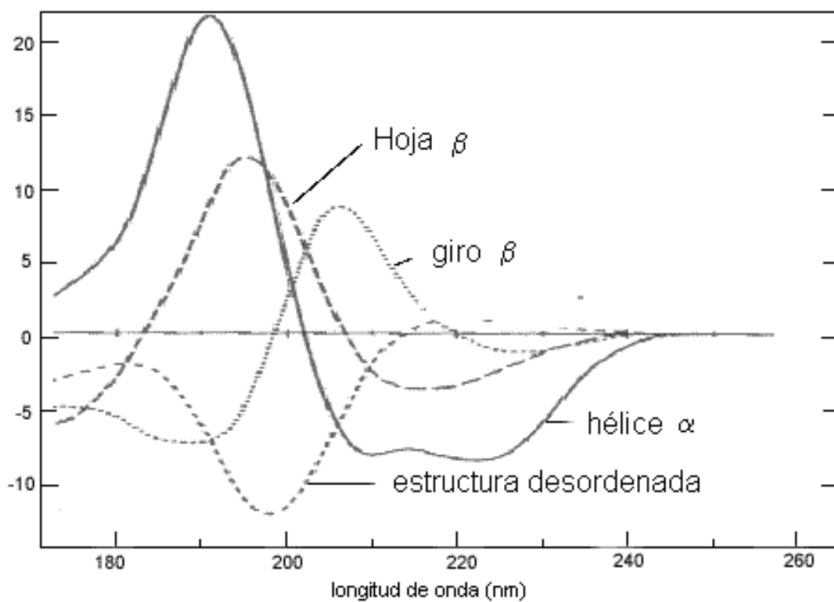


Figura I.15.: Espectres de dicroisme circular de las estructures que es troben en proteïnes i pèptids.

II. OBJECTIUS

Degut a les evidències que la proteïna E2 de l'embolcall del virus GBV-C exerceix una acció inhibidòria sobre el virus VIH, i per tant que la presència d'aquesta proteïna en la sang de l'hoste infectat per GBV-C i VIH pot reduir la progressió de la SIDA i, tenint en compte l'ús potencial dels pèptids sintètics en teràpies antivirals, aquest treball pretén contribuir al coneixement de la interacció molecular de la proteïna E2 de l'embolcall del GBV-C amb membranes cel·lulars.

L'objectiu principal d'aquesta tesi consisteix en la caracterització i estudi de la interacció de diferents pèptids derivats de la proteïna E2 de l'embolcall del GBV-C amb diferents models de membrana.

Els objectius operatius per assolir l'objectiu principal d'aquest treball han estat:

- Selecció de seqüències peptídiques de la proteïna estructural E2 del virus GBV-C, per a l'estudi de la seva interacció amb models de membrana.
- Caracterització fisicoquímica d'aquests pèptids, mitjançant estudis de l'activitat superficial dels pèptids i de la capacitat de formar monocapes estables mitjançant la realització d'isotermes de compressió.
- Estudis d'interacció dels pèptids amb monocapes com a models de membrana: cinètiques de penetració dels pèptids amb monocapes fosfolipídiques, isotermes de compressió dels fosfolípids i pèptids sols, i de monocapes mixtes pèptid/fosfolípid.
- Estudi de la interacció dels pèptids amb bicapes lipídiques (liposomes) mitjançant tècniques biofísiques (calorimetria diferencial d'escombrat, espectroscòpia de fluorescència i espectrometria visible).
- Estudi de la conformació adoptada pels pèptids en diferents mitjans (aquós, mimètic de membrana i diferents models de membrana) mitjançant les tècniques de dicroisme circular, per tractar d'establir una relació entre l'estructura dels pèptids i la seva capacitat d'interacció amb els models de membrana utilitzats.

Els objectius proposats en aquesta tesi s'han assolit mitjançant els estudis publicats en els articles de la secció resultats. En cinc d'aquests articles es van seleccionar 3 potencials epítops de la proteïna estructural E2 del virus GBV-C, mitjançant algorismes teòrics de predicció i es va estudiar la seva capacitat d'interacció amb models de membrana, tant amb liposomes com amb monocapes d'extensió.

Així mateix, s'ha inclòs un cinquè article que si bé no inclou cap pèptid en l'estudi, constitueix un treball que indirectament ha ajudat a conèixer alguna de les tècniques biofísiques emprades. El treball fa un estudi sobre una de les sondes que s'ha empleat en les tècniques de caracterització d'alguns dels pèptids treballats a la present tesis.

En la secció que ve a continuació s'exposen aquests articles de forma íntegra precedits per un breu resum en català.

III. RESULTATS

Com a resultats d'aquesta tesi, s'exposen els següents articles amb un breu resum en català de cadascun d'ells.

Article 1: Alay, M., Busquets, M. A., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Prat, J. (2002) Merocyanine 540 for spectroscopic analysis of the interaction of peptide sequence of hepatitis G virus with liposomes *Luminescence* 17: 263-264.

Article 2: Alay, M., Prat, J., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Busquets, M. A. (2003). Spectroscopic analysis of the interaction of a peptide sequence of Hepatitis G virus with bilayers *Talanta*, 60: 269-277.

Article 3: Alay, M., Asunción, A. M., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M. A. (2005). Analysis of the effect of a peptide sequence of the E2 protein (HGV/GBV-C) on the physicochemical properties of zwitterionic and negatively charged bilayers. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. 20: 445-450.

Article 4: Alay, M., Alsina, M. A., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M. A. (2006). Interaction of E2 (GBV-C/HGV)-derived peptides with liposomes: fluorescence anisotropy and fluorescence resonance energy transfer methods. *Luminescence* 21: 360-361.

Article 5: Alay, M., Haro, I., Alsina, M. A., Girona, V., Prat, J., & Busquets, M. A. (2013). Interaction of two overlapped synthetic peptides from GB virus C with charged mono and bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105: 7-13.

Article 6: Alay, M., Prat, J., Alsina, M. A., & Busquets, M. A. (2004). Effect of Merocyanine 540 on Langmuir-Blodgett films and liposomes of zwitterionic, anionic and cationic lipid composition. *Journal de Physique IV* 113: 3-6

Article 1

Merocianina 540 per a l'anàlisi de les interaccions de seqüències peptídiques del virus de l'Hepatitis G amb liposomes

Alay, M., Busquets, M. A., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Prat, J.

Departament de Físicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Alay, M., Busquets, M. A., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Prat, J. (2002) Merocyanine 540 for spectroscopic analysis of the interaction of peptide sequence of hepatitis G virus with liposomes *Luminescence* 17: 263-264.

Resum

Les propietats d'absorció i fluorescència de sondes intrínseques i extrínseques s'han utilitzat àmpliament per a estudiar la interacció de molts fàrmacs amb membranes de distinta composició. Tot i que la presència d'una sonda externa pot pertorbar el sistema en estudi, en general, la informació que es derivada del seu ús ha demostrat ser molt útil en la predicció de l'efecte farmacològic d'una àmplia gamma de molècules. La merocianina 540 (MC₅₄₀) és una sonda aniònica i amfipàtica, que es pot incorporar fàcilment a les bicapes. En concret, ha demostrat ser útil per a determinar les propietats en la seva superfície i per a examinar l'espai entre els caps polars dels lípids que les formen. Les característiques espectrals d'aquesta sonda, tant pel que fa al seu comportament en el visible com en fluorescència, depèn en gran mesura del tipus de medi en el que es troba. En el present estudi, es descriu la interacció d'una seqüència peptídica corresponent al fragment 125-139 de la proteïna estructural E2 del GBV virus C amb liposomes unilamel·lars grans (LUV) de DPPC o DPPG que tenen incorporada MC₅₄₀ com a sonda externa. S'han aprofitat les propietats espectrals d'aquesta sonda, per tal d'estudiar els possibles efectes pertorbadors que exerceix la seqüència peptídica E2 (125-139) sobre les bicapes lipídiques. Els resultats, han indicat que el pèptid té un lleuger efecte sobre les propietats espectrals de la MC₅₄₀ incorporada en els LUVS tant de DPPC com de DPPG i que, per tant, sembla que el pèptid pot modificar les propietats superficials de la bicapa, cosa que ja s'havia mostrat anteriorment en estudis de monocapes lipídiques.

Merocyanine₅₄₀ for spectroscopic analysis of the interaction of a peptide sequence of hepatitis G virus with liposomes

M. Alay,¹ M. A. Busquets,¹ I. Haro,² N. Rojo,² M. A. Alsina¹ and J. Prat¹

¹Physical Chemistry Department. Faculty of Pharmacy. Avda Joan XXIII, s/n E-08028 Barcelona. Spain. E-mail: alsina@farmacia.far.ub.es

²Department of Peptide & Protein Chemistry, IIQAB.CSIC, Jordi Girona Salgado, 18, E-08034 Barcelona, Spain

The absorption and fluorescence properties of molecular probes have been extensively used to monitor drug interaction with membranes. Although the presence of an external probe can disturb the system under study, in general, the information derived from its analysis has shown to be useful in predicting the pharmacological effect of a wide range of molecules (1). In the present study, we describe the interaction of a peptide sequence corresponding to the fragment 125–139 of the E2 structural protein of the hepatitis G virus (HGV) with lipid bilayers by using merocyanine₅₄₀ (MC₅₄₀) as external probe. MC₅₄₀ is an amphipathic anionic probe that has been shown to be useful to examine lipid head group spacing as well as the surface properties of the bilayers, where it can be easily incorporated (2, 3). Its spectral characteristics, both visible and fluorescence, are highly dependent on the media. In our case, these properties have been taking into consideration for studying the perturbing effects of the peptide on liposomes, a bilayer biomimetic system.

MATERIALS AND METHODS

The peptide with a sequence of (CTIAALGSSDRDTVV) was manually synthesized, purified and characterized as described elsewhere. Large unilamellar vesicles (LUVs) of 1,2-dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholine (DPPC) or 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DPPG) (both from Avanti Lipids) containing MC₅₄₀ were prepared by the extrusion method (4) (Northern lipids Inc., Canada) by passing the lipid dispersion (10 mmol/L Tris, pH 7.4) 10 times through 25 mm polycarbonate filters with 0.1 µm pore size (Nucleopore Corp., Canada). All extrusion procedures were conducted at 45°C, above the transition temperature of the lipids. Liposome size was 120 ± 3 with a polydispersity index of 0.10 ± 0.02. Final lipid concentration, assessed by phospholipid analysis, was 4 mmol/L. MC₅₄₀ (Sigma) and was incorporated to the lipid bilayer by incubating the probe with the preformed LUVs at 45°C for 30 min. The final ratio MC₅₄₀/phospholipid was 1:300. Fluorescence experiments were performed in an AB-2 spectrofluorimeter SLM-Aminco with excitation and emission slit-widths of 4 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Absorption spectra of MC₅₄₀ containing DPPC or DPPG LUVs with or without peptide, were recorded to determine the maximum absorption wavelength (not shown). Spectra shape was strongly dependent on the lipid composition, thus indicating a different location of MC₅₄₀ in the bilayer. However, both DPPC and DPPG spectra showed two maxima corresponding to the dimer (lower wavelength) and monomer form of the probe, respectively. For MC₅₄₀/DPPC LUVs they were 530 and 566 nm and for MC₅₄₀/DPPG LUVs, 500 and 530 nm. Fig. 1 shows the fluorescence spectra resulting from the titration of MC₅₄₀ containing DPPC liposomes with increasing concentrations of E2 (125–139) peptide (0, 12 µmol/L, 59 µmol/L and 216 µmol/L) at λ_{ex} of 530 (a)

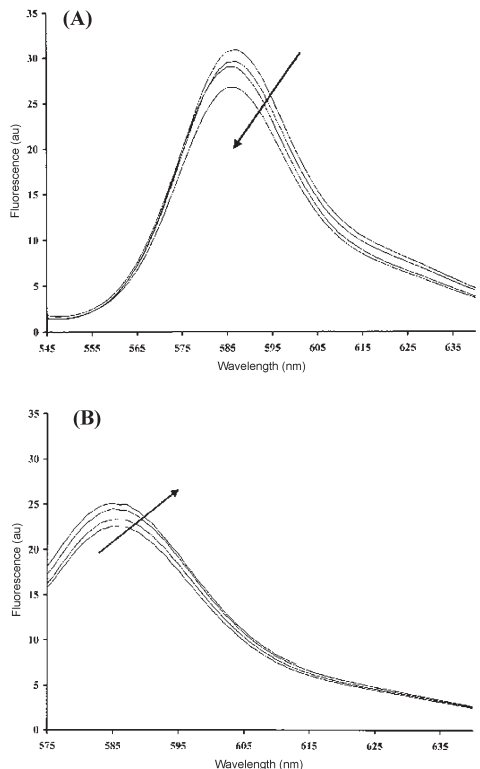


Figure 1. Effect of increasing (125–139) E2 peptide concentration on fluorescence spectra of MC₅₄₀ incorporated into DPPC LUVs. (A) λ_{ex} = 530 nm; (B) λ_{ex} = 566 nm. The arrow indicates the direction of increasing peptide concentration (0, 12, 59 and 216 µmol/L, respectively).

and 566 (b) nm. In both cases, maximum emission wavelength was not affected by peptide presence. However, when $\lambda_{\text{ex}} = 530\text{nm}$, peptide addition resulted in a slight decrease in fluorescence intensity. This fact was concomitant with an increase in the monomer form assessed by the fluorescence intensity increase observed when exciting the sample at $\lambda_{\text{ex}} = 566\text{nm}$. According to these results, the peptide modifies bilayer organization, locating the probe in the bilayer interface parallel to the surface (5). As indicated below, the monomer form could have a quenching effect on dimer fluorescence. Control experiments incubating MC₅₄₀ with the same peptide concentrations did not show any change on fluorescence spectra.

On the other hand, spectra for MC₅₄₀ in DPPG LUVs showed a decrease in fluorescence intensity upon peptide addition when exciting at 530 nm (monomer band) while was not significantly affected when λ_{ex} was 500 nm (dimer band) (not shown). Considering the results obtained in the absorption spectra, in which we observed a decrease in the monomer peak (530 nm) concomitant with an increase in the intensity of the dimer peak (500 nm) after peptide addition, fluorescence decrease can be easily explained. Peptide presence increases dimer concentration, whose emission properties are characterized by a lower quantum yield than the monomer (6), in fact that appears together with a quenching of the monomer emission. Also, the absorption spectra shape of MC₅₄₀ in presence of DPPG LUVs is very similar to that observed in aqueous media, thus indicating a low degree of probe incorporation into the bilayer, probably due to repulsion forces as both lipid and probe are anionic. The peptide presence probably favours probe exclusion from the bilayer and dimer formation.

These results indicate that the peptide has a slight effect on the properties of the dye incorporated into DPPC and DPPG LUVs, and thus can probably modify bilayer surface properties. Complementary studies with lipid monolayers are in agreement with these data. Further experiments with calorimetric techniques are being performed in order to gain more insight into the interaction process.

REFERENCES

1. Lakowicz JR. *Principles in Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.
2. Lelkes PI, Miller IR. Perturbations of membrane structure by optical probes: I. location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. *J. Membrane Biol.* 1980; **52**: 1–15.
3. Langner M, Hui SW. Merocyanine 540 as a fluorescence indicator for molecular packing stress at the onset of lamellar-hexagonal transition of phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1415**: 323–330.
4. New RRC. Preparation of liposomes. In *Liposomes: a Practical Approach*, New RRC (ed.). IRL Press: Oxford, 1990; Chapter 2.
5. Kaschny P, Goñi FM. The components of merocyanine 540 absorp-

tion spectra in aqueous, micellar and bilayer environments. *Eur. J. Biochem.* 1992; **207**: 1085–1091.

6. Bernik D, Tymczynszyn E, Daraio ME, Negri RM. Fluorescent dimers of merocyanine 540 (MC540) in the gel phase of phosphatidylcholine liposomes. *Photochem. Photobiol.* 1999; **70**: 40–48.

Intrinsic ciprofloxacin fluorescence in acidic micellar media

A. Vercauteren, T. Vankeirsbilck, G. Van der Weken and W. R. G. Baeyens

Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium. E-mail: willy.baeyens@rug.ac.be

Ciprofloxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-quinoline-3-carboxylic acid), a 4-quinolone derivative, is one of the newer compounds of the fluoroquinolone class of antibacterial agents (Fig. 1). Ciprofloxacin has a wide spectrum of activity against Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* and *Neisseria* spp. but also against *Staphylococcus* and some other Gram-positive bacteria. Several articles have been published on the determination of ciprofloxacin in different media by HPLC with fluorimetric detection (1–3).

EXPERIMENTAL

Chemicals

Ciprofloxacin hydrochloride was obtained from Alcon-Couvreur (Puurs, Belgium). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Tetramethylammonium bromide (TMAB), tetrabutylammonium bromide (TBAB), β -cyclodextrin (BCD) and α -cyclodextrin (ACD) were obtained from Janssen Chimica (Beerse, Belgium). 1-Octanesulphonic acid sodium salt (OSH) and 1-heptanesulphonic acid sodium salt (HSA) were obtained from Acros (Geel, Belgium).

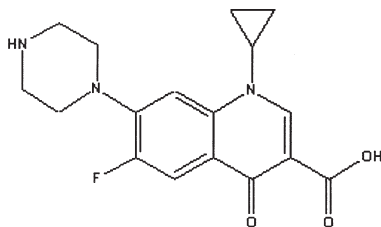


Figure 1. Chemical structure of ciprofloxacin.

Article 2

Anàlisi espectroscòpica de la interacció d'una seqüència peptídica del virus de l'Hepatitis G amb bicapes.

Alay, M., Prat, J., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Busquets, M. A.

Departament de Físicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de
Barcelona.

Alay, M., Prat, J., Haro, I., Rojo, N., Alsina, M. A., & Busquets, M. A.
(2003). Spectroscopic analysis of the interaction of a peptide sequence of
Hepatitis G virus with bilayers. *Talanta*, 60: 269-277.

Resum

Per determinar la interacció de la seqüència peptídica 125-139 de la proteïna E2 del GBV virus C, amb bicapes lipídiques, s'ha utilitzat una sonda externa, merocianina 540 (MC₅₄₀) prèviament incorporada a Liposomes unilamel·lars grans (LUVs) o Liposomes unilamel·lars petits (SUVs) de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC). S'han realitzat estudis d'espectroscòpia d'UV-visible, fluorescència i anisotropia. Quan la MC₅₄₀ s'incorpora a les bicapes, el seu espectre d'absorció mostra dos màxims, un corresponent a la proporció de sonda en forma de monòmer (570 nm) i un altre a la forma dímera (530 nm). Els canvis en el microambient de la sonda es reflecteixen per una modificació en la posició i/o la intensitat d'aquests màxims. L'addició de quantitats creixents de pèptid a la solució de liposomes i MC₅₄₀ ha donat com a resultat una lleugera disminució de la relació A₅₇₀/A₅₃₀ indicant d'aquesta manera un canvi en el repartiment de la MC₅₄₀ a la membrana, que passa d'un entorn hidròfob a un entorn més hidròfil. Aquesta conclusió s'ha reforçat amb el càlcul de la constant de dimerització aparent (K_{app}), ja que els resultats obtinguts a partir del seu càlcul han mostrat un augment en la formació de formes dímeres de la sonda. Així mateix, els resultats obtinguts amb aquestes mesures, han estat reforçats amb els obtinguts en els espectres de fluorescència, i en la constant d'anisotropia que indiquen que el pèptid ha estat capaç de desplaçar a la MC₅₄₀, del seu lloc inicial en la bicapa. Els resultats amb SUVs o LUVs van ser similars, de forma que el grau de curvatura de les membranes no sembla jugar un paper important en l'activitat d'aquests pèptids. Finalment, es pot afirmar que aquests resultats reflecteixen la capacitat del pèptid per interactuar amb membranes biomimètiques en la regió del cap polar dels lípids que les formen.



Spectroscopic analysis of the interaction of a peptide sequence of Hepatitis G virus with bilayers

M. Alay^a, J. Prat^a, I. Haro^b, N. Rojo^b, M.A. Alsina^a, M.A. Busquets^{a,*}

^a Physical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Avda Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Peptide and Protein Chemistry, IQAB-CSIC, Jordi Girona Salgado 18, 08034 Barcelona, Spain

Received 17 June 2002; received in revised form 26 September 2002; accepted 10 October 2002

Abstract

Merocyanine 540 (MC540) has been used as external probe to determine the interaction of the peptide sequence 125–139 corresponding to the E2 protein of Hepatitis G virus, with lipid bilayers. The probe was incorporated into large unilamellar vesicles (LUVs) or small unilamellar vesicles (SUVs) of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC). When incorporated into bilayers, MC540 shows two absorption maxima corresponding to the monomer (570 nm) and dimer (530 nm) form of the probe. Changes in the probe microenvironment are reflected by a modification in the position and/or intensity of these maxima. Addition of increasing amounts of peptide resulted in a slight decrease of the ratio A570/A530 thus indicating a change in MC540 partition into the membrane, going from a hydrophobic to a more hydrophilic environment. This effect was concomitant with an increase in dimer formation as stated from the values of the apparent dimerization constant (K_{app}) obtained. Fluorescence spectra as well as steady state anisotropy measurements were in agreement with the above results indicating that the peptide was able to relocate the probe and displacing MC540 from its initial location into the bilayer. Results with SUVs or LUVs were similar for what curvature does not seem to play any role on peptide activity. These results reflect the ability of peptide to interact with biomimetic membranes in the lipid head group region.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Hepatitis G; Peptide; Merocyanine 540; Liposomes

1. Introduction

Merocyanine 540 (MC540) is an amphipathic anionic molecule with a well-defined absorption and fluorescence properties, that has been used as

a probe of model and biological membranes [1,2]. The negative charge of the probe determines its location at or near the membrane interface, slightly above the domain of the glycerol backbone of neutral and charged phospholipids as assessed by the extinction coefficient and maximum wavelength [3]. Only its neutralization, as reported by Bilski et al. [4] will allow a deeper probe penetration into the non-polar hydrophobic membrane interior.

* Corresponding author. Tel.: +34-93-402-4556; fax: +34-93-403-5987.

E-mail address: busquets@farmacia.far.ub.es (M.A. Busquets).

The spectral properties of MC540 depend strongly on the fluidity and polarity of its environment. In aqueous solution, MC540 spectra shows two main maxima centered at ~ 500 and ~ 530 nm attributed to the dimer and monomer form of the probe, respectively. In a hydrophobic environment, for instance a micellar solution or a lipid bilayer, these maxima are red-shifted to ~ 530 and ~ 570 nm for the dimer and monomer, respectively. Therefore, the absorption intensity as well as the position of these maxima are strongly dependent on the mono or bilayer interfacial packing density. When the probe locates in a more hydrophobic environment, the A570 increases whereas the A530 is slightly reduced. For that reason, the ratio A570/A530 indicates MC540 partitioning into the two media. Consequently, MC540 monomer–dimer equilibrium is relevant to the packing properties of the bilayers and can be used as an indication of lipid head group spacing as well as the surface properties of the membranes [5]. Similar effects are observed in fluorescence measurements, when the probe is located in a hydrophobic environment, its emission maximum is red-shifted and the quantum efficiency is enhanced. Changes in MC540 fluorescence maximum or/and intensity give information about membrane microenvironment [6,7] and for that reason it has been used to report modifications of molecular packing upon the addition of cholesterol [8] or fructans [5]. Fluorescence is higher in fluid membranes above the main phase transition of the membrane lipid(s), than in the gel state.

Most of the studies performed with MC540 were done in presence of model bilayers, mainly liposomes. Quantitative probe incorporation into bilayers is achieved by incubating MC540 with lipid vesicles above the main transition temperature (from gel to liquid crystalline state) of the lipid as a consequence of the lower degree of packing of the bilayer. Below this temperature, the liposomes can be considered approximately as a closed shell for the entrance of the probe. Taking into consideration MC540 properties, we have optimized a membrane model consisting of MC540 incorporated into small unilamellar vesicles (SUVs) and large unilamellar vesicles (LUVs) of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

(DPPC) to study lipid-peptide interaction. The selected synthetic peptide is a potential epitope of the GB virus C/Hepatitis G virus corresponding to the fragment 125–139 of the structural protein E2 of the virus. The peptide was chosen to get insight in its role in the proliferation and infection mechanism of the virus by measuring its effect on the absorption and fluorescence spectra as well as the steady state anisotropy of MC540 incorporated into liposomes.

Results from experiments indicate that the peptide influences the physical state of the membrane lipids in the headgroup and interfacial regions.

2. Experimental

2.1. Materials

DPPC was obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). MC540 was from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals were of analytical grade and water twice distilled. The peptide E2 (125–139) with a sequence of (CTIAAL-GSSDRDTVV) was synthesized manually as described elsewhere. It was purified by preparative high performance liquid chromatography (HPLC) on a Shimadzu chromatograph equipped with a C₈-silica column and characterized by analytical HPLC, amino acid analysis and electrospray mass spectrometry.

Concentrations of MC540 and peptide were determined gravimetrically with a high-precision electrobalance (Precisa, Model 40SM-200A, Spain).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of liposomes

Lipids from chloroform solutions were dried in a round bottom flask under vacuum and kept overnight into high vacuum to remove any residual solvent trace. Multilamellar liposomes (MLVs) were prepared by dispersing a known weight of dry lipids in a Tris 10 mM buffer solution at pH 7.3. SUVs were prepared by bath sonication (Lab Supplies, Hicksville, NY; Model

G112SPIT) of a MLV suspension. Sonication was carried out under a Nitrogen stream, at 1 min intervals alternating with 1 min rest, until a clear solution was obtained. LUVs of the same compositions were prepared by extrusion of the coarse MLV dispersion ten times through polycarbonate membrane filters of 100 nm pore (Northern lipids Inc. Canada). Liposome size was checked by dynamic light scattering (Malvern Autosizer) and was found to be 50 ± 0.2 nm for SUVs and 120 ± 3 nm for LUVs. For both samples polydispersity index was about 0.1. In all cases, liposomes were prepared at a temperature above the main transition from gel to liquid crystalline state of the lipids. Vesicles were used within 10 h. Final lipid concentration, assessed by phospholipid analysis [9], was 3.5 mM. Liposome suspensions were adjusted for spectrometric studies to 90 μ M phospholipid.

2.2.2. Merocyanine incorporation into liposomes

MC540 was added to the preformed liposomes and the mixture was incubated at ~ 45 °C, above the main phase transition temperature of the phospholipid, during 15 min. Then, the sample was cooled down to room temperature (gel state) and allowed to equilibrate during 30 min at 20 °C. This procedure showed a significant retention of the monomer form of the probe in the gel phase necessary structure for further determinations. Several MC540/DPPC ratios were assayed to get the optimal absorption signal.

2.2.3. Absorption measurements

Absorption spectra were obtained in a Shimadzu UV-2401 PC spectrophotometer. Absorption spectra were recorded between 400 and 650 nm with 1-nm steps. The peptide was added from a stock solution to a cuvette containing LUVs or SUVs with MC540, to reach the desired peptide concentrations. Dye-free liposome suspension served as reference to compensate for turbidity effects. The corresponding spectra were corrected by taking as zero the absorbances at 600 nm of the MC/540 liposomes. The absorbance value at 569 nm obtained after these corrections was used to calculate the apparent dimerization constant (Equation 1 and 2) as described by Bernik and

Disalvo [10]:

$$[\text{monomer}] = \frac{A - [\epsilon^D \times C/2]}{\epsilon^M - \epsilon^D/2} \quad (1)$$

$$[\text{dimer}] = \frac{C - [\text{monomer}]}{2} \quad (2)$$

where A is the absorbance at 569 nm, ϵ^M ($1.511 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and ϵ^D ($5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) are the molar absorption coefficient of the monomer and dimer at 569 nm, respectively [11], and C is the final MC540 concentration into the cuvette. Absorption measurements were recorded in a temperature controlled manner with a circulating water bath. Each sample was submitted to a heating cycle from ~ 20 to ~ 50 °C.

2.2.4. Fluorescence measurements

The fluorescence intensity was measured in an AB-2 spectrofluorimeter SLM-Aminco with constant stirring. MC540 spectra were recorded with an excitation wavelength of 566 nm over an emission range of 570–620 nm with an excitation and emission slit-widths of 4 nm. The sensitivity (PTM voltage) was adjusted to 1% for the Raman peak from the buffer blank at the same excitation wavelength. Each sample was submitted to a heating cycle from ~ 20 up to ~ 50 °C followed by a cooling cycle to the initial temperature, at 1 min intervals allowing for thermal equilibration. All solutions were stirred continuously during the measurements. Cuvette temperature was maintained with a peltier system piloted by a computer program (Microbeam S.A., Barcelona, Spain), and the temperature was registered with a thermocouple inserted into the cuvette. The concentration of MC540 was within the range of linear relation between fluorescence intensity and the concentration of the dye. Spectra were corrected from inner filter effect and scattering by subtracting the contribution from vesicles [12].

2.2.5. Steady-state anisotropy of membrane lipids

The dynamics of lipids in liposome membranes in the presence of different concentrations of peptide was determined by measuring the degree of depolarization of the fluorescence emitted from MC540. Experiments were performed with the

same spectrofluorimeter above described equipped with L-format polarizers. The excitation and emission wavelengths were 560 and 580 nm, respectively. Anisotropy of MC540 labeled vesicles with or without peptide (control) was measured automatically. Fluorescence anisotropy (r) was calculated automatically by the software provided with the instrument, according to:

$$r = (I_{Vv} - GI_{Vh}) / (I_{Vv} + 2GI_{Vh})$$

where I_{Vv} and I_{Vh} are the intensities of the emitted polarized light with the emission polarizer parallel or perpendicular to the excitation polarizer, respectively. Anisotropy values were corrected for dependencies in the detection system (G-factor correction, $G = I_{Hv}/I_{Hh}$). Experiments were performed in the same temperature conditions as for fluorescence intensity measurements.

3. Results and discussion

3.1. Peptide selection and MC540 incorporation into liposomes

E2 (125–139) peptide was selected after comparing the structural proteins of GB virus C of several virus isolates of different origin by means of the multiple sequence alignment CLUSTALW program. A 99% of homology was obtained for the above described E2 peptide sequence. Moreover, E2 (125–139) was also selected by determining the exposed regions on the virus surface according to the hydrophilicity and accessibility profiles of Hopp and Woods [13] and Janin [14], respectively. DPPC was the chosen phospholipid to prepare model membranes for being very similar to the most common component of the biological membranes, phosphatidylcholine, and because of its well defined transition temperature (T_m) from the gel to the liquid crystalline state. Several MC540/DPPC ratios: 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:300 and 1:500 were analyzed in order to get the best absorption signal as explained below.

3.2. Absorption measurements

Before starting the experiments, MC540 incorporation into the bilayer was assessed by recording its absorption spectra. MC540/DPPC ratios lower than 1:200 showed a low absorbance signal fact that was substantially improved by working at the ratio 1:300. In that case, final MC540 concentration into the cuvette was 5×10^{-6} M. Spectra showed clearly two bands, a predominant one centered at 570 nm corresponding to the monomer form, and a less intense at 530 nm, characteristic of the dimer. Peptide addition did not change the shape of the spectra but showed a hypochromic effect as indicated in Fig. 1.

It is also interesting the effect of the temperature on MC540 absorption spectra because it gives information about probe relocation and membrane fluidity. Intensity of the monomer maximum increases with temperature reflecting a more fluid environment and increased head group space or packing defects. As an example, Fig. 2 shows the absorption spectra of MC540-DPPC SUVs incubated with 12 μ M (125–139) E2 at different temperatures. The temperature range covers the interval going from the gel to the fluid state of DPPC. In the gel state, the lipid bilayer is rigid and MC540 mobility is restricted. MC540 distributes between the back bone of the bilayer as a monomer and in the surface as a dimer. An increase in temperature up to the main transition from gel to liquid crystalline state ($T_m \sim 41^\circ\text{C}$), makes the bilayer much more flexible as a consequence of an increase of the phospholipid acyl chains mobility. Thus, MC540 can relocate into the backbone of the lipid acylchains [11] changing its partitions into the membrane. The equilibrium monomer \rightleftharpoons dimer reverts towards the direction of the monomer form. The figure shows also an isosbestic point corresponding to the equilibration between the membrane bound monomer and dimer.

Addition of E2 to liposomes decreased the intensity of MC540 maxima and the percent of the monomeric insertion thus indicating that the peptide has an effect on the group packing of the membrane. The possible mechanism of peptide interaction could be explained as a superficial

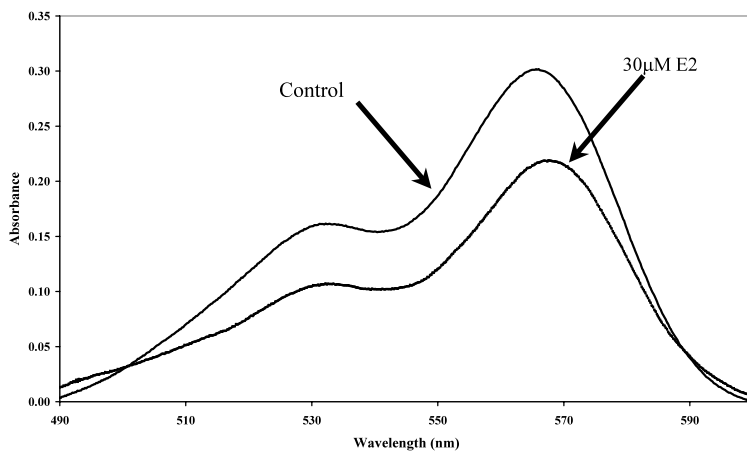


Fig. 1. Visible absorption spectrum of MC540-DPPC SUVs before (control) and after (125–139) E2 addition. Final peptide concentration 30 μM . MC540/DPPC ratio = 1:300. The experiment was performed at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) under constant stirring.

event in which the peptide displaces MC540 from the lipid chains up to the surface in such a way that

dimer formation is favored. This fact is in agreement with previous studies performed with

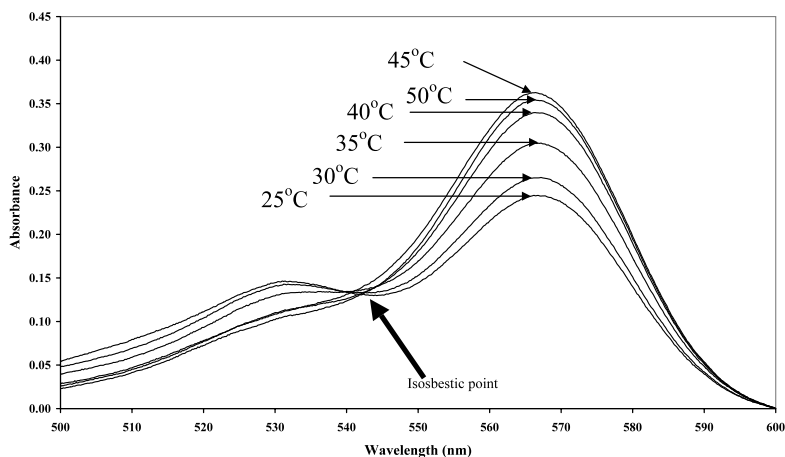


Fig. 2. Visible absorption spectrum of MC540-DPPC SUVs in presence of 12 μM (125–139) E2 in function of the temperature. At temperatures below 41°C the bilayer is in a rigid state (gel) while above this value it is in a fluid state (liquid crystal). MC540 concentration in the cuvette: 5×10^{-6} M. Probe:DPPC ratio = 1:300. All solutions were stirred continuously during the measurements. Control experiments with MC540-DPPC SUVs gave spectra with the same shape but different intensities in the maximum wavelengths. The arrow indicates the isosbestic point for equilibration between the membrane bound monomer and dimer.

Langmuir–Blodgett technique (results unpublished) that showed not only the ability of the peptide to accumulate into an air/water interface but also its insertion into lipid monolayers.

As indicated before, the degree of partitioning of the probe into membranes can be estimated from the absorbance ratio A570/A530. Fig. 3 shows the ratio as a function of the peptide concentration and temperature. In general, peptide addition results in a slight but significant decrease of the ratio. At temperatures below the T_m , ratio increases with increasing peptide concentration. However, above the T_m there is no clear trend, ratio is always lower than for the control but seems to be independent of peptide concentration. The change on MC540 orientation makes the probe more susceptible to dimer formation as was assessed by calculating the apparent dimerization constant. Table 1 shows the $K_{d(\text{app})}$ values for MC540-SUVs with increasing peptide concentration in a temperature range from 20 to 50 °C. As expected and for all the samples, values are higher

at low temperatures. Peptide addition results in a slight increase in the $K_{d(\text{app})}$ confirming the probe relocation into the bilayer making easier dimer formation. According to the table, maximum values are those corresponding to the peptide concentration of 30 μM , thus indicating like a bilayer saturation. However, this fact could be related to the turbidity increase of the sample observed with higher peptide concentrations. Turbidity is a result of liposome fusion or aggregation fact that can also change probe partitioning into the bilayer. Results obtained with LUVs (data not shown) were very similar to those of SUVs for what curvature does not seem to have any influence on probe relocation under these experimental conditions.

3.3. Fluorescence measurements

As previously described [4,11], the fluorescence intensity of MC540 in the presence of fluid and loosely packed membranes is considerably higher

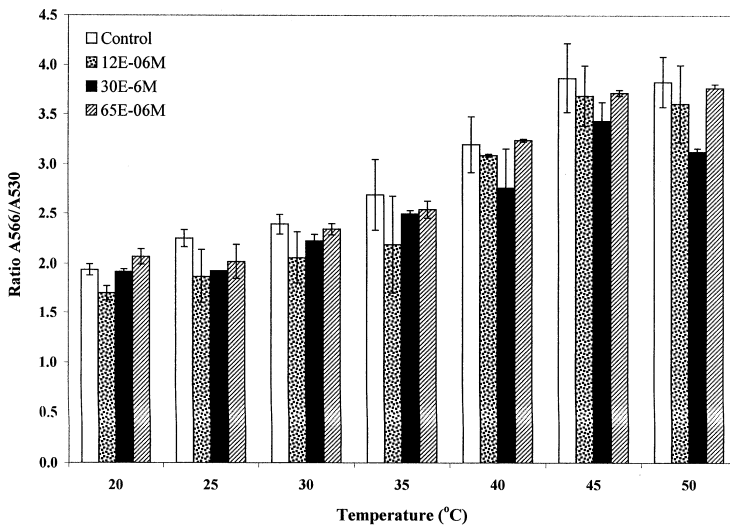


Fig. 3. Effect of various (125–139) E2 peptide concentrations on the partitioning of MC540 between Tris–HCl 10 mM, pH 7.4 and DPPC vesicles in function of the temperature expressed as the ratio A566/A530. A reduction in the absorbance ratio indicates reduced partitioning of the dye into the lipid headgroup region of the membranes. MC540 concentration in the cuvette: 5×10^{-6} M. Probe:DPPC ratio = 1:300. The means \pm S.D. of three parallel samples are shown.

Table 1
Effect of (125–139) E2 on the apparent dimerization constant ($K_{d(\text{app})}$) of MC540 in DPPC SUVs

Temperature (°C)	Apparent dimerization constant ($K_{d(\text{app})}$)			
	Control	12 μM E2	30 μM E2	65 μM E2
20	$4.0 \pm 0.10 \times 10^5$	$8.7 \pm 0.09 \times 10^5$	$10 \pm 0.11 \times 10^5$	$9.6 \pm 0.12 \times 10^5$
25	$4.5 \pm 0.09 \times 10^5$	$8.6 \pm 0.13 \times 10^5$	$9.5 \pm 0.09 \times 10^5$	$8.1 \pm 0.13 \times 10^5$
30	$3.5 \pm 0.03 \times 10^5$	$7.5 \pm 0.09 \times 10^5$	$8.6 \pm 0.08 \times 10^5$	$8.8 \pm 0.09 \times 10^5$
35	$2.7 \pm 0.10 \times 10^5$	$5.5 \pm 0.10 \times 10^5$	$6.9 \pm 0.14 \times 10^5$	$6.2 \pm 0.11 \times 10^5$
40	$2.2 \pm 0.08 \times 10^5$	$2.7 \pm 0.03 \times 10^5$	$4.1 \pm 0.05 \times 10^5$	$5.2 \pm 0.07 \times 10^5$
45	$1.8 \pm 0.09 \times 10^5$	$2.6 \pm 0.09 \times 10^5$	$3.6 \pm 0.12 \times 10^5$	$2.9 \pm 0.09 \times 10^5$
50	$2.0 \pm 0.02 \times 10^5$	$2.5 \pm 0.12 \times 10^5$	$3.4 \pm 0.14 \times 10^5$	$2.9 \pm 0.09 \times 10^5$

Values of $K_{d(\text{app})}$ were calculated by means of the expression $K_{d(\text{app})} = [\text{D}]/[\text{M}]^2$ and are the mean of three independent determinations. [D] and [M] are the dimer and the monomer concentration of MC540 in the membrane phase [8].

than that in the presence of well-organized (gel phase) bilayers. We have measured the intensity of MC540 at constant lipid and dye concentrations but at various temperature. The dependence of fluorescence intensity of MC540 on temperature in the presence of DPPC LUVs with and without peptide is shown in Fig. 4. Maximum emission wavelength is not affected by peptide presence or temperature. However, peptide addition resulted in a decrease in fluorescence intensity at temperatures above 30 °C. These results are one more

indication of probe relocation by temperature effect and peptide presence. Fluorescence of the probe in SUVs the same trend although increase was not so relevant and was not significantly affected by E2 (figure not shown).

3.4. Steady-state fluorescence anisotropy of membrane lipids

Up to now there is only one report in the literature describing MC540 fluorescence aniso-

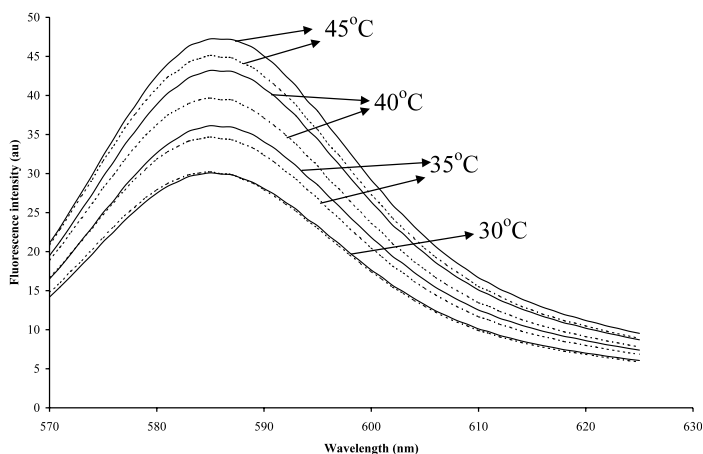


Fig. 4. Fluorescence intensity of MC540-LUVs with (broken line) or without peptide (continuous line) as a function of temperature. Peptide concentration in the cuvette was 12 μM (125–139) E2. $\lambda_{\text{exc}} = 568$ nm. All solutions were stirred continuously during the measurements.

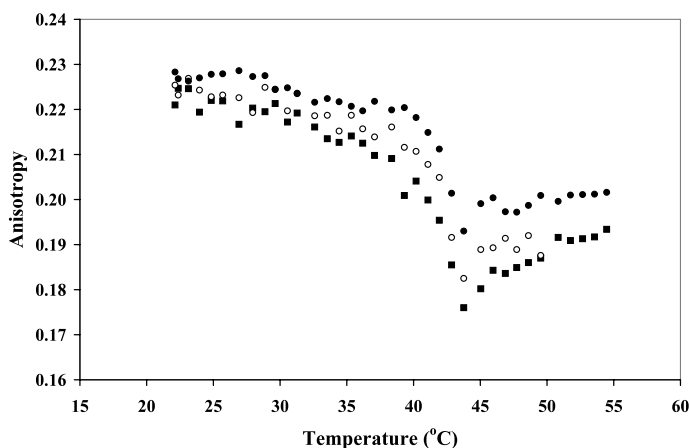


Fig. 5. Temperature dependence of the steady-state fluorescence anisotropy of MC540 labeled DPPC LUVs. Control: ■; 12 μM (125–139) E2: ○ and 30 μM (125–139) E2: ●. MC540 concentration in the cuvette: 5×10^{-6} M. Probe:DPPC ratio = 1:300. All solutions were stirred continuously during the measurements.

ropy decay in polymer-surfactant aggregates [15,16]. However, there are no data about steady-state fluorescence measurements with liposomes. The purpose of this experiment was to measure the ability of the monomer to move into the bilayer upon temperature or/and peptide presence. Fig. 5 shows the temperature dependence of the anisotropy values for LUVs vesicles in absence and presence of 12 and 30 μM peptide. Higher peptide concentrations resulted in very turbid samples for what results were not trustable and are not shown. Although initially anisotropy signal is not very high, there is a clear change in this value in the proximity of T_m ($\sim 41^\circ\text{C}$). For that reason we considered the system suitable for study. The anisotropy value, indicative of bilayer rigidity, is higher at temperatures below than above T_m . This is related to probe mobility into the bilayer. At low temperatures, the probe is trapped into the bilayer and its mobility is restricted. As said before, when temperature increases the bilayer becomes more flexible and the molecule is free to move. All the curves follow a similar trend. Initially r has a value between 0.22 and 0.23 and has a tendency to decrease slowly until the vicinity of T_m . Then, there is a sharp decrease followed by an increase.

This last change could be explained by the fact that MC540 monomer form concentration increases at high temperatures. Although according to the shape of the plots peptide seems to rigidify the membrane since r values are higher than those of the control, we can not assure that fact. In one hand, peptide causes a relocation of the probe into the bilayer but the remaining MC540 molecules could have a restricted movement by peptide proximity. On another hand, higher r values could simply be due to liposome aggregation. Further studies with other probes that are located at different depth of the membrane are being under study to clarify this result and to get more information about peptide interaction with bilayers. Results with SUVs were practically identical.

Acknowledgements

This work was funded by the grant BQU2000-079-C02-01 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain).

References

- [1] M. Langner, S.W. Hui, *Biochim. Biophys. Acta* 1415 (1999) 323.
- [2] D.K. Hinch, A.E. Oliver, J.H. Crowe, *Biophys. J.* 77 (1999) 2024.
- [3] P.I. Lelkes, I.R. Miller, *J. Membr. Biol.* 52 (1980) 1.
- [4] P. Bilski, T. McDevitt, C.F. Chignell, *Photochem. Photobiol.* 69 (1999) 671.
- [5] G. Vereyken, V. Chupin, R.A. Demel, S.S.M. Smeeckens, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* 1510 (2001) 307.
- [6] P.I. Lelkes, I.R. Miller, *J. Membr. Biol.* 52 (1980) 1.
- [7] P. Kaschny, F.M. Gofñi, *Eur. J. Biochem.* 207 (1992) 1085.
- [8] E.A. Disalvo, A.M. Campos, E. Abuin, E.A. Lissi, *Chem. Phys. Lipids* 84 (1996) 35.
- [9] G. Rouser, S. Fleisher, A. Yamamoto, *Lipids* 5 (1970) 494.
- [10] D.L. Bernik, E.A. Disalvo, *Chem. Phys. Lipids* 82 (1996) 111.
- [11] L. Sikurová, R. Franková, D. Chovat, *Studia Biophys.* 133 (1989) 67.
- [12] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983.
- [13] T.P. Hopp, K.R. Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3824.
- [14] J. Janin, *Nature* 277 (1979) 491.
- [15] M. Langner, S.W. Hui, *Biochim. Biophys. Acta* 1149 (1993) 175.
- [16] S. Sen, D. Sukul, P. Dutta, K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 7495.

Article 3

Anàlisi de l'efecte de seqüències peptídiques de la proteïna E2 (HGV/GBV-C) en les propietats fisicoquímiques de bicapes lipídiques zwitterioniques i carregades negativament.

Alay, M., Asunción, A. M., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M.A.

Departament de Fisicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Alay, M., Asunción, A. M., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M. A. (2005). Analysis of the effect of a peptide sequence of the E2 protein (HGV/GBV-C) on the physicochemical properties of zwitterionic and negatively charged bilayers. *Luminescence*. 20: 445-450.

Resum

Les propietats d'interacció amb membranes biomimètiques d'un potencial epítot del virus GBV-C corresponent a la regió (99-118) de la proteïna estructural E2 s'han investigat usant diverses tècniques de fluorescència. Com a models de membranes s'han emprat liposomes unilamel·lars petits (SUVs) de barreges de DMPC: DPPC (1:1) o DMPG: DPPC (1:1). Els resultats de les proves de fluorescència de transferència d'energia de resonància (FRET) realitzades amb els SUVs marcats amb les sondes NBD-PE com a donador d'energia i Rho-PE com a acceptor, van indicar que el pèptid era capaç de fusionar tant els liposomes neutres com els aniònics, tot i que, aquests últims requereixen concentracions de pèptid inferiors per a fusionar-se. No obstant això, el pèptid augmenta l'anisotropia en estat estacionari de la sonda hidròfoba DPH, tant en les bicapes formades per lípids neutres, com en les bicapes aniòniques, tot i que ho fa en menor grau en aquestes últimes. Això suggereix que les interaccions càrrega-càrrega no són necessàries per a que es produeixin les interaccions amb la membrana, i per tant es confirmarien els resultats obtinguts amb les proves de FRET. Pel que fa a l'anisotropia realitzada amb la sonda superficial TMA-DPH, no s'ha vist que la presència de pèptid la modifiqui en cap de les dues preparacions de liposomes. Finalment, els resultats de les proves de fluorescència d'emissió intrínseca del residu de triptòfan propi del pèptid, han mostrat desplaçament cap al blau quan el pèptid està incubat en SUVs aniònics. Aquest desplaçament es produeix tant a temperatures que es troben per sota com per sobre de la temperatura de transició (T_m) i, en menor mesura, això també succeeix en el model de membrana zwitteriònic.

Analysis of the effect of a peptide sequence of the E2 protein (HGV/GBV-C) on the physicochemical properties of zwitterionic and negatively charged bilayers

Maite Alay,¹ M. Asunción Alsina,¹ Isabel Haro,² Josefina Prat¹ and M. Antònia Busquets^{1*}

¹Associated Unity to the CSIC, Peptides and Proteins: Physical Chemistry Studies, Physical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain

²Department of Peptide and Protein Chemistry, IIQAB-CSIC, Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain

Received 24 November 2004; revised 20 April 2005; accepted 25 April 2005

ABSTRACT: The membrane-interacting properties of a potential epitope of GB virus C/hepatitis G virus located at the region (99–118) of the E2 structural protein were investigated using several fluorescence techniques. SUV of DMPC:DPPC (1:1) or DMPG:DPPC (1:1) zwitterionic and anionic mixtures, respectively, were used as model membranes. FRET with NBD-PE as energy donor and Rho-PE as energy acceptor-labelled SUV indicated that the peptide was able to fuse both zwitterionic and anionic SUVs, the latter requiring lower peptide concentrations. However, the peptide increased the steady-state anisotropy of DPH embedded in the hydrophobic centre of the membrane with zwitterionic headgroups and to a lesser extent in anionic bilayers, suggesting that charge–charge interactions are not required for membrane interactions and also confirming the FRET results. No changes in anisotropy were observed with the probe TMA-DPH located at the surface of the bilayer. Finally, analysis of the intrinsic emission fluorescence of the tryptophan residue, upon incubation with SUV, showed a blue shift in the presence of anionic bilayers, both below and above the main transition temperature (T_m) (gel to liquid-crystalline state) and, to a lesser extent, with the zwitterionic model membrane. Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: HGV/GBV-C; synthetic peptide; liposomes; anisotropy; Trp fluorescence; FRET

INTRODUCTION

Membrane fusion is the key event in some virus transmissions and, in many cases, peptide segments of a given protein are the first agents of virus spreading via a fusion mechanism (1). GV virus C (GBV-C/HGV) is a member of the family *Flaviviridae*, which is transmitted through fusion peptides (2, 3). In addition, it is thought to be a major factor influencing the natural history of HIV disease (4–7). Understanding the interaction of peptides belonging to relevant protein domains with model membranes is relevant to obtaining information about the infection and proliferation mechanism of the virus. For this reason, according to the accessibility (8) and the hydrophobicity-at-interface, as determined by the Wimley and White scale (9), we have chosen a putative antigenic peptide belonging to the E2 structural protein of GBV-C/HGV, viz. E2(99–118), with the amino acid sequence VSWFASTGGRDSKIDVWSLV (10). Its interaction with small unilamellar vesicles

(SUVs) composed of equimolecular mixtures of DMPC and DPPC or DMPG and DPPC, used as model systems to analyse the influence of charge in lipid–peptide interactions, was studied by means of a series of fluorescent techniques. The results indicate the ability of the peptide to fuse both anionic and zwitterionic bilayers and to modify bilayer fluidity at the hydrophobic core of the bilayer. Peptide affinity for bilayers was also assessed by the changes in tryptophan fluorescence spectra. Such information could be useful to obtain insight on how membrane lipid components can regulate the activities of the protein to which belong the peptide fragment under study.

MATERIALS AND METHODS

The experimental details of the peptide synthetic procedure are described elsewhere (10). To summarize briefly, the VSWFASTGGRDSKIDVWSLV peptide sequence was obtained by solid-phase peptide synthesis, following a Fmoc/tBu strategy essentially by means of an N-N'-diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole activation. Crude peptide was purified by preparative high-performance liquid chromatography. Purified peptide was characterized by analytical HPLC, amino acid analysis and electrospray mass spectrometry.

*Correspondence to: M. A. Busquets, Associated Unity to the CSIC, Peptides and Proteins: Physical Chemistry Studies, Physical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain.
E-mail: mabusquetsvinas@ub.edu

Contract/grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain; Contract/grant number: BQU2003-05070-CO2/01.

DPCC (L- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine), DMPC (L- α -dimyristoyl phosphatidylcholine), DMPG (L- α -dimyristoyl phosphatidylglycerol) and the fluorescent probes Rho-PE [1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulphonyl)] and NBD-PE [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)] were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) and were used without further purification. The fluorescent probes DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) and TMA-DPH [1-(4-trimethylammonium phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulphonate] were from Molecular Probes (Eugene, OR). Double-distilled water was deionized using a MilliQ system (Millipore Corp.) having a resistivity of 18.2 mol/L Ω cm. Chloroform and methanol were from Merck. 10 mmol/L TRIS buffered solution, pH 7.4, was used in all the experiments.

Preparation of lipid vesicles

Mixtures of DMPC:DPPC (1:1) or DMPG:DPPC (1:1) were dissolved in chloroform:methanol (2:1). Samples were dried by rotary evaporation at 55°C, the last traces of the solvents being removed using nitrogen and high vacuum. Multilamellar vesicles (MLVs) were obtained by addition of Tris buffer (10 mmol/L, pH 7.4) to the lipids and by shaking the suspension at a temperature above the main transition temperature (T_m), from the gel to the liquid-crystalline state, of the lipid of higher T_m . SUVs were prepared by sonicating the MLVs in a bath-type sonicator (Lab Supplies, Hicksville, NY; Model G112SPIT). The phospholipid concentration of the preparations was determined by phosphorus quantification (11).

Incorporation of the fluorescent probes to SUVs. DPH and TMA-DPH dissolved in DMF were incorporated after the SUVs preparation. A small aliquot (<0.5% in volume) of a concentrated solution was added to the SUVs suspension, and incubated for 60 min at a temperature above the bilayer transition temperature. Rho-PE and NBD-PE (1% mol/L each) were deposited together with the lipids prior to preparation of the MLVs.

Fluorescence measurements

The fluorescence experiments were carried out on an AB-2 spectrofluorimeter (SLM-Aminco) in a quartz cuvette under constant stirring.

Intrinsic fluorescence measurements. E2(99–118) peptide (which contains two Trp) was excited at 280 nm. Emission spectra were recorded over the range 300–500 nm. Slits with nominal band-pass of 4 nm were

used for both excitation and emission beams. Emission fluorescence spectra, were recorded for the peptide at a concentration of 5 μ mol/L in 1000 μ L Tris 10 mmol/L, pH 7.4, at 25°C and 55°C by incremental addition of 2–25 μ L aliquots of DMPC:DPPC (1:1) or DMPG:DPPC (1:1) SUVs (10 mg/mL). After each addition the system was allowed to equilibrate for 10 min and the emission spectrum and time trace were recorded. The fluorescence intensity was measured as a function of the lipid:peptide ratio. Suspensions were continuously stirred, and in the case of experiments at 55°C they were left to equilibrate for 5 min before recording the spectrum. Fluorescence intensities were corrected for the contribution of light scattering by subtraction of the appropriate vesicle blank. The last correction was obtained from a parallel lipid titration of N-acetyltryptophanamide (NATA), which does not interact with lipids (12).

According to Wimley and White (9), and assuming a two-state equilibrium between water-soluble aggregates and membrane bound peptides, the apparent mole fraction partition coefficients were determined by fitting the binding curves to the equation:

$$I = f_{\text{bound}}I_{\text{max}} + (1 - f_{\text{bound}})I_0$$

for which I is the relative fluorescence intensity, I_0 is the intensity in the absence of lipid, and $f_{\text{bound}} = KxL / (W + KxL)$, where Kx is the mole fraction coefficient, L the lipid concentration and W the molar concentration of water (55.3 mol/L at 25°C).

Fluorescence anisotropy measurements. Steady-state anisotropy measurements were carried out with the same instrument as the other fluorescent experiments, using polarizers in the L-configuration. The dynamics of lipids in liposome membranes in the presence of E2(99–118) was determined by measuring the degree of depolarization of fluorescence emitted from the probes DPH and TMA-DPH (13).

The excitation and emission wavelengths were 365/425 for DPH and TMA-DPH (slit-widths 4 nm). Labelled vesicles with 1% of the desired probe were mixed with the peptide in 10 mmol/L Tris at pH 7.4, and anisotropy was measured automatically. The probe:lipid molar ratio was 1:400 and the peptide:lipid molar ratio was 0.1:1. For each sample, two cycles were performed, a heating cycle from 25°C to 55°C, followed by a cooling cycle to the initial temperature, at 1°C intervals allowing thermal equilibration. The temperature was controlled with a Peltier system piloted by a computer program (Microbeam SA, Barcelona, Spain) and the temperature was registered with a thermocouple inserted into the cuvette. Fluorescence anisotropy (r) was calculated automatically by software provided with the instrument, according to:

$$r = \frac{I_{Vv} - GI_{Vh}}{I_{Vv} + 2GI_{Vh}}$$

where I_{Vv} and I_{Vh} are the intensities of the emitted polarized light with the emission polarizer parallel or perpendicular, respectively, to the excitation polarizer. Anisotropy values were corrected for dependencies in the detection system (G correction factor, $G = I_{Hv}/I_{Hh}$).

Lipid mixing fusion assays. A membrane fusion assay based on fluorescence resonance energy transfer between the NBD-PE and Rho-PE probes was used to assess the SUVs' integrity in response to different peptide concentrations. Those fluorescent lipids were incubated at 1 mol% each to produce labelled SUVs. Labelled and unlabelled vesicles were mixed at 1:5 molar ratio and injected into 2 mL Tris 10 mmol/L, pH 7.4. The final lipid concentration was 100 mol/L. NBD-PE fluorescence dequenching was monitored in a stirred cuvette in the same instrument as the other fluorescent experiments, at 25°C, using excitation and emission wavelengths of 467 and 540 nm, respectively. Lipid mixing was monitored for approximately 400 s. Complete dilution of the fluorescent probes was determined by addition of Triton X-100 to a final concentration of 0.1% (v/v). The extent of lipid mixing was calculated according to the equation:

$$\text{Lipid mixing (\%)} = \frac{(F - F_0)}{(F_{max} - F_0)} \times 100$$

where F is the NBD-PE fluorescence during the lipid mixing assay, F_0 is the initial fluorescence, and F_{max} is the NBD-PE fluorescence upon infinite probe dilution in the presence of 0.1% (v/v) Triton X-100. The value of F_{max} was corrected for the quenching of NBD-PE fluorescence due to Triton X-100, by measuring the NBD-PE fluorescence of vesicles that had a concentration of NBD-PE and Rh-PE of 0.16%, the molar fraction expected if the labelled and unlabelled SUVs had undergone complete lipid mixing. To allow a comparison of growing concentrations of lipid in the cuvette between different SUV compositions, the normalized lipid mixing (%) for each lipid composition was expressed as a percentage of the maximum lipid mixing observed for a given SUV composition.

RESULTS AND DISCUSSION

Intrinsic emission fluorescence

To determine the environment of the Trp residues of the E2(99–118) peptide in the lipid membranes, the fluorescent properties of the Trp residue were examined in the presence or absence of increasing amounts of

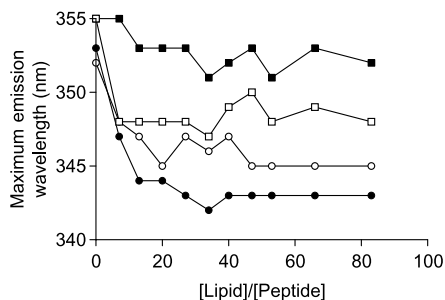


Figure 1. Variation of the maximum emission wavelength of Trp with increasing lipid concentration in DMPG:DPPC (1:1) (○) or DMPC:DPPC (1:1) (□) SUVs at 25°C (empty symbol) and 55°C (filled symbol). Peptide concentration in cuvette, 5 μmol/L.

DMPC:DPPC (1:1) or DMPG:DPPC (1:1) SUVs as a membrane model system. Thus peptide-phospholipid interactions were assessed by monitoring the changes in the fluorescence spectra—fluorescence quantum yield and wavelength of the emission maximum—when the SUVs were incubated with 5 μmol/L peptide concentration. In addition, to study the effect of membrane fluidity on lipid-peptide interaction, the experiments were performed both below (25°C) and above (50°C) the gel-liquid-crystalline phase transition temperature for the DPPC (phospholipid with the highest T_m). In aqueous solution (Fig. 1), the maximal fluorescence wavelength (λ_{max}) of the peptide was 352 and 355 nm, depending on the temperature and lipid composition, indicating that the residue was exposed to a hydrophilic environment (14). In the presence of anionic SUVs, λ_{max} was rapidly shifted to shorter wavelengths, 345 nm and 342 nm, at 25°C and 50°C, respectively, and remained in this range at higher [lipid]:[peptide] ratios. In the case of the zwitterionic mixture at 25°C, the first addition of SUVs ([lipid]:[peptide] ratio 0.07) resulted also in a shift of the wavelength to a shorter value (348 nm) but further SUVs addition did not modify this value. No significant changes in λ_{max} were observed upon peptide titration with DMPC:DPPC SUVs at 50°C. The λ_{max} shift to shorter wavelength with increasing hydrophobicity of the environment (15) indicates that the Trp residue of the peptide was more deeply embedded in the hydrophobic portion of DMPG:DPPC (1:1) SUVs than in the hydrophobic portion of DMPC:DPPC (1:1) bilayers.

In all the samples there was an increase in quantum yield (Fig. 2) with increasing lipid additions, also indicative of a binding and a probably subsequent penetration of the peptide into the hydrophobic core of the bilayer, as has been previously described in lipid monolayers (16).

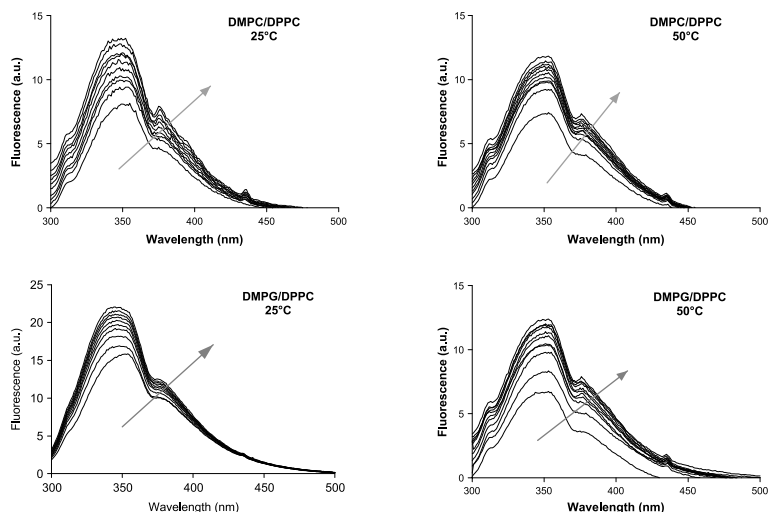


Figure 2. Emission fluorescence spectra of E2(99–118) peptide in presence of increasing concentrations of DPMC:DPPC SUVs (top) or DPMG:DPPC SUVs (bottom) at 25°C (left) or 50°C (right). Arrows are in the direction of increasing lipid concentration (lipid:peptide molar ratio, 0–80:1).

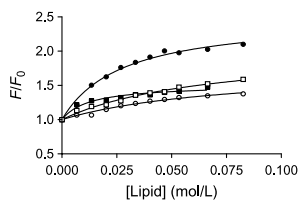


Figure 3. Partitioning curves as estimated from Trp fluorescence changes in E2(99–118) in the presence of increasing concentrations of DMPG:DPPC (1:1) (O) or DPMC:DPPC (1:1) (□) SUVs at a temperature below (25°C; empty symbol) and above (50°C; filled symbol) the gel–liquid-crystalline phase transition of the phospholipids.

In order to measure peptide partitioning quantitatively, the fluorescence intensity at the λ_{\max} of the lipid-bound state was analysed by titrating lipid vesicles into an aqueous solution of the peptide.

The partition isotherms at a temperature below and above the gel–liquid-crystalline phase transition (Fig. 3) show a clear higher affinity of the peptide towards anionic bilayers in the liquid crystalline state than towards zwitterionic membranes, in both the gel and the liquid-crystalline state, and anionic membranes in the gel state. This affinity is assessed by the partition coefficients obtained from the binding curves whose values are indicated in Table 1.

Table 1. Mole fraction partition coefficients (K_X) and I_{\max}/I_0 of E2(99–118) in the presence of DPMC:DPPC or DMPG:DPPC SUVs obtained from the binding curves

	DPMC:DPPC	DMPG:DPPC	
K_X	25°C	$3.2 \pm 0.05 \times 10^5$	$2.4 \pm 0.08 \times 10^5$
	50°C	$1.4 \pm 0.09 \times 10^5$	$9.2 \pm 0.08 \times 10^5$
I_{\max}/I_0	25°C	2.0 ± 0.06	1.8 ± 0.10
	50°C	1.5 ± 0.12	2.5 ± 0.09

Fluorescence anisotropy of DPH or TMA-DPH in DPMC:DPPC (1:1) or DMPG:DPPC (1:1) bilayers

Fluorescence polarization was used to evaluate the changes in membrane fluidity upon peptide incubation with zwitterionic and anionic SUVs. The presence of E2(99–118) slightly increased the fluorescence anisotropy of DPH embedded into DPMC:DPPC (1:1) SUVs (Fig. 4A) in the neighbourhood of the gel–liquid-crystalline state transition and in the liquid-crystalline phase ($T > 42^\circ\text{C}$). In the case of the anionic mixture, such an increase in membrane rigidity was only observed when the bilayer was in a fluid state ($T > 50^\circ\text{C}$) (Fig. 4B). Increases in steady-state DPH anisotropy can be attributed to a greater molecular order of lipids surrounding DPH and a consequent slowing in DPH rotational diffusion (17). Thus, E2(99–118) interaction with zwitterionic and in less extent with anionic bilayers, results in a decrease

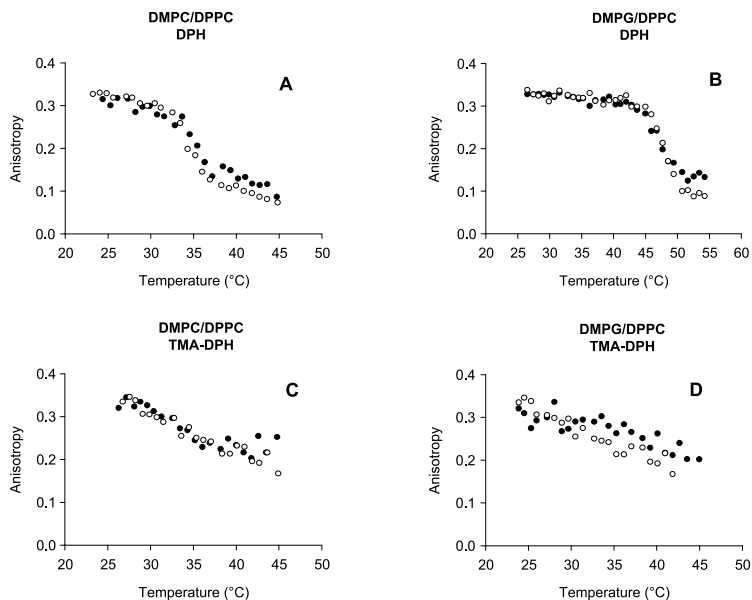


Figure 4. Changes in DPH (A, B) and TMA-DPH (C, D) anisotropy vs. temperature in DMPC:DPPC (1:1) and DMPG:DPPC (1:1) SUVs in the presence (filled symbol) or absence (empty symbol) of E2(99–118). The final lipid and peptide concentrations were 250 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Each point is the average of three measurements.

in membrane fluidity as a consequence of changes in the local mobility of the lipid tail.

To further explore E2(99–118)-membrane interactions near the glycerol backbone region, we used the hydrophilically modified dye TMA-DPH, which is located at a shallower level in the lipid bilayer due to the addition of a trimethylamino group (17). Fig. 4C, D shows the temperature scans of TMA-DPH anisotropy in both the zwitterionic and anionic bilayer, respectively. There was no effect of the peptide on anisotropy of TMA-DPH located into DMPC:DPPC vesicles, in contrast to the results with the more deeply embedded DPH (Fig. 4A). On the other hand, peptide seems to increase the anisotropy of this probe in anionic vesicles, indicating a decrease of membrane fluidity.

Fluorescence resonance energy transfer studies assess the ability of E2(99–118) to fuse neutral and anionic bilayers

Fusion between unlabelled and NBD-PE/Rho-PE labelled (0.6 mol% each) zwitterionic or anionic vesicles and E2(99–118) peptide was followed by an increase of NBD fluorescence. Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$) of the labelled vesicles in the presence of

increasing amounts of peptide are shown in Fig. 5. For both lipid compositions, peptide addition results in a decrease in the quantum yield at ca. 580 nm (maximum λ_{em} for Rho-PE) concomitant with an increase at 540 nm (maximum λ_{em} for NBD-PE). These results indicate a separation between the donor (NBD-PE) and the acceptor (Rho-PE), probably as a consequence of the capability of the peptide to induce membrane fusion. Analysis of the percentage lipid mixing in function of the peptide:lipid molar ratio (Fig. 6) indicates that E2(99–118) is able to fuse both zwitterionic and anionic vesicles, but in the last composition at a lower ratio.

CONCLUSION

The results presented in this paper show the ability of the E2(99–118) sequence to interact with anionic and, to a lesser extent, with zwitterionic bilayers. Taking into consideration that the peptide has no net charge at pH 7.4, we can assess that there is a contribution of both electrostatic and hydrophobic forces in peptide activity. As observed previously with other model membranes (10, 15, 16), this sequence seems to have a high potential

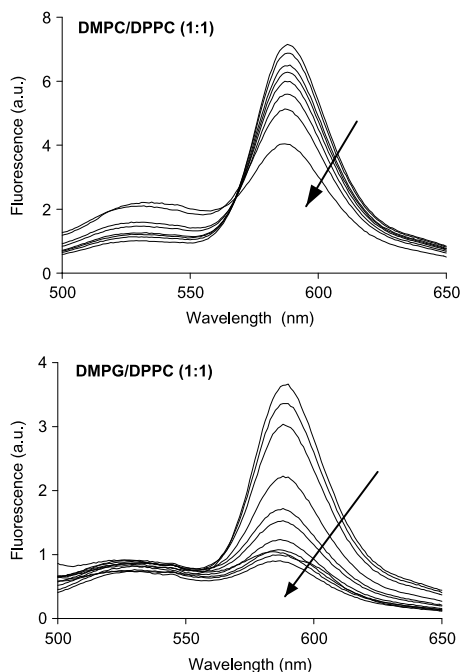


Figure 5. Effect of increasing E2(99–118) peptide concentration on the fluorescence spectra of NBD-PE/Rho-PE labelled DMPC:DPPC (top) or DMPG:DPPC (bottom) SUV. λ_{ex} = 467 nm. The arrow indicates the direction of increasing peptide concentration (4–40 $\mu\text{mol/L}$ in cuvette). The lowest spectrum corresponds to the addition of the detergent 10 μL 10% Triton X-100 (total fusion).

to take part in the transmission via a fusion mechanism of HGV/GBV-C in the host cell.

Finally, this work reinforces the utility of fluorescence techniques to study different aspects of the interaction of model membranes with peptide sequences, either by analysing the intrinsic fluorescence of the peptide or by using external probes.

Acknowledgements

This work was supported by Grant BQU2003-05070-C02/01 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). We would like to thank the referees for their useful comments and suggestions.

REFERENCES

1. Epanand RM. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 2003; **1614**: 116–121.

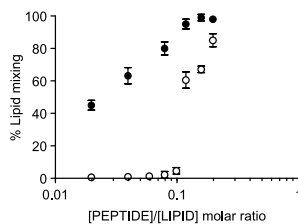


Figure 6. Percentage lipid mixing vs. peptide:lipid molar ratio. DMPG:DPPC SUVs (filled symbols) or DMPC:DPPC SUVs (empty symbols) were titrated with E2(99–118) peptide, where $n = 3$ with standard error.

2. Chu CW, Hwang SJ, Luo JC, Lee SD. Clinical, virological, immunological, and pathological significance of GB virus C/hepatitis G infection in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* 2001; **19**: 225–236.
3. Polgreen PM, Xiang J, Chang Q, Stapleton JT. GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microb. Infect.* 2003; **5**: 1255–1261.
4. Chung RT, Kim AY, Polsky B. HIV/hepatitis B and C co-infection: pathogenic interactions, natural history and therapy. *Antiviral Chem. Chemother.* 2001; **12**: 73–91.
5. Leen CLS. Hepatitis C and HIV co-infection. *Int. J. STD AIDS* 2004; **15**: 289–294.
6. Carlos MJ, Castilla J, Lopez M *et al.* Impact of chronic hepatitis C on HIV-1 disease progression. *HIV Clin. Trials* 2004; **5**: 125–131.
7. Lefrère JJ, Roudot-Thoraval F, Morand-Joubert L *et al.* Carriage of GB virus C/hepatitis C virus RNA is associated with a slower immunologic, virologic and clinical progression of human immunodeficiency virus disease in coinfecting persons. *J. Infect. Dis.* 1999; **179**: 783–789.
8. Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 1979; **277**: 491–493.
9. Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nature Struct. Biol.* 1996; **3**: 842–848.
10. Rojo N, Gómara MJ, Busquets MA, Alsina MA, Haro I. Interaction of E2 and NS3 synthetic peptides of GB virus C/hepatitis G virus with model lipid membranes. *Talanta* 2003; **60**: 395–404.
11. Rouser G, Fleisher S, Yamamoto A. Two-dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970; **5**: 494–496.
12. Ladokhin AS, Jayasinghe S, White SH. How to measure and analyse tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal. Biochem.* 2000; **285**: 135–145.
13. Cajal Y, Busquets MA, Carvajal H, Girona V, Alsina MA. Effects of a fungal lipase on membrane organization evaluated by fluorescence polarization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2003; **22**: 315–328.
14. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.
15. Rojo N, Gómara MJ, Alsina MA, Haro I. Lipophilic derivatization of synthetic peptides belonging to NS3 and E2 proteins of GB virus C/hepatitis G virus and its interaction with model lipid membranes. *J. Peptide Res.* 2003; **61**: 318–330.
16. Dastis M, Rojo N, Alsina MA *et al.* Study in mono- and bilayers of the interaction of hepatitis G virus (GBV-C/HGV) synthetic antigen E2(99–118) with cell membrane phospholipids. *Biophys. Chem.* 2004; **109**: 375–385.
17. Kremer JJ, Sklansky DJ, Murphy RM. Profile of changes in lipid bilayer structure caused by β -amyloid peptide. *Biochemistry* 2001; **40**: 8563–8571.

Article 4

Interacció de pèptids derivats del GBV-C/HGV amb liposomes: mètodes d'anisotropia de fluorescència i transferència d'energia per fluorescència.

Alay, M., Alsina, M. A., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M. A.

Departament de Fisicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Article 4: Alay, M., Alsina, M. A., Haro, I., Prat, J., & Busquets, M. A. (2006). Interaction of E2 (GBV-C/HGV)-derived peptides with liposomes: fluorescence anisotropy and fluorescence resonance energy transfer methods. *Luminescence* 21: 360-361.

Resum

La co-infecció entre l'hepatitis B i l'hepatitis C és molt comú. Tot i això, no existeix cap evidència de què aquests virus siguin els responsables de la malaltia hepàtica, ara bé, ells sí que han estat relacionats amb el VIH, en el sentit que sembla que són capaços d'inhibir la progressió de la SIDA. S'han utilitzat tècniques d'anisotropia i de fluorescència de transferència d'energia de ressonància (FRET), per tal d'estudiar els possibles mecanismes de fusió viral de tres seqüències peptídiques de la proteïna estructural E2 del virus de HGV/GBV-C. Per a realitzar els estudis d'anisotropia, s'han utilitzat liposomes unilamel·lars grans (LUVs) de DMPC i de DMPC/DMPG al 50% com a models de membrana, i aquests s'han marcat amb DPH (que es situa a la part interior de la bicapa) i amb TMA-DPH (que es situa a la part superficial dels liposomes) per tal de valorar la localització i/o incorporació de cada un dels pèptids en els models de membrana. En funció del pèptid i de la composició lipídica de la membrana, s'ha vist que es poden produir canvis en les propietats d'aquesta. E2(99-118) és capaç de modificar els valors d'anisotropia per sobre i per sota de la fase de transició. Els estudis de fluorescència de transferència d'energia de ressonància (FRET), duts a terme amb les sondes NPB-PE (acceptora) i Rho-PE (donadora), mostren la potencialitat dels tres pèptids per a induir la fusió de les membranes.

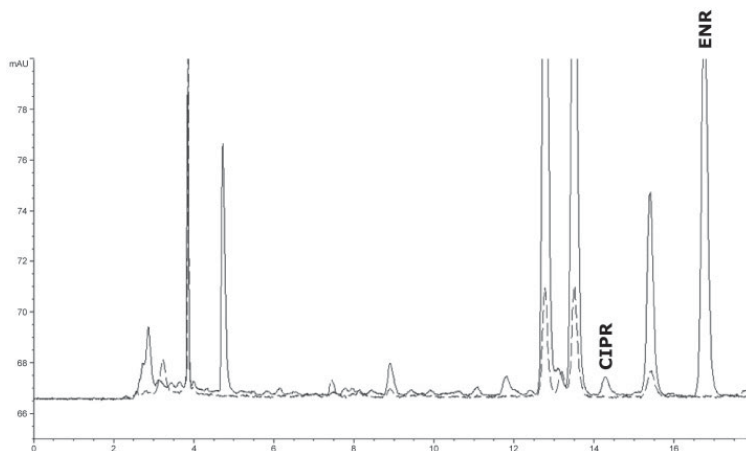


Figure 1. Chromatographic separations of pigmented calf hair extracts. Treated animal sample (—); control animal sample (---). 80 μ L injected.

Acknowledgements

We would like to thank the Spanish MEC for financial support (AGL2005-07700-C06-03).

References

- Mizuno A, Uematsu T, Nakashima M. *J. Chrom. B* 1994; **653**: 187–193.
- Kosuge K, Uematsu T, Araki SI, Matsuno H, Ohashi K, Nakashima M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; **42**(5): 1298–1302.
- Uematsu T, Kosuge A, Araki S, Ishiye M, Asai Y, Nakashima M. *Ther. Drug Monit.* 1995; **17**: 101–103.
- Dunnett M, Lees P. *Res. Vet. Sci.* 2004; **77**: 143–151.

Interaction of E2 (GBV-C/HGV)-derived peptides with liposomes: fluorescence anisotropy and fluorescence resonance energy transfer methods

M. Alay,¹ M. A. Alsina,¹ I. Haro,² J. Prat¹ and M. A. Busquets^{1*}

¹Associated Unit, CSIC, 'Peptides and Protein: Physicochemical Studies', IU2UB, Physical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

²Department of Peptide and Protein Chemistry, IQOAB-CSIC, Jordi Girona Salgado 18–26, 08034 Barcelona, Spain

*Corresponding author. mabusquetsvina@ub.edu. Tel: +34 934 024 556

Hepatitis G virus (GBV-C/HGV) has spread worldwide and virus infections are extremely frequent. Co-infection with hepatitis B and hepatitis C are common, but controversial data exist concerning their potential to cause hepatitis in humans (1, 2). By now, there is no evidence that this virus is responsible for liver disease, but it has been recently related with HIV regarding the inhibition progression of AIDS (3). With a view toward possible new insights into viral fusion mechanisms, we have investigated, by various fluorescence techniques, the interaction of three peptide sequences corresponding to the structural protein E2 of the HGV/GBV-C virus with liposomes. Peptide sequences were: E2 (99–118), VSWFASTGGRDSDKIDVWVSLV; E2 (120–139), VGSASC-TIAALGSSDRDRTVV; and E2 (125–139), CTIAALGSSDRDRTVV. Large unilamellar vesicles (LUVs) of dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) alone or with 50% of dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG) were used as model membranes. Fluorescence measurements were carried out using an AB-2 spectrofluorimeter (SLM-Aminco) in a quartz cuvette under constant stirring (4). Peptide incorporation and location in the phospholipid bilayer was investigated with LUVs labelled with DPH (located at the inner part of the bilayer) or TMA-DPH (located at the surface with the polar head in contact with the phospholipid polar head and the hydrophobic tail in contact with the phospholipid acyl chains). Peptides were able to change the bilayer properties in different ways, depending on the lipid composition and the sequence, as illustrated in Fig. 1. E2 (99–118) changed the anisotropy values below and above the phase transition interval. Lipid-mixing fusion assays, based on fluorescence resonance energy transfer performed with NPB-PE (acceptor) and Rho-PE (donor), showed the potential of the three peptides to induce membrane fusion.

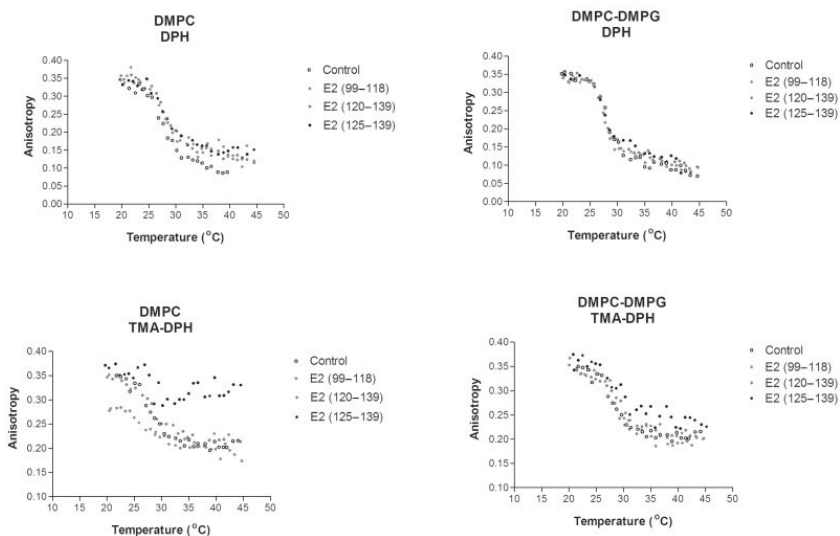


Figure 1. Changes in DPH (top) and TMA-DPH (bottom) anisotropy vs. temperature in DMPC and DMPC:DMPG (1:1) LUVs in the presence of E2 (99–118), E2 (120–139) and E2 (125–139). The molar ratio phospholipid:peptide was 10:1.2 and the phospholipid:probe ratio was 500:1.

References

1. Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Scott-Muerhoff A, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat. Med.* 1995; **1**: 564–569.
2. Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, Fry KE, Krawczynski KZ, Alter H, Koonin E, Gallagher M, Alter M, Hadziyannis S, Karayiannis P, Fung K, Nakatsuji Y, Shih J, Young L, Piatak M, Hoover C, Fernandez J, Chen S, Zhou JC, Morris T, Hyams KC, Ismay S, Lifson JD, Hess G, Fong SKH, Thomas H, Bradley D, Margolis H, Kim JP. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; **271**: 505–508.
3. Tillmann HL. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2001; **345**: 715–724.
4. Alay M, Alsina MA, Haro I, Prat J, Busquets MA. Analysis of the effect of a peptide sequence of the E2 protein (HGV/GBV-C) on the physicochemical properties of zwitterionic and negatively charged bilayers. *Luminescence* 2005; **20**: 445–450.

Study of organic compounds releases from coal immersed in seawater

C. Jaffrennou,^{1*} J. Y. Cabon,¹ L. Burel-Deschamps,¹ P. Giamarchi,¹ L. Stephan¹ and F. Bautin²
¹University of Brest, 6 Av. Le Gorgeu, 29200 Brest, France.
²E-mail: cathy.jaffrennou@univ-brest.fr

²Total, 2 Place de la Coupole, La Défense, 6–92078 Paris La Défense cedex, France

Whenever immersed in seawater after a collier accident, coal can be a source of pollution to the marine environment. Coal is indeed a fossil fuel, which contains many carcinogenic organic substances, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (1) and which could therefore release significant amounts of such toxic substances into the seawater. This study mainly focuses on the fluorescence detection of such pollution.

COAL STUDIES

Four different coals were used in this study, coming from different countries (Columbia, South African Republic and Venezuela). The coal size fraction repartition was determined by successive sievings for the four coals. Coal particles bigger than 2 mm represented more than 70% of all coal samples in percentage weight, and none was bigger than 100 mm. The alkane and PAH contents were then determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS), after coal extraction in acetone by heating at 40°C and 30 min sonication followed by a silica gel column separation with hexane and dichloromethane, according to an AFNOR preliminary norm draft about the determination of PAHs in sediments (2). Eventually, solid coal fluorescence spectra were recorded using laser-induced fluorescence (LIF) and a specifically laboratory-designed optical set-up. It revealed a weak

Article 5

Interacció amb monocapes i bicapes lipídiques de de dos pèptids sintètics del virus GB-C.

Alay, M., Haro, I., Alsina, M. A., Girona, V., Prat, J., & Busquets, M. A.

Departament de Fisicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona.

Alay, M., Haro, I., Alsina, M. A., Girona, V., Prat, J., & Busquets, M. A. (2013). Interaction of two overlapped synthetic peptides from GB virus C with charged mono and bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105: 7-13.

Resum

Per a entendre millor l'efecte de la longitud del pèptid i la càrrega negativa dels lípids en la unió del pèptid a membranes, s'han investigat les propietats fisicoquímiques i les interaccions amb models de membrana cel·lulars de dues seqüències de pèptid de l'embolcall del GBV virus C: E2 (125-139) i E2 (120-139), per mitjà de diverses tècniques biofísiques. Els pèptids, que tenen una càrrega negativa neta al pH que s'han realitzats els assaigs, han interactuat amb les monocapes de tots els fosfolípids estudiats, independentment de la càrrega, però ho han fet d'una forma més notable en aquelles que es formaven amb fosfolípids catiónics de DPTAP. Això indica que aquesta interacció és tant de naturalesa hidròfoba com electrostàtica, com ja s'ha observat en altres pèptids de la mateixa família. Els pèptids han estat capaços d'alliberar continguts dels liposomes en les proves d'alliberament de continguts vesiculars depenent de la composició de lípids de les vesícules. D'altra banda, els assaigs de dicroisme circular ha demostrat que els pèptids existeixen principalment com una barreja d'estructura desordenada de conformacions de tipus β quan es troben en solució aquosa, però van disminuir el seu contingut no estructurat, incrementant preferentment la conformació d' α -hèlix després de la interacció amb dissolvents hidrofòbics o lípids carregats positivament. En conjunt, els resultats d'aquest treball indiquen que els pèptids interactuen en un nivell superficial i que són capaços de penetrar en les bicapes quan es troben en estat líquid. Es pot apuntar que els canvis conformacionals podrien ser els responsables d'aquest efecte.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Interaction of two overlapped synthetic peptides from GB virus C with charged mono and bilayers

M. Alay^a, I. Haro^b, M.A. Alsina^a, V. Girona^a, J. Prat^a, M.A. Busquets^{a,*}^a Department of Physical Chemistry, Associated Unit to the CSIC, IN²UB, Faculty of Pharmacy, UB Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain^b Unit of Synthesis and Biomedical Application of Peptides, Department of Biomedical Chemistry, IQAC-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2012

Received in revised form 9 November 2012

Accepted 26 November 2012

Available online xxx

Keywords:

Lipid monolayers
Liposomes, GB virus C
Synthetic peptides

ABSTRACT

The physical chemistry properties and interactions of E2 (125–139) and E2 (120–139) peptide sequences from GB virus C with model cell membranes were investigated by means of several biophysical techniques in order to gain better understanding of the effect of peptide length and lipid charge on membrane binding. The peptides, having one net negative charge at the pH of the assays, interacted with monolayers of all the phospholipids regardless of the charge but with more extent with the cationic DPTAP thus indicating that the interaction had both a hydrophobic and an electrostatic component as has been observed for other peptides of the same family. The peptides were able to leakage contents of liposomes and showed fluorescence energy transfer in vesicles depending on the vesicles lipid composition. On another hand, circular dichroism has shown that the peptides exist mainly as a mixture of disordered structure and β -type conformations in aqueous solution but diminished its unstructured content, folding preferentially into α -helical conformation upon interaction with hydrophobic solvents or positively charged lipid surfaces. Altogether, results of this work indicate that the peptides interact at a surface level, penetrate into bilayers composed of fluid lipids and that conformational changes could be responsible for this effect.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the different variants of hepatitis, GB virus type C was initially thought to be another hepatitis virus and identified as hepatitis G (HGV), but lately it has been shown incapable of replicating in hepatocytes or of causing acute or chronic hepatic diseases [1–3]. For that reason its name has been simplified as GBV-C and it is proposed to be included in a fourth genus of the *Faviviridae* family named *Pegivirus* [4]. It is believed that GBV-C influences HIV infection associated diseases by either directly inhibiting HIV replication or by enhancing the immune system's ability to cope with HIV. GBV-C and HIV share modes of transmission and for that reason prevalence of GBV-C in HIV-infected people is high, ranging between 17 and 42% [5]. Therefore GB virus C has recently gained great interest because of its apparent beneficial effects against the progression of AIDS [4,6,7]. For that reason, it is increasing the number of studies driven to get insight into the effects due to the concomitance of GBV-C and HIV. Several groups are investigating different aspects of the coexistence of the two viruses. In many of these studies, peptides corresponding to well-known fragments of the proteins of the virus are being used for diagnostic, immunological or pharmacological applications, among others. It

has been described that reactivity against GBV-C synthetic peptides is strongly associated with HIV infections [8,9]. Antibodies against the E2 region of GBV-C demonstrated to prevent from GBV-C viremia and indicate past infection [10]. It has also been documented the usefulness of synthetic peptides from envelope and non-structural GBV-C proteins to mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition [11] and for serodiagnosis of this infection among hemodialyzed and chronic hepatitis C infected patients [12]. Mohr et al. [13] have suggested that testing of GBV-C E2 protein as a candidate HIV-1 vaccine Ag appears to be warranted [14]. Therefore, it is particularly useful any study driven to elucidate the role of GBV-C in HIV cycle.

Bearing in mind the potential use of synthetic peptides as antiviral therapies and in the attempt of better understanding the molecular interaction of the envelope E2 protein of GBV-C with lipid mono and bilayers as model membranes, two potential epitopes of the GBV-C virus located at the regions (125–139) (CTIAALGSSDRDITVV) and (120–139) (VGSASCTIAALGSSDRDITVV) of this structural protein, were selected and analyzed by a series of biophysical techniques. In the present work, we have used lipid monolayers of DPPC (zwitterionic), DPPG (negatively charged) and DPTAP (positively charged) at the air–water interface to examine the ability of the peptides to insert into them and to analyze the role of electrostatics and/or hydrophobicity in the interaction [15–20]. The peptides, having one net negative charge at the pH of the assays, interacted with all the phospholipids regardless of the charge but

* Corresponding author. Tel.: +34 934024556; fax: +34 934035987.
E-mail address: mabusquetsvinas@ub.edu (M.A. Busquets).

with more extent with the cationic DPTAP, thus indicating that the interaction had both a hydrophobic and an electrostatic component as has been observed for other peptides of the same family [21]. The thermodynamic parameters obtained from mixed monolayers showed negative deviations from the ideal behavior for all the systems thus confirming the interactions of the peptide with the three phospholipids [18,22].

On another hand experiments performed with liposomes [23,24] revealed the importance of lipid composition in the interaction. The peptides induced both leakage of entrapped solutes contained into liposomes, and fluorescence resonance energy transfer only with liposomes composed of fluid lipids. Similarly, fluorescence anisotropy measurements showed that the peptides caused significant changes in the bilayer packing of fluid zwitterionic membranes. The investigation was completed with the study of the conformational changes of the peptides in presence of different media by circular dichroism.

2. Experimental

2.1. Materials

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DPPG), 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (DMPG), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), and the probes 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-(1,3-benzoxadiazol-4-yl) ammonium salt) (NBD-PE) and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) ammonium salt (Rho-PE) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The lipids were pure as determined by thin layer chromatography and used as received. Trifluoroethanol (TFE), hexafluoroisopropanol (HFIP) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from Sigma. A mixture of chloroform and methanol (2:1, v/v) (HPLC grade Merck) was used to dissolve and as spreading solvent for all lipids. E2 (125–139) or E2 (120–139) were obtained by solid-phase peptide synthesis as previously described [25]. The fluorescent probes 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulfonate (TMA-DPH), 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) and N,N'-p-ylene-bis(pyridinium bromide) (DPX) were purchased from Molecular Probes, Inc.

2.2. Langmuir experiments

The surface properties of the peptides and their insertion into lipid monolayers were analyzed as described elsewhere [18] in a NIMA (Coventry, UK) film balance equipped with a Wilhelmy platinum plate and a round Teflon® dish. Surface pressure (π) with time was recorded until a steady-state value was obtained.

For the kinetics experiments, lipid monolayers at the required initial surface pressure (π_0) were formed by spreading the lipid from chloroform/methanol (2:1, v/v) solutions on Tris 10 mM, pH 7.4 subphases. After 20 min for solvent evaporation and to assure monolayer stability, the peptide was injected from a stock solution in H₂O/ACN (8:2, v/v) beneath the lipid monolayer and pressure increases ($\Delta\pi$) with time were recorded until no further changes occurred indicating that equilibrium was reached. For each sample, the values of $\Delta\pi$ as a function of various π_0 values were obtained. The plot of $\Delta\pi$ versus π_0 yields a straight line with negative slope which intersects the abscissa at a limiting surface pressure defined

as the critical insertion pressure of the peptide for the corresponding lipid monolayer [26].

On another hand, compression isotherms were performed as described in [18].

2.3. Liposome preparation

Several model membranes were prepared for different purposes. Lipid or lipid mixtures were dissolved in a chloroform/methanol (2:1, v/v) mixture and the solutions were dried by rotatory evaporation. Tris buffer (10 mM, pH 7.4) was added to the lipids mixture to give a final concentration of 3.5 mM. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the extrusion of the preparations ten times through 100 nm pore-size polycarbonate filters (Nucleopore) in a high pressure extruder (Lipex, Biomechanics). The z-average mean diameter was ~120 nm and polydispersity around 0.15 (Zetasizer Nano instrument, Malvern). The phospholipid concentration of the preparations was determined by phosphorus quantification [27].

2.4. Leakage of vesicular contents

For the ANTS/DPX assay we followed the protocol described in [28]. Fluorescence was measured in an Aminco Bowman AB2 (Microbeam, SA) spectrofluorimeter before and after detergent was added. Leakage was monitored by measuring the fluorescence intensity at 520 nm, with an excitation of 355 nm and slits of 8 nm. The percentage of leakage was calculated according to Eq. (1):

$$\% \text{leakage} = \frac{F - F_0}{F_{100} - F_0} \quad (1)$$

where F_0 is the initial fluorescence of LUVs, F is the fluorescence intensity after adding the peptide, and F_{100} is the fluorescence intensity after the addition of 10 μ L of a 10% (v/v) Triton-100 solution to assure complete lysis of LUVs.

2.5. Lipid mixing

The ability of the peptides to induce lipid mixing was measured with a fluorescent probe dilution assay, based on resonance energy transfer [29]. One population of LUVs was prepared containing 0.3 mol % each of NBD-PE (energy donor) and Rho-PE (energy acceptor). A second population of LUVs of the same lipid composition was obtained without any probe. Then labeled and unlabeled vesicles were mixed at a molar ratio of 1:5, respectively (100 mM total phospholipid concentration) and added to a fluorescence cuvette to reach a final phospholipid concentration of 100 μ M. The fluorescence intensities were measured at 535 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 466$ nm, 4 nm slit widths).

2.6. Fluorescence anisotropy of membrane lipids

Steady-state anisotropy measurements were carried with the same instrument mentioned in point 2.4, using L-format fluorescence polarizers. The dynamics of LUVs in presence of E2 peptides was determined by measuring the degree of depolarisation of fluorescence emitted from the probes DHP or TMA-DPH. The excitation and emission wavelength were 365 nm 425 nm, respectively for both probes (slit-widths: 4 nm). Fluorescence anisotropy (r) was calculated automatically by the software provided with the instrument, according to Eq. (2):

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2)$$

where $I_{V\parallel}$ and $I_{V\perp}$ are intensities of the emitted polarized light with the emission polarizer parallel or perpendicular, respectively, to the excitation polarizer.

2.7. Circular dichroism spectroscopy experiments

CD spectra were recorded on a Jasco J720 spectropolarimeter. The measurements were performed in a cell of 0.1 cm in diameter at 5 and 25 °C and the data were expressed in terms of mean residue ellipticities $[\theta]$ (deg cm² dmol⁻¹). Three scans were accumulated to improve the signal to noise ratio. Before reading the peptide spectra, a blank spectrum of the buffer solution was subtracted. For peptide-liposome studies, the blank spectrum was that of a liposome suspension at the corresponding concentration and temperature. The spectra were measured between 190 and 260 nm using a spectral bandwidth of 1 nm and a scan speed of 10 nm min⁻¹.

The peptide and lipid solutions were mixed 30 min prior to CD measurement at a lipid:peptide molar ratio R_{LP} : 60 [30]. The mean residue ellipticities $[\theta]$ in deg cm² dmol⁻¹ were calculated using the equation $[\theta] = 100\theta/C.N.L$, where θ is the ellipticity (mdeg), C is the peptide concentration (mM), N is the number of residues and L is the path length (cm). Lincomb–Brahm’s and Contin programs were used to quantify experimental CD results in a PC-compatible computer [31].

3. Results and discussion

3.1. The peptides show surface activity

Both peptides showed surface activity concentration dependent. The longer the peptide the higher the pressure increased. The shape of the surface activity curves approximates a rectangular hyperbola and it was fitted to Eq. (3):

$$\pi = \frac{c\pi_{\max}}{K + c} \quad (3)$$

where c is the concentration, π_{\max} is the maximum pressure reached and K a constant that indicates the peptide concentration needed to reach half π_{\max} . E2 (125–139) reached a π_{\max} of 7.7 mN m⁻¹ at a concentration on the subphase of ~1.5 μM being $K = 0.13$ μM while for E2 (120–139) the values were 16.3 mN m⁻¹, 2.0 μM and 0.28 μM, respectively.

By applying the Gibbs equation, the surface excess concentration (Γ) of the peptides was calculated according to:

$$\Gamma = \frac{1}{RT} \frac{\Delta\pi}{\Delta \ln c} \quad (4)$$

R being the gas constant, T the temperature, $\Delta\pi$ the surface pressure increase achieved after 60 min (mN m⁻¹), and c the concentration of the peptide in the subphase (M). These results suggest equilibrium between the molecules of the peptides in solution and those at the air/water interface.

The surface excess concentration at saturation (Γ_{\max}) calculated from the slope of the curve $\Delta\pi - \Delta \ln c$ was 4.64×10^{-7} mol m⁻² for E2 (125–139) and 1.38×10^{-6} mol m⁻² for E2 (120–139). From these values we calculated the surface molecular area (A) according to the equation:

$$A = \frac{1}{\Gamma_{\max} N} \quad (5)$$

The molecular areas obtained indicate the possibility of a α -helical conformation of the peptide with vertical orientation at the air–water interface [32–34].

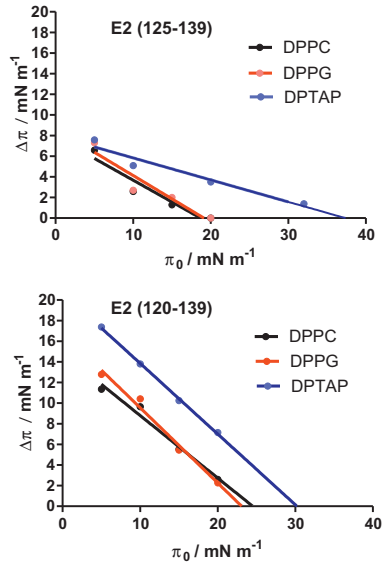


Fig. 1. Kinetics of penetration of E2 (125–139) and E2 (120–139) in DPPC, DPPG or DPTAP lipid monolayers spread at different π_0 . Peptide concentration into the Tris–HCl 10 mM pH 7.4 subphase: 0.7 μM. Extrapolation of the line to the abscissa axis gives the surface exclusion value.

3.2. The peptides insert into lipid monolayers of different charge

The concentration of the peptides in the bulk subphase was, for both of them, 0.7 μM. The plot of $\Delta\pi$ at equilibrium versus increasing π_0 shows a negative slope (Fig. 1). Extrapolation of the regression of the plot to the x-axis gives the maximum insertion pressure [35]. The general trend observed from these plots indicates that the interaction with lipids follows the order DPTAP > DPPG ≈ DPPC. As far as the peptides is concerned, in the zwitterionic and negatively charged lipids, the maximum insertion pressure is higher for the longest peptide but in the case of the positively charged, binding is higher for E2 (125–139) than for E2 (120–139). Taking into consideration that the peptides have one net negative charge at the working pH 7.4, these results indicate that the charge has an important influence in peptide binding to monolayers but that hydrophobic forces also play a role in the interaction.

3.3. The peptides form monolayers at the air–water interface

Upon compression both peptides formed isotherms (Fig. 2) with a shape characteristic of peptides with low molecular weight [36,37]. The amount of peptide extended on the air/water (Tris 10 mM, pH: 7.4) surface was in all the cases 1.6×10^{16} molecules.

The lift-off area [38] was 0.55 nm² mol⁻¹ and 2.6 nm² mol⁻¹, for E2 (125–139) and E2 (120–139), respectively. These values indicate that the peptides adopt an extended horizontal configuration in the monolayer [39]. Further compression caused a progressive increase of the pressure up to 10 mN m⁻¹ for the short peptide

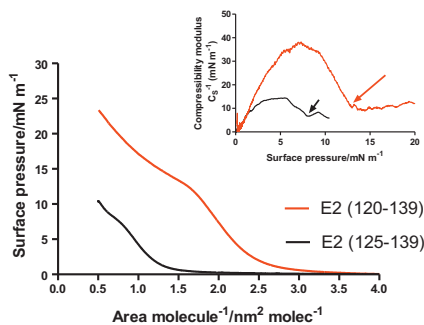


Fig. 2. π -A isotherms for E2 (125-139) and E2 (120-139) spread on a subphase of Tris-HCl 10 mM pH 7.4. Inset: compressibility modulus vs surface pressure. The arrows indicate the minima corresponding to the peptide monolayer phase transition.

and 23 mN m⁻¹ for the long. Extrapolated area (A_0) that indicates the area occupied by the molecule in the monolayer calculated in the more condensed phase, increased also in the same order: 1.2 nm² mol⁻¹ and 2.3 nm². These values are closer to the theoretical value of 1.75 nm² mol⁻¹ found for an α -helix peptide oriented perpendicular to the interface [40]. The physical state and phase transition of the monolayer can be determined in a more precise way with the plot of the compressional modulus or elasticity C_s^{-1} as a function of the surface pressure (inset of Fig. 2) [41–43]. Values were obtained by numerical calculation of the first derivative from the isotherms data points, according to the Eq. (6):

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (6)$$

C_s^{-1} increases with surface pressure increase up to 5 mN m⁻¹ for E2 (125-139) and to 7.5 mN m⁻¹ for E2 (120-139) but in any case it is higher than 50 mN m⁻¹ indicating that the peptides are in a liquid expanded state. Finally, the analysis of this modulus shows an inflection point that appears as a minimum in the figure, indicated by the arrows and that corresponds to the change of the slope in the isotherms associated to a change in the molecular organization of the peptide molecules at the air/water interface [43,44].

3.4. Mixed isotherms: miscibility studies

Compression isotherms of DPTAP, DPPC or DPPG with different molar ratios of the peptides are shown in Fig. 3. As a general trend, at areas below 0.5 nm² mol⁻¹, the presence of peptide in the monolayer clearly results in a shift of the isotherm toward lower areas in contrast to the isotherms of the pure lipid. In general, the higher the peptide into the monolayer, the lower the area occupied per molecule thus reflecting a higher packing of the molecules. This displacement is considerable for DPPC and DPTAP mixed monolayers, while for DPPG mixed monolayers, differences are not so relevant. However, at higher areas, the trend is not so clear and depends on the lipid, the peptide and their molar ratio thus indicating that the reorganization of the molecules upon compression is different.

The values of compressional modulus become smaller as the proportion of peptide in the mixed monolayer is increased. These C_s^{-1} values quantify the flatness of the plateau in the π/A curves: the smaller C_s^{-1} value, the more horizontal the plateau is. For peptide-DPPC systems, both pure components exhibit their

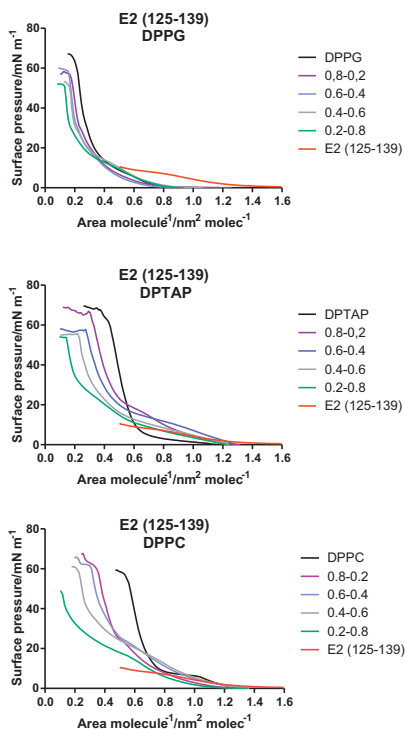


Fig. 3. Isotherms of mixed monolayers of E2 (120-139)/phospholipid at different molar ratio spread on a subphase of Tris-HCl 10 mM pH 7.4.

own phase transition. For instance, DPPC shows a typical liquid expanded–liquid condensed transition at a surface pressure about 7 mN m⁻¹. This plateau gradually disappears when the peptide is incorporated into the monolayer. These results indicate that the addition of lipid molecules hinders the reorientation of the peptides from horizontal to vertical position in mixed monolayers [45].

Except for the pure peptides as mentioned above, all isotherms show a characteristic collapse pressure (π_c) that gives information about the behavior of binary systems and is a proof of isotherm stability [46]. The variation of the monolayer collapse pressure with composition indicates 2D miscibility of peptide and phospholipid molecules at the air–water interface. In our experiments π_c values show a tendency to decrease when the molar peptide ratio increases thus, confirming the miscibility of the components of the mixtures.

To deepen into the behavior of these two-dimensional systems, we have calculated the changes of the mean molecular area (A) as a function of the film composition at different surface pressures (Eq. (7)):

$$A = A_1X_1 + A_2X_2 \quad (7)$$

where A_1 and A_2 are the mean molecular areas per molecule of a pure component (phospholipid or peptide) at the particular surface pressure, and X_1 and X_2 indicate the molar fraction of the phospholipid or peptide in the monolayer. From a thermodynamic approach, if the two components are immiscible or ideally miscible, the dependence of A versus X_{peptide} should be linear because it results from the additivity of the molecular area. Deviations from linearity indicate miscibility and non-ideal behavior. Our system shows positive deviations for E2 (125–139) and negative deviations for E2 (120–139). The strength of the deviations depends on the monolayer composition and on the surface pressure. Our thermodynamic data demonstrate that both components are miscible at the interface at the surface pressures studied in this work and their molecular interactions cause a contraction of the mixed film. This could be due to the existence of greater cohesive forces between the unlike molecules in the mixed films than between the like molecules in the pure monolayers. However, the sign and value of the excess area values alone are not decisive parameters concerning the miscibility between the film forming components.

Finally, to better discern the miscibility characteristics of these components, the excess Gibbs free energy of mixing ΔG_M^{Ex} was obtained by applying the following equation.

$$\Delta G_M^{\text{Ex}} = \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_{12} d\pi - X_1 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_1 d\pi - X_2 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (8)$$

where A_{12} is the mean molecular area in the mixed film, A_1 and A_2 are the molecular areas of the two pure components, and X_1 and X_2 are the molar fractions of monolayer components 1 and 2 [47]. The calculated ΔG_M^{Ex} values at the surface pressures of 5 and 10 mN m⁻¹ are in all cases negative, proving the existence of attractive forces between the phospholipid and the peptides [48]. These results indicate that the interaction between the peptide and the lipid is more favorable than between the pure components themselves. In all cases, there is a minimum of ΔG_M^{Ex} value at a molar fraction of 0.8. The only exception in the sign of ΔG_M^{Ex} is for DPPG-E2 (120–139) mixed monolayers at 15 mN m⁻¹ at the molar fraction peptide/DPPG of 0.4 that shows a ΔG_M^{Ex} positive: 422 J mol⁻¹. A positive ΔG_M^{Ex} reveals that the process of peptide-lipid mixing is not thermodynamically favored, and therefore repulsive or less attractive interaction must prevail in the mixtures with regard to the pure monolayers [43]. However, in general, the mixtures have $\Delta G_M^{\text{Ex}} < RT$ (2477.6 J mol⁻¹) and can be considered ideal systems.

3.5. E2 (125–139) and E2 (120–139) induce leakage of solutes entrapped into LUVs and lipid mixing

Both peptides were unable to release DPX-ANTS [49] encapsulated into DPPC or DPPC/DPPG (95/5) vesicles regardless of the peptide–lipid molar ratio. Taking into consideration that peptide–membrane interactions can vary significantly with acyl-chain length, because of the effect of this length on membrane thickness [50], the experiment was repeated with bilayers made up with POPG [51]. For this composition, peptide addition to a cuvette containing LUVs resulted in an increase in fluorescence emission at 530 nm as a consequence of dequenching of ANTS by dilution into the media. Maximum leakage was reached at a peptide/lipid molar ratio of 0.25. Further addition resulted in an increase of the turbidity of the media as a proof of liposome aggregation.

On another hand, the ability of the peptides to induce inter-vesicular lipid mixing of LUVs was also strongly depending on lipid composition. No FRET was observed for liposomes composed of C₁₆ phospholipids. The change of lipid composition for C₁₄ phospholipids that gives more fluid membranes, resulted in an increase in

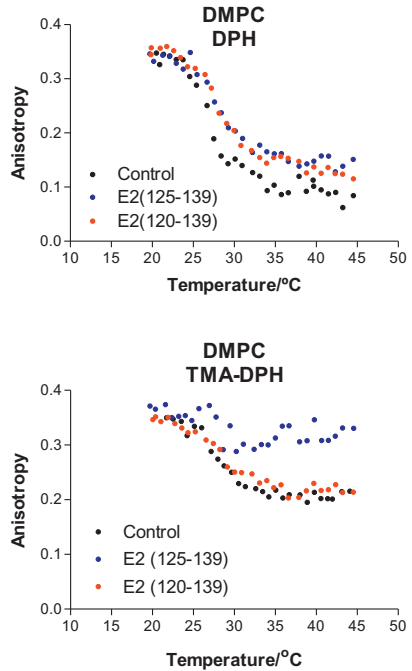


Fig. 4. Changes in DPH and TMA-DPH anisotropy vs temperature in DMPC LUVs in the presence or absence of E2 (125–139) or E2 (120–139).

lipid mixing up to a 13% and 28% for E2 (125–139) and E2 (120–139), respectively at a peptide/lipid molar ratio of 0.2. Turbidity was also observed for higher peptide/lipid molar ratios.

3.6. E2 (125–139) and E2 (120–139) perturb liposome microenvironment

Values of anisotropy upon peptide addition to LUVs depended on both lipid and probe (Fig. 4). While no modifications in r were observed with LUVs of DMPC/DMPC (95:5), DPPC and its mixtures with DPPG or DPTAP, changes were noticed with DMPC. For LUVs of DMPC labeled with DPH, peptide addition resulted in a deviation with respect to the profile of the control LUVs. In that case, r in presence of peptide was higher than in its absence in the neighborhood of the transition temperature and all above this temperature as an indication that the probe was in a more rigid environment [52,53]. The analysis of DMPC LUVs with TMA-DPH showed dispersed r values for E2 (125–13), probably as a consequence of vesicle aggregation as mentioned above. In addition, the cooling profile showed a remarkable hysteresis in the liquid crystal. Another evidence of charge influence in peptide interaction was given with the results obtained with DMPC/TMA-DPH or DMPC/DPH in which samples with and without peptide overlapped.

Table 1

Analysis of E2 (125–139) peptide conformation in Hepes buffer, TFE, HFIP and SDS from CD data by Lincomb–Brahms and Contin programs.

	Lincomb–Brahms			
	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random coil
E2 Hepes	0	30	14	56
E2 50% TFE	8	26	11	55
E2 50% HFIP	9	28	9	54
E2 20 mM SDS	9	23	12	56
	Contin			
	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random coil
E2 Hepes	0	0	38	62
E2 50% TFE	18	32	27	23
E2 50% HFIP	22	31	27	19
E2 20 mM SDS	33	31	24	12

3.7. Circular dichroism measurements

Due to the fact that by the other techniques both peptides behaved similarly being the only difference the magnitude of the effect, CD studies were performed only with the E2 (125–139) sequence. Moreover, this sequence has already shown to be a good candidate for the diagnosis of GBV-C infection [9,12]. The semi-empirical method of Chou and Fasman [54] to predict theoretically the secondary structure of the peptides was applied using the Peptide Companion computer program. The results clearly showed a random coil structure over helical, sheet and turn conformations. Accordingly, the prediction of the helical behavior of the peptides using GOR IV, which is based on known secondary structures of peptides, yielded very low α -helix contents.

The conformation of E2 (125–139) has been analyzed experimentally by CD in the far UV region. Spectral changes were not observed up to 100 μ M peptide concentration. Therefore, potential peptide–peptide interactions in solution, i.e. peptide aggregation, were absent at the peptide concentration studied 30 μ M.

To mimic the conformation of the peptide in biological membranes we investigated the structure of E2 (125–139) in media of different polarity. Thus, peptide conformation was studied in aqueous buffer (Hepes 5 mM pH 7.4), TFE, HFIP, SDS and liposomes of different lipid composition.

Initial CD experiments were carried out at 5 °C with the peptide being dissolved in Hepes buffer. The CD spectra of the peptide at 15 μ M, 30 μ M, 60 μ M and 100 μ M were indicative of a random coil conformation. The lack of negative $n-\pi^*$ band and the location of $\pi-\pi^*$ band at $\lambda = 198$ indicates that the E2 (125–139) peptide is essentially disordered. The peptide spectra looked like a random coil. In agreement with this fact, numerical deconvolution data by Lincomb–Brahms and Contin programs that are shown in Table 1, mainly evaluate random coil and β -structure conformations.

To investigate the conformational behavior of the peptide in a quasi-membrane but homogeneous environment, we used several organic solvents (TFE and HFIP) with dielectric constants between pure water and the hydrocarbon chains of biological membranes. In these media and similarly to other results found in the literature [55,56] a different peptide secondary structure was induced with a bias toward α -helix conformation. When the peptide sequence was analyzed in TFE the resulting spectra showed two negative bands (208 and 222 nm), which could be attributed to a higher α -structure contribution. The addition of HFIP also stabilized α -helix conformations. After deconvolutions of spectra by Lincomb–Brahms and Contin computer programs, good correlations were obtained between numerical data and CD spectra (Table 1). In this sense, in the spectra obtained after the addition of 50% TFE or 50% HFIP, clearly higher α -helix contents were induced by these membrane

Table 2

Analysis of E2 (125–139) peptide conformation in Hepes buffer, and liposomes of different lipid composition (DPPC/DPPC/DPPG, DPPC/DPTAP) by Lincomb–Brahms program.

	Lincomb–Brahms			
	α -Helix	β -Sheet	β -Turn	Random Coil
E2 Hepes	0	30	14	56
E2 DPPC	9	29	35	24
E2 DPPC/DPPG	10	8	23	59
E2 DPPC/DPTAP	32	7	61	0

Table 3

Mean residue ellipticity of E2 (125–139) at 222 nm, in buffer or in the presence of liposomes of different lipid composition, expressed in deg cm²/dmol.

	Ellipticity [θ] ₂₂₂
E2 Hepes	–444.5
E2 DPPC	–2036.4
E2 DPPC/DPPG	–1006.5
E2 DPPC/DPTAP	–3977.5

mimetic solvents. Around 20% of α -helix could be measured by Contin program.

On the other hand, it is widely known that peptide–lipid interactions can be mimicked by peptides dissolved in micellar solutions. While a number of micellar systems can be employed to study peptide–lipid interactions, micelles formed by SDS have been used mostly. Concentrations above the critical micellar concentration of SDS have been reported to be stabilizers of the α -helix conformation [57]. In fact, our results show that 5 mM SDS contribute to stabilize preferentially the α -helix structures. Accordingly, when deconvolution programs were used we could also quantify more ordered spectra toward α -helix conformations. By Contin program 13% of helical content was quantified for the spectrum obtained at 5 mM SDS. This value was increased till 33% when the CD spectrum was registered at 20 mM SDS.

The interactions between peptides and lipid bilayers play a crucial role in the perturbation activity and/or disruption of cellular function. During these interactions, peptides generally exhibit a conformational transition from extended random coil in aqueous environment to a stabilized unique secondary structure upon interaction with the membrane, which is either preceded by or followed by enhanced binding through electrostatic interaction [58]. The dynamic interactions between the peptide and membrane lipids are therefore key elements in the biological activities of peptides as well as in the specificity of their activity.

As previously reported [59–61], the interaction of peptides with membranes may be affected by phospholipid composition. Consequently, in order to evaluate the conformational behavior of the synthetic peptide in the presence of liposomes, zwitterionic (DPPC), negative (DPPG) and positive (DPTAP) large unilamellar vesicles were obtained. The results, shown in Tables 2 and 3, clearly demonstrate the influence of the positive charge for the induction of more ordered conformations within the peptide. Also the zwitterionic lipid composition induced a higher content in peptide helicity than the negatively charged lipid vesicles.

4. Conclusions

The two sequences formed stable monolayers at the air/water interface with E2 (120–139) peptide occupying greater area per molecule than E2 (125–139). Both peptides interacted preferably with cationic DPTAP than with zwitterionic DPPC or anionic DPPG. Exclusion pressure in presence of DPTAP was higher than the estimated lateral pressure of natural bilayers which is comprised between 30 and 35 mN m^{–1} and could be an indication of peptide

penetration into cationic membranes. Unfortunately, the biological interest of these peptides requires the penetration into membranes of zwitterionic or anionic nature and in that case, the exclusion pressure was lower than the above value. However, taking into account that peptide-membrane interactions are very often driven by conformational changes, molecular areas found in the surface activity measurements and isotherms were in concordance with the conformation data obtained by CD. In both types of experiments, the presence of lipid favored the conformational change to a more ordered form. CD revealed a decrease of β -sheet in favor of α -helix when lipid was present in the media. This increase in α -helix confirmation although higher in presence of DPTAP, was also significant for the other lipids. In light of these results, we suggest that the peptides mainly adopt a random coil conformation in the sub-phase, favoring a faster diffusion to the interface. However, once at the interface, their molecules rearrange decreasing their degree of freedom.

On another hand, membrane lytic activity and bilayer aggregation as a consequence of both peptides was found to depend strongly on membrane composition and lipid/peptide ratio. Similarly to the data found with monolayer experiments, results with bilayers suggest that the peptides are likely to possess high membrane binding due to the charge. The last conclusion from our studies is related to the fact that a difference in 5 amino acid from E2 (125–139) and E2 (120–139) did change the magnitude of the interaction but not its nature.

In summary, the objective of this study to uncover the physicochemical principles underlying the interaction of peptides with membranes has been achieved and supposes one more step in the comprehension of peptide role in GBV-C infection and its possible implication in HIV cycle.

Acknowledgements

This work is supported by project CTQ2009-13969-C02-1/02-BQU from the Secretaría de Estado de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). We are members of the consolidated research group by the Generalitat de Catalunya: Peptides and Proteins: physicochemical studies (2009SGR560).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.11.026>.

References

- [1] J.T. Stapleton, *Semin. Liver Dis.* 23 (2003) 137–148.
- [2] B. Kupfer, T. Ruf, B. Matz, Bertfried, J. Nattermann, U. Spengler, J.K. Rockstroh, H.H. Brackmann, J. Bluemel, M. Tacke, R. Kaiser, *J. Clin. Virol.* 34 (2005) 42–47.
- [3] R.S. Brown, *Nature* 436 (2005) 973–978.
- [4] N. Bhattarai, J.T. Stapleton, *Trends Microbiol.* 20 (2012) 124–130.
- [5] J.T. Stapleton, C.F. Williams, J. Xiang, *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 1919–1915.
- [6] W. Zhang, K. Chaloner, H.L. Tillmann, C.F. Williams, J.T. Stapleton, *HIV Med.* 7 (2006) 173–180.
- [7] E.M. Shankar, S.S. Solomon, R. Vignesh, K. Murugavel, M. Sundaram, S. Solomon, P. Balakrishnan, N. Kumarasamy, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (2008) 1176–1180.
- [8] E.L. Mohr, J. Xiang, J.H. McLinden, T.M. Kaufman, Q. Chang, D.C. Montefiori, D. Klinzman, J.T. Stapleton, *J. Immunol.* 185 (2010) 4496–4505.
- [9] M.J. Gómar, L. Fernández, T. Pérez, S. Tenckhoff, A. Casanovas, H.L. Tillmann, I. Haro, *Chem. Biol. Drug Res.* 78 (2011) 277–282.
- [10] E. Tanaka, K. Kiyosawa, K. Shimoda, K. Hino, M. Tacke, S. Scholke, A.M. Engel, G. Hess, *J. Viral Hepat.* 5 (1998) 153–159.
- [11] Y. Koedel, K. Eissmann, H. Wend, B. Fleckenstein, H. Reil, *J. Virol.* 85 (2011) 7037–7047.
- [12] M.J. Gómar, L. Fernández, T. Pérez, G. Ercilla, I. Haro, *Anal. Biochem.* 396 (2010) 51–58.
- [13] E.L. Mohr, J. Xiang, J.H. McLinden, T.M. Kaufman, Q. Chang, D.C. Montefiori, D.C. Klinzman, J.T. Stapleton, *J. Immunol.* 15 (2012) 4496–4505.
- [14] A.S. Fauci, M.I. Johnston, C.W. Dieffenbach, D.R. Burton, S.M. Hammer, J. Hoxie, M. Martin, J. Overbaugh, D.I. Watkins, A. Mahmood, W.C. Greene, *Science* 321 (2008) 530–532.
- [15] K. Ariga, J.P. Hill, *Chem. Rec.* 11 (2011) 199–211.
- [16] J.A. Zasadzinski, J. Ding, H.E. Warriner, F. Bringezu, A.J. Waring, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 6 (2001) 506–513.
- [17] J. Minones, S. Pais, J. Minones, O. Conde, P. Dynarowicz-Latka, *Biophys. Chem.* 140 (2009) 69–77.
- [18] M.J. Sánchez-Martín, M.A. Busquets, V. Girona, I. Haro, M.A. Alsina, M. Pujol, *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes* 1808 (2011) 2178–2188.
- [19] L. Chize, V.M. Bolanos-Garcia, M. Pinot, B. Desbat, A. Renault, S. Beaufils, V. Vie, *J. Mol. Biol.* 410 (2011) 60–76.
- [20] M. Anko, J. Majhenc, K. Kogej, R. Sillard, U. Langel, G. Anderlüh, M. Zorko, *Biochim. Biophys. Acta: Biomembranes* 1818 (2012) 915–924.
- [21] C. Larios, M.A. Busquets, J. Carilla, M.A. Alsina, I. Haro, *Langmuir* 20 (2004) 1160–11149.
- [22] S.R. Dennison, A.P. David, *Biochemistry* 50 (2011) 1514–1523.
- [23] I. Haro, M.J. Gomara, R. Galatola, O. Domenech, J. Prat, V. Girona, M.A. Busquets, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 73–1567.
- [24] K. Temming, R.M. Schiefelers, G. Molema, R.J. Kok, *Drug Res. Update* 8 (2005) 381–402.
- [25] N. Rojo, G. Ercilla, I. Haro, *Curr. Protein Peptide Sci.* 4 (2003) 291–298.
- [26] M. Rafalski, J.D. Lear, W.F. DeGrado, *Biochemistry* 29 (1990) 7917–7922.
- [27] C.W. McClare, *Anal. Biochem.* 39 (1971) 527–530.
- [28] H. Ellens, J. Benz, F.C. Szoka, *Biochemistry* 24 (1985) 3099–3106.
- [29] D.K. Struz, D. Hoekstra, R.E. Pagan, *Biochemistry* 20 (1981) 4093–4099.
- [30] M.M. Juhán, M.M. Javádpour, M.D. Barkley, *Methods Mol. Biol.* 78 (1997) 73–78.
- [31] S.E. Blondelle, B. Forood, R.A. Houghten, E. Perez-Paya, *Biopolymers* 42 (1997) 489–498.
- [32] J. Cantó, J.A. Pérez, N.B. Centeno, I. Haro, J.J. Pérez, *Lett. Peptide Sci.* 4 (1997) 13–19.
- [33] M.J. Sánchez-Martín, I. Haro, M.A. Alsina, M.A. Busquets, M. Pujol, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 448–456.
- [34] R. Maget-Dana, D. Lelièvre, A. Brack, *Biopolymers* 49 (1999) 415–423.
- [35] S. Bussièrés, L. Cantin, B. Desbat, C. Saless, *Langmuir* 28 (2012) 3516–3523.
- [36] M. Nieto-Suárez, N. Vila-Romeu, I. Prieto, *Thin Solid Films* 516 (2008) 8873–8879.
- [37] G. Matar, M.N. Nasir, F.J. Besson, *Colloid Interface Sci.* 352 (2010) 520–525.
- [38] N. Vila Romeu, J. Miñones Trillo, O. Conde, M. Casas, E. Iribarnegaray, *Langmuir* 13 (1997) 71–75.
- [39] S. Steinkopf, A.K. Schelderpup, H.L. Gjerde, J. Feiffer, S.V. Thoresen, A.U. Gjerde, H. Holmsen, *Biophys. Chem.* 134 (2008) 39–46.
- [40] E.E. Ambrogio, F. Separovic, J. Bowie, G.D. Fidelio, *Biochim. Biophys. Acta* 1664 (2004) 415–423.
- [41] A. Chávez, I. Haro, M.A. Alsina, Y. Cajal, *Langmuir* 15 (1999) 1101–1107.
- [42] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience Publishers, New York, 1966.
- [43] S. Perez-Lopez, M. Nieto-Suarez, C. Mestres, M.A. Alsina, I. Haro, N. Vila-Romeu, *Biophys. Chem.* 141 (2009) 153–161.
- [44] M. Miñones Conde, O. Conde, J.M. Trillo, J. Minones, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 8667–8678.
- [45] S. Perez-Lopez, N.M. Blanco-Vila, N. Vila-Romeu, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 9387–9394.
- [46] J. Miñones, P. Dynarowicz-Latka, O. Conde, J. Miñones, E. Iribarnegaray, M. Casa, *Colloid Surf. B: Biointerfaces* 29 (2003) 205–215.
- [47] J. Miñones Jr., J. Minones, *Recent Res. Dev. Surf. Colloids* 1 (2004) 21–42.
- [48] J. Miñones, S. Pais, J. Minones, J.O. Conde, P. Dynarowicz-Latka, *Biophys. Chem.* 140 (2009) 69–77.
- [49] J.R. Brender, K. Hartman, L.M. Gottle, M.E. Cavitt, D.W. Youngstrom, A. Ramamoorthy, *Biophys. J.* 97 (2009) 2474–2483.
- [50] F. Nicol, S. Nir, F.C. Szoka Jr., *Biophys. J.* 78 (2000) 818–829.
- [51] M.J. Sánchez-Martín, K. Hristova, M. Pujol, M.J. Gómar, I. Haro, M.A. Alsina, M.A. Busquets, *J. Colloid Interface Sci.* 360 (2011) 124–131.
- [52] B.R. Lentz, *Chem. Phys. Lipids* 64 (1993) 99–116.
- [53] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, 2006.
- [54] P.Y. Chou, G.D. Fasman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47 (1978) 45–148.
- [55] J. Garnier, J.F. Gibart, B. Robson, in: R.F. Doolittle (Ed.), *Methods in Enzymology*, Elsevier, Pasadena, USA, vol. 266, 1996, pp. 540–553.
- [56] P. Khandelwal, S. Seth, R.V. Hosur, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 468–478.
- [57] A. Dong, J. Matsuura, M.C. Manning, J.F. Carpenter, *Arch. Biochem. Biophys.* 355 (1998) 275–281.
- [58] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, 2nd ed., Wiley & Sons, New York, 1980, pp. 66–70.
- [59] S.E. Blondelle, K. Lohner, F. Aguilier, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999) 89–108.
- [60] J.A. Pérez, J. Cantó, F. Reig, J.J. Pérez, I. Haro, *Biopolymers* 45 (1998) 479–492.
- [61] P. Sospedra, M. Muñoz, M. García, M.A. Alsina, C. Mestres, I. Haro, *Biopolymers* 54 (2000) 477–488.

Article 6

Efecte de la Merocianina 540 en monocapes de Langmuir-Blodgett i en liposomes de composició lipídica zwitterionica, aniònica i catiònica..

Alay, M., Prat, J., Alsina, M. A., & Busquets, M. A.

Departament de Físicoquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de
Barcelona.

Alay, M., Prat, J., Alsina, M. A., & Busquets, M. A. (2004). Effect of Merocyanine 540 on Langmuir-Blodgett films and liposomes of zwitterionic, anionic and cationic lipid composition. *Journal de Physique IV* 113: 3-6.

Resum

S'ha analitzat la interacció de la sonda aniònica merocianina 540 (MC_{540}) amb mono i bicapes de diferent composició lipídica per tal de determinar la penetració de la sonda i estudiar la influència de càrrega dels lípids en la seva activitat. La tècnica de Langmuir-Blodgett ha demostrat que la sonda és capaç d'incorporar-se sobretot en monocapes de lípids catiònics compostos de dimiristoil-fosfatidil-colina/dimiristoil trimetil-aminopropà (DMPC / DMPTAP) (75:25, *mol : mol*). No obstant això, quan les pressions superficials són baixes, la sonda també es pot allotjar a la interfície de les monocapes zwitteriòniques de dimiristoil-fosfatidil-colina (DMPC) i també de les aniòniques formades per dimiristoilfosfatidilcolina/dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPC / DMPG) (75:25, *mol : mol*). Aquests resultats concorden amb els estudis realitzats amb liposomes unilamel·lars grans de les mateixes composicions lipídiques, en els quals s'ha observat la modificació dels màxims d'absorció de la sonda quan aquesta es troba incubada en els diferents liposomes utilitzats.

Effect of Merocyanine 540 on Langmuir-Blodgett films and liposomes of zwitterionic, anionic and cationic lipid composition

M. Alay, J. Prat, M.A. Alsina and M.A. Busquets

Physical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Av. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain

Abstract. The interaction of the anionic probe Merocyanine 540 (MC540) with mono and bilayers of different lipid composition has been analyzed in order to get insight in the lipid charge influence on probe activity. The Langmuir-Blodgett technique showed that MC540 was able to incorporate predominantly into cationic lipid monolayers composed of Dimyristoyl phosphatidyl choline/ Dimyristoyl trimethyl ammonium-propane (DMPC/DMPTAP) (75:25, mol:mol). However, at low surface pressures, the probe could also allocate into the interface of the zwitterionic Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) and the anionic Dimyristoyl phosphatidyl choline/ Dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPC/ DMPG) (75:25, mol:mol) thus indicating a low interaction with these lipid compositions. These results were in agreement with the studies performed with Large Unilamellar Vesicles (LUVs) of the same lipid compositions based in the spectroscopic analysis of probe absorption maxima modification upon its incorporation into the lipid bilayers.

1. INTRODUCTION

Merocyanine 540 is an amphipathic anionic probe that has been shown to be useful to examine lipid head group spacing as well as the surface properties of mono and bilayers [1, 2]. Probe incorporation into the monolayers depends strongly on the lipid composition [3]. In this work, we use lipid monolayers of different charge Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) (zwitterionic), Dimyristoyl phosphatidyl choline/ Dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPC/ DMPG) (75:25, mol:mol) (anionic) or Dimyristoyl phosphatidyl choline/ Dimyristoyl trimethyl ammonium-propane (DMPC/DMPTAP) (75:25, mol:mol) (cationic) to investigate the influence of neutral, negative and positive charge in the interaction of the dye with model membranes. This work is in agreement with the studies performed with Large unilamellar vesicles (LUVs) of the same composition where various probe to phospholipid molecular ratios were analysed by spectroscopic techniques. The increase in the lipid/dye ratio results in a bathochromic shift concomitant with and hyperchromic effect.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC), Dimyristoyl trimethyl ammonium propane (DMPTAP), Dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPC/DMPG) were from Avanti Lipids and were used without further purification. Merocyanine 540 (MC540) was from Sigma. Chloroform and methanol (pro analysis) were from Merck. Water was double distilled and deionized (Milli-Q system, Millipore Corp.). Tris 10 mM, pH 7.4 was used throughout the experiment.

2.2. Compression isotherms (curves area/pressure)

Lipids from a chloroform/ methanol (2:1, v/v) solution (1mg/ml) were spread on a buffered subphase Tris 10mM, pH 7.4, containing 3.5 mM merocyanine 540. Control experiments were done in the same way but without probe into the subphase. After 10 min allowed for solvent evaporation,

films were compressed symmetrically up to their collapse pressure using two Teflon moving barriers at a speed of $50\text{cm}^2/\text{min}$ on a Langmuir Blodgett system (Nima Coventry, UK). Each run was repeated three times and the reproducibility was $0.01\text{nm}^2/\text{molecule}$. The temperature of the subphase was $21\pm 0.5^\circ\text{C}$.

2.3. Spectroscopic studies

Large unilamellar vesicles (LUVs) of Dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC), Dimyristoyl phosphatidyl choline/ Dimyristoyl phosphatidyl glycerol (DMPC/DMPG) (75:25), and Dimyristoyl phosphatidyl choline/Dimyristoyl trimethyl ammonium propane (DMPC/DMPTAP) (75:25), were prepared by the extrusion method [4] (Northern lipids Inc., Canada) by passing the lipid dispersion (10 mmol/L Tris, pH 7.4) 10 times through 25 mm polycarbonate filters with $0.1\mu\text{m}$ pore size (Nucleopore Corp., Canada). Liposomes size was $110\pm 3\text{ nm}$ with a polydispersity index of 0.01 ± 0.02 . MC₅₄₀ was incorporated to the lipid bilayer by incubating the probe with the performed LUVs. Absorption spectra were recorded in a Shimadzu UV-2401 PC spectrophotometer, between 400 and 650 nm with 1-nm steps. Spectra at various lipid/dye molar ratios were recorded at $23\pm 0.5^\circ\text{C}$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Figures 1, 2 and 3 show the compression isotherms of the lipids in absence and presence of MC₅₄₀ in the subphase.

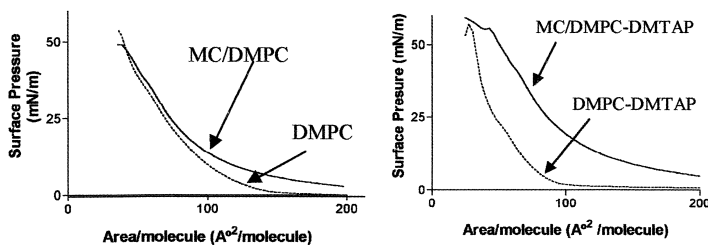


Figure 1: Isotherms of surface pressure vs. mean molecular area for monolayers of DMPC (zwitterionic lipid). Monolayers were formed by spreading the lipids at the interface on a subphase of Tris 10 mM , pH 7.4 alone or containing MC₅₄₀ (3.5mM).

Figure 2: Isotherms of surface pressure vs. mean molecular area for monolayers of DMPC/DMTAP

For all the lipids tested, we observe an expanding effect of the probe (curves in presence of MC₅₄₀ are displaced to the left) if compared to the lipid(s) alone, indicating an incorporation of MC into the lipid monolayer. Probe incorporation and thus interaction with lipids is clear at low pressures (high areas), however, for the zwitterionic DMPC and the anionic mixture (DMPC/DMPG) the probe seems to be squeezed out from the monolayer at high surface pressures. At low pressures, the area available for the molecules is big and in the case of DMPG, the electrostatic repulsion is low.

When decreasing the area available upon monolayer compression, molecules are closer and the negative charges of MC₅₄₀ and DMPG result in an electrostatic repulsion. Merocyanine is then expelled from the surface and solved again into the subphase, while the lipid remains at the

interface air/water. A similar trend is observed in presence of DMPC although in this case we can not attribute probe expulsion to electrostatic repulsion because of the neutral nature of the lipid.

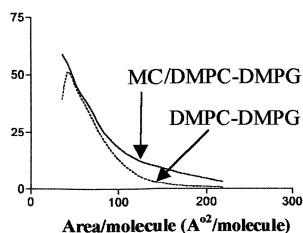


Figure 3. Effect of Merocyanine 540 (3.5mM into subphase) on the anionic mixture DMPC/DMPG (75:25, mol:mol).

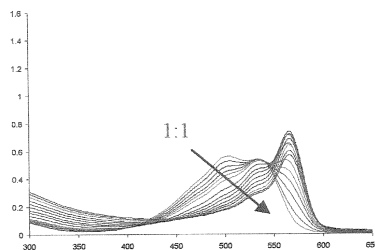


Figure 4. Visible absorption spectra of MC540 in suspension of liposomes of DMPC/DMPG (75:25, mol:mol) at growing lipide/dye ratio: aqueous solution of MC540 ,1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 7:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 65:1, 70:1.

Although merocyanine is able to incorporate into bilayers [3] it seems to have a preferential affinity for the aqueous media. Differences could be due to the formation of J-aggregates depending on the lipid as it has been observed in the case of mixtures of arachidic acid/MC540 [5]. Results obtained in presence of the cationic mixture were expected considering the differences in charge of the lipids and the probe. Pressure in presence of the probe is high before compression and remains much higher than the one of the control during compression. In that case, it looks like a tight interaction between the lipid mixture and the probe as a consequence of the strong attraction between them. These results indicate a clear electrostatic interaction of the probe with the lipids. Data obtained by absorption spectroscopy are in agreement with this conclusion. In aqueous solution MC540, shows two absorption maxima, at 500 nm (dimer peak) and at 533 nm (a monomer peak). In the presence of liposomes, the absorption maximum of the two main peaks undergoes a bathochromic shift. This suggests a hydrophobic environment of the probe chromophore [6]. As we saw in the isotherms, the presence of anionic charges in liposomes causes a slight electrostatic repulsion, thereby MC540 is expelled into subphase, this explains that the presence of DMPG in liposomes reduces the quantity of monomer-bound to the membrane, also the absorption maximum of membrane-bound dimer decreases, it may indicate that there is less proportion of dye bound to the membrane.

With the cationic membranes the absorption maximum of membrane-bound dimer increases, it should be caused by a new spatial disposition of MC540 in the membrane that makes easy the formation of membrane-bound dimer.

All results indicate a clear electrostatic interaction of the probe with lipids in agreement with results obtained with lipid bilayers analyzed with spectroscopic techniques [3].

These findings are of interest in view to probe application as an external probe in the study of molecules interaction with model membranes.

Acknowledgements

This work was funded by the grant BQU2000-079-C02-01 from the Ministerio de Ciencia Tecnología (CICYT) (Spain).

References

1. M. Langner, S.W. Hui, *Biochim. Biophys Acta*, **1415**, 323 (1999).
2. D.K. Hinch, A.E. Oliver, J.H. Crowe, *Biophys. J.*, **77**, 2024 (1999).
3. M. Alay, J. Prat, I. Haro, N. Rojo, M.A. Alsina, M.A. Busquets, *Talanta*, **60**, 269 (2003).
4. New RRC. Preparation of liposomes. IN *Liposomes: a Practical Approach*, New RRC (ed.) IRL Press: Oxford, 1990, Chapter 2.
5. Y. Hirano, J. Kawata, Y.F. Miura, M. Sugi, T. Ishii, *Thin Solid Films*, **345**, 327 (1998).
6. R. Sabaté, M. Gallardo, J. Estelrich, *J. Colloid and Interface Sci.*, **233**, 205 (2002).

IV. DISCUSSIÓ

Com ja s'ha comentat anteriorment hi ha evidències que la proteïna E2 de l'embolcall del virus GBV-C posseeix una acció inhibidora sobre el virus VIH i per tant l'existència de fraccions d'aquesta proteïna en l'hoste infectat podrien reduir la progressió de la SIDA. Per aquest motiu, el present treball pretén caracteritzar i estudiar la interacció amb models de membrana de tres seqüències peptídiques, totes elles fragments de la proteïna E2 de l'embolcall del virus GBV-C per tal d'esbrinar les propietats que afavoreixen la interacció dels pèptids amb les cèl·lules diana. Amb aquests estudis s'esperava obtenir informació bàsica d'utilitat per a investigacions posteriors amb pèptids derivats del HIV.

Els diferents passos que s'han seguit per a fer aquests estudis són la selecció de les seqüències peptídiques, la determinació de la seva activitat superficial per a conèixer la capacitat que tenen de formar monocapes estables, l'estudi de les propietats d'interacció amb models de membrana de diferent composició lipídica mitjançant cinètiques de penetració i isoterms de compressió, estudis d'interacció més complexes amb bicapes mitjançant diferents tècniques de fluorescència i finalment estudis conformacionals per a determinar si les conformacions espacials que adquirien podien afavorir la seva interacció amb les membranes.

1. Selecció de pèptids

S'han estudiat tres pèptids, de longitud, seqüència i càrrega neta a pH:7,4:

1. E2 (99-118): VSWFASTGGRDSKIDVWSLV (20 aminoàcids), neutre (Rojo et al., 2003)
2. E2 (120-139): VGSASCTIAALGSSDRDTVV (20 aminoàcids), negativa (Alay et al., 2013)
3. E2 (125-139): CTIAALGSSDRDTVV (15 aminoàcids), negativa (Alay et al., 2013)

El pèptid de partida va ser el E2 (125-139) que es va seleccionar després de comparar les proteïnes estructurals del GBV-C de diferents virus aïllats segons les múltiples seqüències d'alineació del programa CLUSTALW, a partir de les quals es va obtenir un 99% d'homologia sobre les seqüències descrites del pèptid E2. Un altre criteri de selecció va ser la determinació de les regions exposades a la superfície del virus segons els perfils d'hidrofobicitat i accessibilitat de Hopp and Woods and Jennin, respectivament.

Per una altra banda, el pèptid E2 (120-139) es va sintetitzar per tal observar l'efecte de la longitud de la cadena en la interacció amb models de membrana.

Finalment, la seqüència E2 (99-118), sintetitzada segons els mateixos criteris indicats anteriorment (Rojo et al., 2003), va ser escollida com a patró donada la seva activitat demostrada en estudis anteriors i pel fet de tenir el residu de triptòfan que confereix fluorescència intrínseca a la molècula.

2. Selecció de lípids

El criteri seguit per a la selecció dels lípids a emprar en els models de membrana: monocapes lipídiques i liposomes, es va basar en la longitud de la cadena hidrocarbonada i el cap polar segons s'indica a la Taula IV.1, per tal d'esbrinar la influència del grau d'hidrofobicitat i de la càrrega en les interaccions.

Taula IV.1.: Característiques dels fosfolípids emprats en la present tesi. En tots els casos, les cadenes hidrocarbonades estan saturades.

Lípid	N ^o àtoms carboni cadenes hidrocarbonades	Càrrega (pH: 7,4)
DMPC	C_{14}	Zwitteriònica
DMPG	C_{14}	Aniònica
DPPC	C_{16}	Zwitteriònica
DPPG	C_{16}	Aniònica
DPTAP	C_{16}	Catiònica

Un altre factor determinant en aquesta elecció van ser les tècniques destinades a l'estudi. Algunes d'elles com el DSC i l'anisotropia per fluorescència estaven condicionades a les propietats termotròpiques dels lípids. Per aquestes raons, es van escollir lípids sintètics de longitud de cadena definida (àcid mirístic: C_{14} i àcid palmític: C_{16}) i saturada caracteritzats per una temperatura de transició de gel a cristall líquid, T_m , coneguda. En el cas de les barreges, es van fer distintes combinacions. Així les consistents en lípids de distinta longitud de cadena acíclica, DMPC/DPPC (1:1), es vo-

lia veure la capacitat de fusió dels liposomes en presència de les seqüències peptídiques mitjançant la tècnica de DSC. Per als liposomes, el termograma presentava dos pics característics de cada una de les T_m , $\approx 23^\circ\text{C}$ per DMPC i $\approx 410^\circ\text{C}$ per DPPC. S'esperava que la presència de pèptid provoqués un desplaçament d'aquests pics o/i l'aparició d'un pic a una temperatura intermitja. No obstant, malgrat no es va observar aquest efecte, es va pensar que aquestes barreges podrien donar resultats en altres assaigs. Finalment, pel que fa al cap polar, es van escollir fosfolípids zwitteriònics amb colina (DMPC, DPPC), aniònics amb glicerol (DMPG i DPPG) i catiònic amb trimetil amoni (DPTAP).

3. Estudis d'activitat superficial dels pèptids

Les propietats superficials dels pèptids s'han analitzat segons es descriu en diferents articles (Sánchez-Martín, et al., 2011) en una cubeta rodona de Tefló amb solució tampó TRIS 10mM, a pH: 7,4 a la subfase. La mesura de la pressió superficial (π) s'ha realitzat mitjançant el mètode Wilhemy que consisteix en la introducció parcial en una subfase, d'una làmina de platí o de paper de filtre que es troba unida a una electrobalança, la qual enregistra la força deguda a la tensió superficial que la superfície del líquid exerceix sobre la làmina.

S'han realitzat diferents cinètiques, en les que a cada una d'elles s'ha injectat volums creixents de solució concentrada dels pèptids a la subfase, la qual s'ha mantingut en constant agitació. Així, s'ha enregistrat la variació de la π en funció del temps fins assolir l'equilibri. De les dades del registre d'activitats superficials s'ha pogut observar una relació directa entre el nombre d'aminoàcids del pèptid i la pressió superficial, a més longitud peptídica més pressió superficial (Figura IV.1).

Per una altra part, a baixes concentracions de pèptid l'adsorció és gradual i, com més alta és la concentració de pèptid a la subfase, més ràpid és el procés d'incorporació i més elevada és la pressió superficial enregistrada. L'E2 (125-139) assoleix el màxim de pressió a $7,7\text{ mN/m}$ a una concentració a la subfase (concentració de saturació) d'aproximadament $1,5\ \mu\text{m}$ ($K = 0,13\mu\text{m}$) mentre que l'E2 (120-139) l'assoleix a una pressió de $16,3\text{ mN/m}$ i a una concentració de $2,0\ \mu\text{m}$ ($K = 0,28\mu\text{m}$), respectivament. Les dades per a l'E2 (99-118) van ser del mateix ordre que per a l'E2 (120-139).

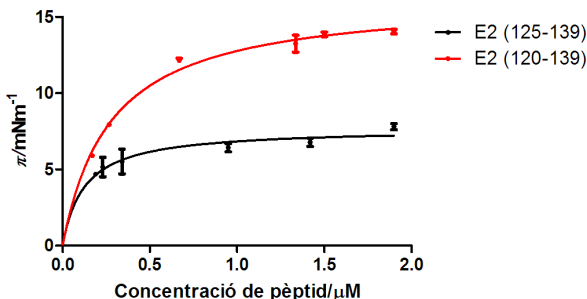


Figura IV.1.: Activitat superficial de les seqüències peptídiques E2 (125-139) i E2 (120-139) en funció de la concentració de pèptid a la subfase (Tris-HCl, 10 mM, pH: 7,4). Per a totes les concentracions, els valors de pressió superficial es van mesurar als 60 minuts quan s'havia assolit l'equilibri (T: 25 °C).

Font: Alay et al. (2013)

La mesura de l'activitat superficial de la molècula és un mètode utilitzat per estimar la concentració superficial en excés (Γ_{max}) que es calcula a partir del pendent de la representació $\pi - \Delta \ln c$ que fou de $4,64 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$ per l'E2 (125-139) i $1,38 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ per l'E2 (120-139). A partir d'aquestes dades es pot determinar l'àrea molecular superficial, la qual, en molècules flexibles proporciona informació sobre el seu comportament conformacional (Cantó, et al., 1997). Les àrees moleculars que s'han obtingut amb l'E2 (120-139) i l'E2 (125-139) de $3,58 \times 10^{-18}$ i $1,20 \times 10^{-18} \text{ m}^2 \text{ molec}^{-1}$, respectivament, suggereixen una conformació α -helicoidal dels pèptids i una orientació vertical a la interfase aire-aigua (Sánchez-Martín, et al., 2010; Maget-Dana, 1999) en concordància amb els estudis de dicroisme circular en presència de bicapes.

Confirmada l'activitat superficial dels pèptids i donat que l'objectiu principal de l'estudi era descriure les possibles interaccions d'aquests amb les membranes biològiques, es van caracteritzar aquestes interaccions amb un model de membrana simple com són les monocapes lipídiques mitjançant cinètiques de penetració, isoterms de compressió i monocapes mixtes.

4. Efecte dels pèptids en monocapes

4.1. Cinètiques de penetració

La magnitud de la interacció dels pèptids E2, expressada com a $\Delta\pi$, de monocapes de diferents composicions lipídiques s'ha estudiat mitjançant cinètiques de penetració a àrea constant (Sanchez-Martin, et al., 2011). En aquest cas, les monocapes lipídiques formades per extensió de lípid des d'una solució de cloroform/metanol (2:1, v/v) sobre una subfase de TRIS 10 mM , pH: 7,4 van ser monitoritzades a distintes pressions superficials inicials (π_i) (5, 10, 20, o 32 mN/m). Després de 20 minuts de l'evaporació del solvent, per tal d'assegurar l'estabilitat de la monocapa, es va injectar la solució de pèptid a la subfase. La concentració de pèptid a la subfase va ser en tots els casos de 0,7 μm . Per a formar les monocapes es van triar el lípids DPPC (zwitteriònic), DPPG (aniònic) i DPTAP (catiònic) amb la finalitat d'analitzar la influència de la càrrega en la unió del pèptid a la monocapa.

A partir de les dades obtingudes de $\Delta\pi$ en funció de π_i s'aprecia que $\Delta\pi$ és inversament proporcional a pressió superficial inicial. Com més alta és aquesta, més gran és l'empaquetament lipídic de la monocapa el que dificulta més la penetració del pèptid. A partir de la representació de $\Delta\pi$ respecte π_i es pot determinar la pressió d'exclusió o pressió màxima d'inserció (Figura IV.2 i Taula IV.2).

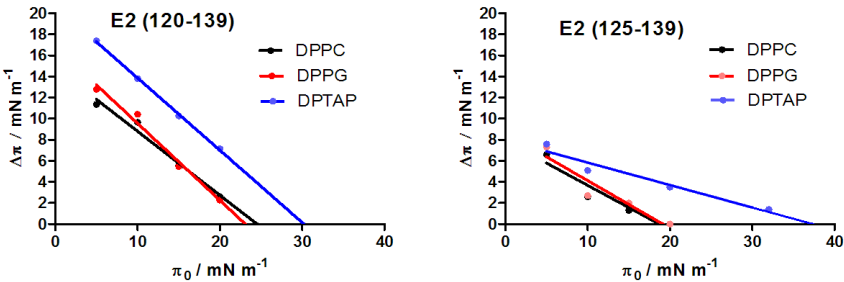


Figura IV.2.: Variació de la pressió superficial dels pèptids E2 (120-139) i E2 (125-139) en funció de la pressió inicial de lípid en la interfície aire/Tris-HCl 10 mM (pH: 7,4)

Font: Alay et al. (2013)

Taula IV.2.: Pressió màxima d'inserció dels lípids en monocapes de DPPC, DPPG i DPTAP.

Pèptid	Pressió màxima d'inserció/mN m-1		
	DPPC	DPPG	DPTAP
E2 (99-118)	$24,8 \pm 1,6$	$22,3 \pm 1,5$	$33,8 \pm 2,2$
E2 (125-139)	$18,7 \pm 2,3$	$19,1 \pm 1,8$	$37,8 \pm 2,6$
E2 (120-139)	$25,5 \pm 1,5$	$23,1 \pm 2,2$	$30,2 \pm 1,2$

De forma general s'observa que la interacció de cada un dels pèptids amb les diferents monocapes lipídiques segueix l'ordre següent:

$$\text{DPTAP} > \text{DPPG} \approx \text{DPPC}.$$

Per als lípids zwitteriònic i aniònic, la pressió més alta depèn de la llargada de la cadena del pèptid; com més llarg és el pèptid més alta és la pressió màxima d'inserció. Mentre que per a la DPTAP, la pressió màxima d'inserció és més alta per al lípid més curt. Això indica que la interacció és predominantment de natura electrostàtica tot i que la hidrofòbica també hi intervé.

4.2. Isotermes de compressió

Els tres pèptids formen isotermes característiques dels pèptids de baix pes molecular (Nieto Suarez, et al., 2008; Matar, et al., 2010). A partir elles s'obtenen paràmetres que permeten avaluar les seves propietats superficials. Així, l'àrea lift off o àrea a la que la pressió comença a augmentar al comprimir la monocapa del pèptid, va ser $0,55 \text{ nm}^2/\text{mol}$, $2,6 \text{ nm}^2/\text{mol}$ i $0,19 \text{ nm}^2/\text{mol}$ per als pèptids E2 (125-139), E2 (120-139) i E2 (99-118), respectivament. Aquests valors indiquen que els pèptids adopten una configuració horitzontal expandida a la monocapa (Steinkopf, et al., 2008).

D'altra banda a l'anar comprimint la monocapa, l'efecte de la compressió provoca un increment de la pressió superficial fins arribar a pressions de 10 mN/m , 23 mN/m i 25 mN/m per a E2 (125-139), E2 (120-139) i E2 (99-118), respectivament i no s'assoleix el col·lapse. La transició de fases de la monocapa es pot determinar de forma més precisa mitjançant el mòdul de compressibilitat. Aquest augmenta en créixer la pressió fins a 5 mN/m

per a E2 (125-139) i fins a $7,5 \text{ mN/m}$ per E2 (120-139), indicant que els pèptids estan en fase de líquid expandit (Figura IV.3).

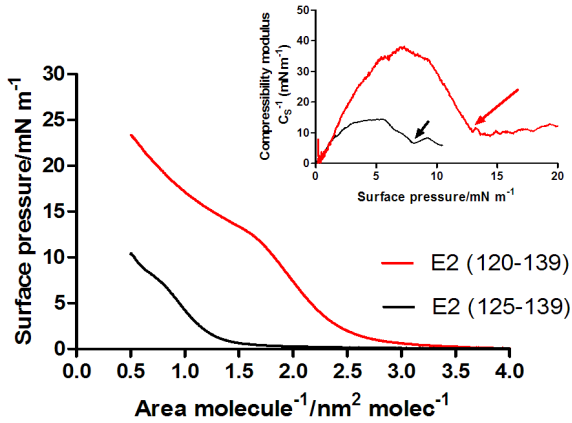


Figura IV.3.: Isotermes de compressió dels pèptids. Inset: mòdul de compressibilitat.

Font: pròpia

4.3. Isotermes mixtes: Estudis de miscibilitat

Els estudis d'isotermes de compressió s'han realitzat amb diferents relacions molars de DPPC, DPPG i pèptid. Com a tret general es pot afirmar que la presència de pèptid en la barreja suposa un desplaçament de la isoterma del lípid pur cap a àrees més petites, sempre compreses entre les isotermes dels components purs (Figura IV.4). Les formes de les isotermes són força diferents en funció de la càrrega del fosfolípid. Així, en el cas de DPPG totes les isotermes mixtes presenten col·lapse i segueixen el mateix patró però augmentant el desplaçament cap a àrees menors com major és la proporció de pèptid en la barreja. Ben diferent és la sèrie d'isotermes mixtes amb DPPC.

Per a totes les barreges el comportament és semblant a àrees grans, fins a $0,8 \text{ nm}^2 \text{ molec}^{-1}$.

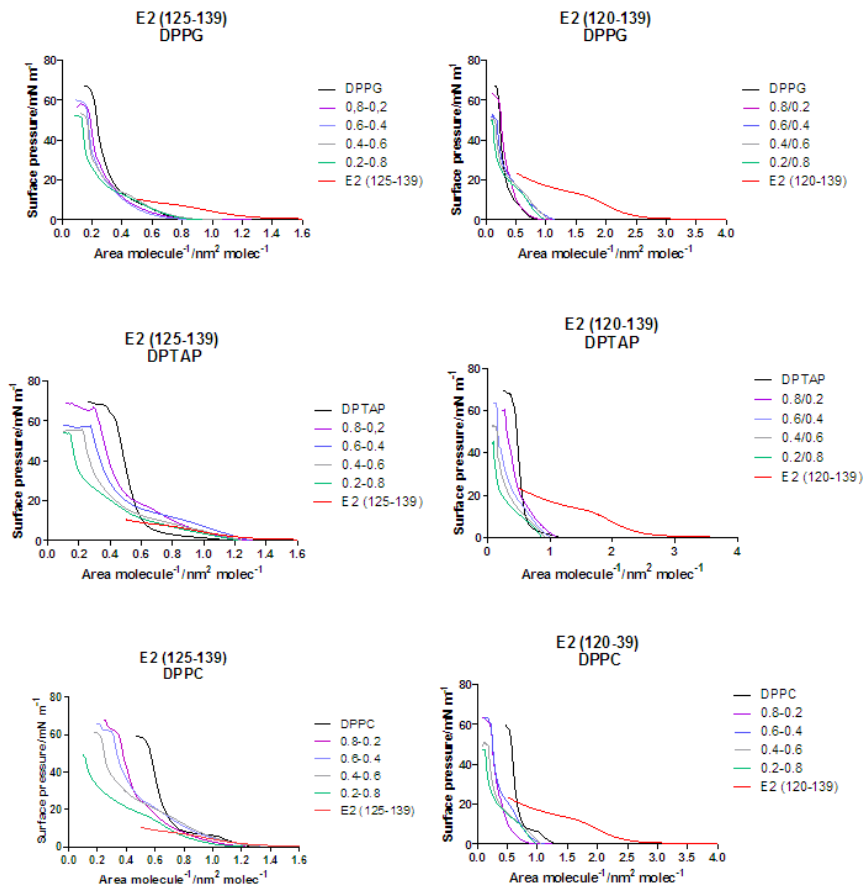


Figura IV.4.: Isotermes mixtes per a E2 (125-139) i E2 (120-139)/fosfolípid a diferents relacions molars exteses a la subfase de Tris-HCL 10mM pH: 7,4

Font: Alay et al. (2013)

Quan es continua amb la compressió, la diferència entre isotermes és significativa. Fins a la relació molar de 0,4 : 0,6 (DPPC/pèptid) totes les isotermes presenten col·lapse a una pressió molt semblant a de la isoterma de la DPPC pura. Aquesta coincidència indica una immiscibilitat dels components de la monocapa. Respecte le isotermes amb DPTAP, el comportament segueix la tendència observada amb DPPC però amb la particu-

laritat de que totes les barreges presenten col·lapse. Aquest és pràcticament idèntic per a la DPTAP pura i la barreja DPTAP/pèptid 0,8 : 0,2 disminuint per a les altres barreges. Si bé la condensació podria ser indicativa d'una major compactació de les molècules en la monocapa, i per tant d'una interacció lípid-pèptid, també podria ser conseqüència d'una expulsió del pèptid de la monocapa. Per aclarir-ho es van fer els càlculs termodinàmics d'àrea molecular mitjana (A) i variació de l'energia de Gibbs de barreja (Δ_M^{Gex}) en funció de la fracció molar del pèptid a la barreja. En quant a les A (Figura IV.5) obtingudes de les barreges cal distingir entre les dues seqüències. S'observen desviacions positives a l'augmentar la concentració de E2 (125-139) a la barreja. Per a DPPC a $X_{pèptid}$ entre 0,4 i 0,8; per a a DPPG entre 0,6 i 0,8 i per a DPPC entre 0,2 i 0,8. En canvi per a la seqüència més llarga, les desviacions són negatives, destacant per a totes les barreges, la $X_{pèptid} = 0,8$.

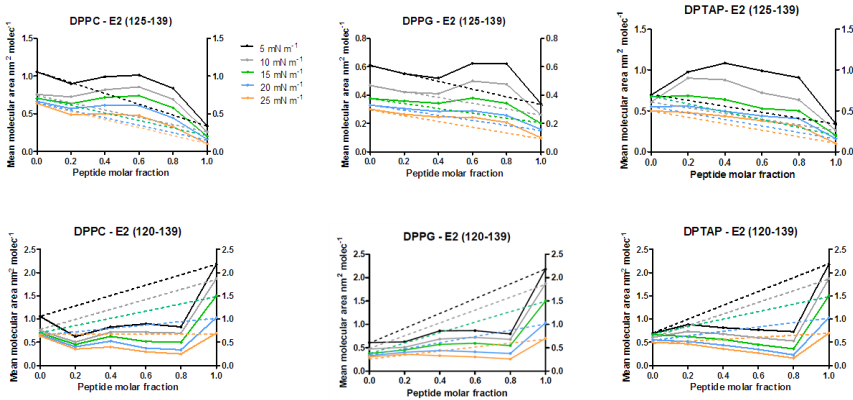


Figura IV.5.: Valors d'àrea molecular en funció de la fracció molar de pèptid.

Font: Alay et al. (2013)

Els valors de Δ_M^{Gex} per a l'E2 (125-139) presenten desviacions negatives per a $X_{pèptid}$ de 0,8 però no eren significativament diferents del producte de RT el que indica que el comportament de les barreges es desvia poc respecte el comportament ideal i per tant, és probable que les interaccions siguin febles. No obstant, per a la seqüència més llarga, les desviacions a aquesta barreja sí que són significatives a pressions properes a la pressió de col·lapse (Figura IV.6).

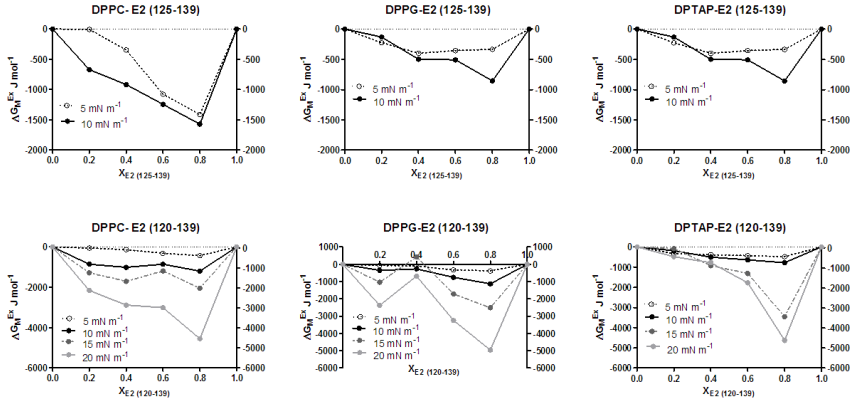


Figura IV.6.: Valors de la variació de l'Energia de Gibbs de barreja en funció de la fracció molar de pèptid.

Font: Alay et al. (2013)

5. Efecte del pèptids en bicapes

Per a estudiar l'efecte dels diferents fragments peptídics sintètics del virus del GBV-C en bicapes com models de membrana, s'han emprat liposomes multilamelars (MLVs), liposomes unilamelars grans (LUVs) i petits (SUVs) en funció de l'assaig amb els quals s'han aplicat una sèrie de tècniques biofísiques fonamentalment espectroscòpiques (UV-visible, espectroscòpia de fluorescència) i calorimètriques (DSC).

5.1. Espectroscòpia UV-Visible

En aquesta tesi, s'han realitzat estudis d'absorbància amb la sonda Merocianina 540 (MC_{540}). Es tracta d'una sonda lipofílica que s'ha utilitzat àmpliament per a investigar les propietats de les membranes, l'empaquetament dels fosfolípids i la transició de fases. La sonda pot incorporar-se directament a les bicapes de fosfolípids durant el procés de preparació dels liposomes o particionar-se entre la fase lipídica i el medi extern aquós quan s'agrega a una suspensió aquosa de liposomes (Kaschny et al., 1992). Quan aquesta sonda està en un medi aquós, presenta dos pics d'absorbància, un a 500 nm (corresponent al dímer) i un altre a 530 nm (corresponent al

monòmer). Mentre que quan es troba en un medi no polar, presenta un únic pic a 570 nm (corresponent a la forma monòmera). En presència de liposomes en estat gel, on les cadenes acil·liques dels fosfolípids es troben ordenades i ben empaquetades, l'espectre de la MC₅₄₀ és comparable al seu espectre quan es troba dissolta en aigua, donat que la sonda no pot penetrar dins la membrana; mentre que si els liposomes es troben en estat fluid o de cristall líquid, l'espectre presenta un pic petit a 530 nm i un pic ben definit a 570 nm (Lelkes et al., 1980). Aquest espectre és degut a que els liposomes en estat de cristall líquid presenten un menor empaquetament dels fosfolípid que permet que la sonda penetri a la bicapa. Per aquest motiu, tant la intensitat d'absorció com la posició d'aquests 2 màxims depenen fortament la densitat d'empaquetament de la mono o bicapa.

Quan la MC₅₄₀ es localitza en entorn més hidròfob, el pic de A₅₇₀ augmenta mentre que el de A₅₃₀ es redueix lleugerament. Per aquesta raó, la relació A₅₇₀/A₅₃₀ indica la partició de la MC₅₄₀ en els dos medis. Conseqüentment l'equilibri dímer-monòmer de MC₅₄₀ pot ser utilitzat com un indicador de l'espai entre els caps dels lípids i de les propietats de la superfície de les membranes (Vereyken et al., 2001).

Per a determinar si la presència de pèptid modifica les propietats d'empaquetament d'aquestes membranes de fosfolípids, s'ha mesurat l'espectre d'absorció de liposomes en els que s'ha incorporat MC₅₄₀ i s'ha addicionat a aquesta solució una concentració de pèptid, a temperatura ambient i posteriorment s'ha escalfat en l'interval de temperatures de 25 °C a 50 °C.

Com que els resultats previs van ser molts semblants per a tots els pèptids, només s'han realitzat aquests estudis per a la seqüència E2 (125-139).

Es va enregistrar l'espectre de liposomes de DPPC que incorporaven aquesta sonda, i es va veure que la millor relació MC₅₄₀/DPPC per a treballar era 1:300. En aquest cas l'espectre mostra un pic predominant a 570 nm, pic característic de la forma monomera de la sonda.

El mateix experiment realitzat en presència de pèptid a una concentració de 30 μM d'E2 (125-139) no va mostrar cap canvi en la forma de l'espectre, però sí l'aparició d'un efecte hipocròmic (Figura IV.7).

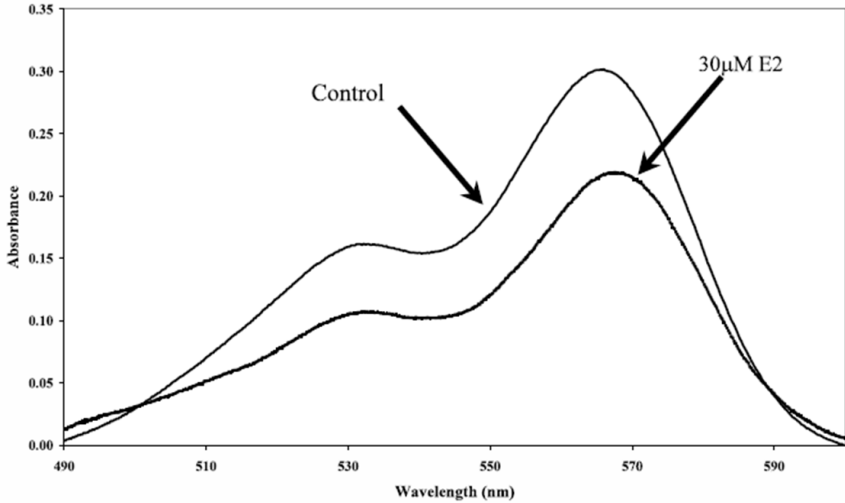


Figura IV.7.: Espectre d'absorció de SUVs de MC₅₄₀-DPPC abans (control) i després d'afegir E2 (125-139). Concentració final de pèptid 30 μm. MC₅₄₀/DPPC relació molar 1:300.

Font: Alay et al. (2013)

El càlcul de la relació A_{570}/A_{530} en absència i presència de pèptid és de 1,9 i 2,1 respectivament, el que indica que no es produeixen canvis significatius deguts a l'addició de pèptid. Aquests valors discrepen dels obtinguts en monocapes de la mateixa composició lipídica. No obstant, s'ha de considerar la diferència de curvatura entre les monocapes i els liposomes. A més, en aquest cas, la DPPC presenta una estructura rígida a T ambient. Així, per tal de determinar la ubicació de la sonda en funció de la fluïdesa de membrana de DPPC i com es veia afectada per l'addició de 12 μM E2 (125-139), es va analitzar l'efecte de la temperatura en l'espectre de MC₅₄₀ (Figura IV.8).

En relació a això, es va veure que en estat gel la mobilitat de la sonda està molt restringida, i que la MC₅₄₀ es distribueix entre l'esquelet de la bicapa i la seva superfície. A l'augmentar la temperatura per sobre de la temperatura de transició del lípid (> 41 °C) la MC₅₄₀ penetra més en l'esquelet de la bicapa fent que canviï la partició entre la zona polar i apolar de la membrana.

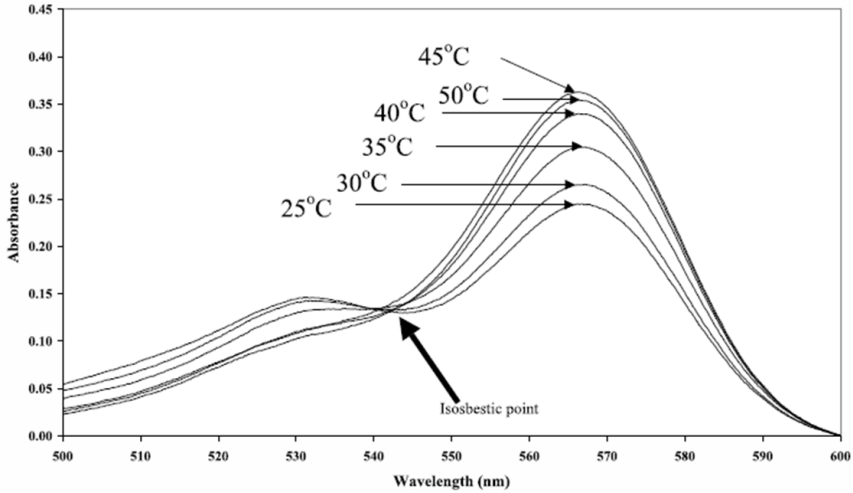


Figura IV.8.: Espectre d'absorbància de $MC_{540}/DPPC$ (1:300) en presència de $12\mu m$ E2 (125-139) en funció de la temperatura. A temperatures per sota de $41^\circ C$ la bicapa es troba en estat rígid (gel) mentre que per sobre d'aquesta està en estat fluid (cristall líquid) Concentració MC_{540} a la cubeta $5 \times 10^{-6} M$.

Font: Alay et al. (2013)

El grau de partició de la sonda en la membrana lipídica mesurat a partir de la relació A_{570}/A_{530} en funció de la temperatura i de la concentració de pèptid va indicar que per a temperatures inferiors a la temperatura de transició del fosfolípid (T_m), no hi havia una tendència clara en la recol·locació de la sonda, així mateix l'addició de pèptid tampoc no generava cap efecte sobre el sistema. Ara bé, per temperatures per sobre de la T_m aquesta relació d'absorbàncies augmentava a l'incrementar la concentració de pèptid que es va afegir a la mostra.

Al calcular la constant de dimerització de la MC_{540} ($K_d(app)$) a les diferents temperatures es va veure que els valors que prenien aquesta variable eren més elevats a temperatures més baixes, és a dir, que a temperatures baixes la sonda es trobava en major proporció en forma dimèrica, mentre que al superar la temperatura de transició la sonda estava en forma monomèrica i per tant una major proporció de la sonda es trobava en un

entorn més lipòfil.

L'addició de diferents concentracions de pèptid, es va traduir en un augment dels valors de la $K_d(app)$, confirmant d'aquesta manera que amb la fluidificació de la membrana i l'addició del pèptid afavoreixen la recol·locació de la sonda en zones més profundes de la bicapa. Així mateix, la concentració de pèptid més favorable per a que es produís aquesta situació és la de $30\mu m$ en la que es produeix la saturació de la bicapa.

5.2. Espectroscòpia de fluorescència

5.2.1. Fluorescència intrínseca

Continuant amb l'estudi de la interacció lípid-pèptid es va aprofitar la fluorescència intrínseca per presència d'un residu de *Trp* d'una de les tres seqüències, l' E2 (99-118).

Es va enregistrar l'espectre d'aquest pèptid a la concentració de $5\mu M$ i successivament es van anar addicionant diferents alíquotes d'una preparació de SUVs $10mM$ de DMPC:DPPC (1:1) o de DMPG:DPPC (1:1).

Per tal d'estudiar l'efecte del pèptid en funció de la fluïdesa de la membrana es van fer els assaigs a $25^\circ C$ i $55^\circ C$, que corresponen a valors inferior i superior respectivament, de la T_m de la DPPC, que, dels fosfolípids amb que es va treballar, és el que la té més alta.

Per a l'espectre del pèptid en dissolució aquosa es va trobar que les longituds d'ona dels màxims a $25^\circ C$ i $55^\circ C$ van ser de $352 nm$ i $355 nm$ successivament, el que indica que el *Trp* es troba exposat a un entorn hidrofílic (Lakowicz, 1999). Mentre que a l'anar addicionant la barreja amb DPPC la longitud d'ona del màxim es desplaça ràpidament a longituds d'ona més baixes tant per a $25^\circ C$ com per a $55^\circ C$ ($345 nm$ i $342 nm$, respectivament). Aquest desplaçament de la longitud d'ona del màxim es manté invariable per addicions creixents de SUVs. Pel que fa als SUVs de fosfolípids zwitterionics, l'efecte que es produeix és el mateix, però s'assoleix l'equilibri d'aquesta longitud d'ona màxima a concentracions de fosfolípid inferiors que amb els SUVs aniònics.

El desplaçament del màxim, cap a la longituds d'ona més baixes a l'augmentar l'entorn hidrofòbic indica que el *Trp* es troba més profundament i incorporat a les membranes de fosfolípid, independentment de la càrrega dels liposomes.

Les isoterms de repartiment a temperatures per sobre i per sota de la temperatura de transició, mostren clarament l'afinitat del pèptid per monocapes anióniques en comparació amb les zwitterioniques tant en l'estat de gel com en el de cristall líquid tal i com es pot comprovar en les dades de coeficient de partició (Taula IV.3).

Taula IV.3.: Coeficient de partició i relació entre intensitats a diferents temperatures i per liposomes de diferents composicions.

	T/°C	DMPC/DPPC	DMPG/DPPC
K	25 °C	$3,2 \pm 0,05 \times 10^5$	$2,4 \pm 0,08 \times 10^5$
	55 °C	$1,4 \pm 0,01 \times 10^5$	$9,2 \pm 0,08 \times 10^5$
I _{max} /I _o	25 °C	$2,0 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,10$
	55 °C	$1,5 \pm 0,12$	$2,5 \pm 0,09$

5.2.2. Fluorescència amb MC₅₄₀

En la present tesi doctoral, es va optimitzar una tècnica de fluorescència utilitzant com a fluoròfor extrínsec la MC₅₄₀ esmentada anteriorment per a altres estudis espectroscòpics. Els experiments de fluorescència amb MC₅₄₀ es van dur a terme amb LUVs de DPPC a diferents temperatures en presència i absència de E2 (125-139). Com a resultat d'addicionar el pèptid al sistema, el màxim d'emissió de la sonda no es va veure afectat ni la per la temperatura ni per la presència de pèptid. No obstant, per a temperatures per sota de 30 °C, l'addició de pèptid origina una disminució en la intensitat de fluorescència, el que indica, en concordància amb altres resultats obtinguts, que la sonda, en presència de pèptid, penetra més en la bicapa a temperatures per sota la T_m . La seva posició en la bicapa es veu afectada pel pèptid només quan la bicapa està fluida, condició que facilita la penetració del pèptid i un desplaçament de la sonda cap a un medi més hidrofílic.

5.2.3. Anisotropia amb MC₅₄₀, DPH i TMA-DPH

Per a veure els canvis en la mobilitat del monòmer de MC₅₄₀ inserit a la bicapa que es produeixen per efecte de la temperatura i de l'addició de E2 (125-139) es va utilitzar la tècnica d'anisotropia de fluorescència.

Dels valors d'anisotropia que es van obtenir, es va veure que aquest paràmetre era més alt per sobre de la T_m que per sota d'aquesta. Això significa que a temperatures per sota de la T_m la sonda es troba inserida a la bicapa i per aquest motiu té la mobilitat reduïda; a mida que el sistema s'apropa a aquesta temperatura, l'anisotropia va baixant indicant una mobilitat més gran de la sonda.

A l'afegir el pèptid es van observar valors més elevats d'anisotropia per a totes les temperatures en comparació amb els liposomes sols. Això indica que en presència de pèptid, la sonda té menys mobilitat en la membrana lipídica, pel que es pot considerar que el pèptid exerceix un efecte rigidificant.

Per a confirmar aquests resultats es van realitzar nous experiments d'anisotropia amb unes sondes més adients pels resultats descrits a la bibliografia com són DPH i TMA-DPH. Aquestes sondes són molt sensibles a la mobilitat lateral dels components de la membrana en la que es troben, són pràcticament no fluorescents en medi aquós i presenten una elevada fluorescència quan es troben units a membranes lipídiques (Shinitzky et al., 1978; Slavik et al., 1982).

El DPH degut al seu caràcter hidrofòbic, se situa específicament en la zona apolar dels liposomes de manera majoritàriament paral·lela a les cadenes d'àcids grassos, encara que degut al seu caràcter enterament lipòfil la seva disposició en la bicapa no es troba ben definida (Schwarz et al., 1992; Stillwell et al., 1992; Kaiser i London, 1998). Els canvis en la polaritat del DPH reflecteixen canvis en la mobilitat de les cadenes hidrocarbonades dels àcids grassos (Van Ginkel et al., 1989), permetent d'aquesta manera observar el comportament del canvi de fase, de gel a cristall líquid, i per tant determinar la temperatura de transició dels fosfolípids en estudi (T_m). Quan la bicapa es troba en estat gel, la mobilitat de les molècules dels fosfolípids és menor i el DPH té menys llibertat de moviment en l'estat excitat, per tant, l'emissió de fluorescència està molt polaritzada. A mesura que la temperatura augmenta i es passa a l'estat cristall líquid, la mobilitat lateral dels fosfolípids en la membrana així com l'oscil·lació del DPH també s'incrementa, en conseqüència la polarització disminueix. Aquesta disminució és brusca al voltant de la T_m (Williams et al., 1990). Per una altra part, el TMA-DPH és un derivat del DPH que es troba ancorat en la interfície aigua/lípid, gràcies a un grup carregat trimetilamoní que li dona un caràcter més polar (Engel i Prendergast, 1981; Kaiser i London, 1998)

(veure Figura I.12).

Per als pèptids E2 (120-139) i E2 (125-139) es va determinar el grau de despolarització de la fluorescència amb les sondes TMA-DPH i DPH incubades en LUVs de DMPC, DMPC/DMPG (95:5), DPPC, DPPC/DPPG (95:5) i DPPC/DPTAP (95:5), però només es van observar canvis importants amb els LUVs zwitterionics de DMPC.

Pel cas de LUVs marcats amb DPH, l'addició de E2 (125-139) o de E2 (120-139) va produir un augment de l'anisotropia al voltant de la T_m de la DMPC, el que indica que la sonda es troba en un entorn més rígid (Lentz et al., 1993 i Lakowicz et al., 2006). La mateixa prova realitzada amb la sonda TMA-DPH mostra valors d'anisotropia molt dispersos pel pèptid E2 (125-139), fàcilment com a conseqüència de l'agregació dels liposomes; mentre que no es va evidenciar cap tipus de canvi en la membrana pel que fa a E2 (120-139).

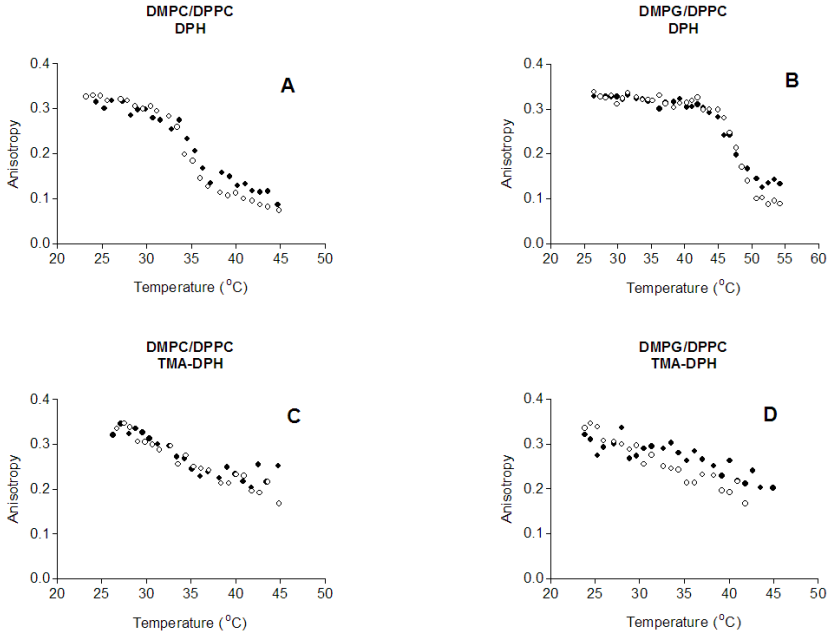


Figura IV.9.: Canvis en l'anisotropia de DPH (A, B) i TMA-DPH (C, D) en front a la temperatura en SUVs de DMPC/DPPC (1:1) i DMPG/DPPC (1:1) en presència (●) o absència (○) de E2(99-118).

Font: Pròpia

Per al pèptid E2 (99-118) la fluorescència de polarització es va mesurar incubant SUVs de DMPC/DPPC (1:1) i DMPG/DPPC (1:1) amb les mateixes sondes. La presència d'aquest pèptid, a temperatures superiors a la T_m ($T > 42^\circ\text{C}$) van provocar un lleuger augment de l'anisotropia de la DPH incorporada als SUVs de DMPC/DPPC, mentre que pels liposomes aniónics l'augment de rigidesa de la membrana només s'observa en estat fluid ($T > 50^\circ\text{C}$). A la Taula IV.4 es mostra un resum dels resultats obtinguts.

Taula IV.4.: Resum dels resultats d'anisotropia de fluorescència per a les distintes sondes i seqüències peptídiques.

Pèptid	DPH		TMA-DPH	
	Zwitteriònic	Aniònic	Zwitteriònic	Aniònic
E2 (99-118)	Augmenta lleugerament l'anisotropia per $T > 42^\circ\text{C}$	Augmenta l'anisotropia només a $T > 50^\circ\text{C}$	No hi ha cap efecte	Augmenta l'anisotropia
E2 (120-139)	Augmenta l'anisotropia	No hi ha cap efecte (les gràfiques es solapen)	No hi ha cap efecte	No hi ha cap efecte (les gràfiques es solapen)
E2 (125-139)	Augmenta l'anisotropia	No hi ha cap efecte (les gràfiques es solapen)	Sembla que els liposomes formen agregats	No hi ha cap efecte (les gràfiques es solapen)

Paral·lelament es van realitzar assaigs de DSC amb LUVs de les mateixes composicions lipídiques descrites per a les proves d'anisotropia però els resultats no van ser concloents. No es van observar canvis significatius en les propietats termotròpiques dels fosfolípids per la presència dels pèptids.

5.2.4. Transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET)

Pel que fa a la capacitat dels pèptids per a fusionar liposomes neutres o aniònics, la tècnica que s'ha utilitzat a la present tesi és la de transferència d'energia de fluorescència. S'han emprat liposomes zwitterionics (DMPC/DPPC: 1:1) i aniònics (DMPG/DPPC: 1:1) no marcats i marcats amb les sondes NBD-PE, que actua com a donador, i Rho-PE que ho fa com a acceptor (0.6%*mol*, cada una). Els resultats obtinguts d'aquesta prova a l'addicionar concentracions creixents de pèptid E2 (99-118) als liposomes descrits anteriorment, mostren que, per als dos tipus de liposomes, es produeix una disminució del màxim de fluorescència a 580 *nm* (λ_{em} Rho-PE) combinats amb un augment del màxim de fluorescència a 540 *nm* corresponent a la λ_{em} de NBD-PE. Això indica que s'està produint una separació entre el donador d'energia (NBD-PE) i l'acceptor d'aquesta

(Rho-PE). Com a conseqüència de la capacitat d'aquest pèptid de produir la unió de membranes.

D'altra banda, el % de barreja de lípids (lipid mixing) en funció de la relació molar pèptid:lípid indica que E2 (99-118) és capaç de fusionar tant liposomes zwitterionics com anionics, però en aquests últims això es produeix a relacions molt altes.

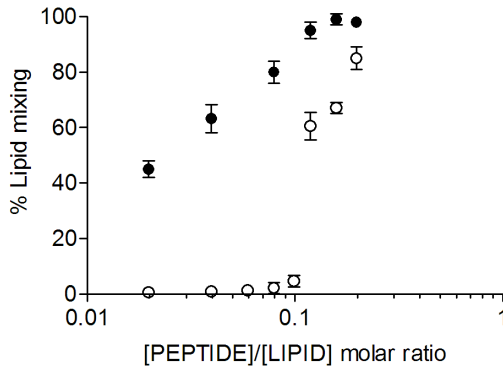


Figura IV.10.: Percentatge de barreja de lípids respecte la relació molar de pèptid E (99-118)/ lípid. Lípid: SUVs de DMPG/DPPC (1:1) (●) o DMPC/DPPC (1:1) (○).

Font: Alay et al., 2005

Pel que fa a aquest assaig per als pèptids E2 (120-139) i E2 (125-139) no es van observar canvis en els liposomes formats per lípids de cadena de 16 carbonis, i per això es va repetir l'assaig amb liposomes formats per barreges fosfolípids de 14 carbonis (DMPC i, DMPC/DMPG: 1:1) que són més fluids, el resultat d'això és un augment del valor de barreja de lípids d'aproximadament el 13% per a E2 (125-139) i del 28% per E2 (120-139) amb una relació molar de pèptid:lípid del 0.2. No es van poder fer determinacions a relacions pèptid:lípid més elevades ja que es va observar terbolesa en les cubetes, senyal d'agregació liposomal per a les dues composicions lipídiques.

6. Estudis conformacionals: Dicroisme Circular

Com a conseqüència de la similitud entre els resultats obtinguts per a els tres seqüències peptídiques, només s'han realitzat les proves de CD amb el pèptid E2 (125-139).

L'estructura conformacional d'aquest pèptid s'ha analitzat experimentalment per CD a la regió del UV. No s'han observat canvis en l'espectre per concentracions de pèptid per sobre de $100\mu\text{m}$. Per tal de mimetitzar la conformació del peptid en les membranes biològiques, s'ha investigat l'estructura del peptid en medis de polaritat diferent: en solució amortidora d'Hepes 5 mM pH: 7,4; TFE; HFIP; SDS i liposomes (LUVs) de diferent composició lipídica.

En dissolució amortidora, l'espectre de DC del pèptid a $15\mu\text{m}$, $30\mu\text{m}$, $60\mu\text{m}$, $100\mu\text{m}$ és característic d'una estructura de *random coil*. La manca de banda negativa a $n-\pi^*$ i la localització de la banda $\pi-\pi^*$ a $\lambda=198$ indica que l'E2 (125-139) està essencialment desordenat. D'acord amb aquest fet, la deconvolució numèrica realitzada amb el programa Lincomb-Brahms and Contin, confirma que l'estructura del pèptid és majoritàriament de *random coil* i estructura β .

Per investigar la conformació del pèptid en un entorn de quasimembrana, però en un ambient homogeni, s'han utilitzat diversos disolvents orgànics (TFE i HFIP). En aquests medis els resultats mostren una estructura secundària propera a la α -hèlix. Quan l'espectre en aquest medis es deconvulva s'obtenen resultats molt similars als obtinguts en l'espectre.

La interacció entre els pèptids i les bicapes juga un paper molt important en la disrupció de la funció cel·lular. Durant aquesta interacció, els pèptids generalment presenten una transició en la conformació des del *random coil* estés en la solució aquosa, fins a assolir una configuració secundària estable a l'interaccionar amb la membrana (Tanford et al., 1980). La interacció entre el pèptid i les membranes pot estar afectada per la composició dels fosfolípids. El canvi de conformació del pèptid al posar-se en contacte amb liposomes de DPPC, DPPG, DPTAP, s'ha avaluat amb aquesta tècnica i s'ha vist una clara influència de la càrrega positiva en la inducció de conformacions més ordenades del pèptid al interactuar amb aquestes estructures. Així mateix, la composició lipídica zwitteriònica també induïx més la formació d'hèlix que en el cas de les vesícules carregades negativament.

Els resultats presentats són d'utilitat per al disseny de noves seqüències

peptídiques encaminades a incrementar la interacció amb models de membrana per exemple allargant la cadena peptídica, afegint una segona cadena a la seqüència original o un residuo lipòfil. A més a més, suposen un primer pas per a la seva utilització en presència del pèptid de fusió del HIV.

V. CONCLUSIONS

1. La selecció dels tres pèptids E2 (125-139), E2 (120-139) i E2 (99-118) s'ha realitzat en base a l'alt percentatge d'homologia amb la seqüència E2 descrites i al bon perfil d'hidrofobicitat i accessibilitat de Hoops and Woods. E2 (120-139) s'ha triat per observar l'efecte de la longitud de la cadena en el comportament fisicoquímic, i E2(99-118) per poder realitzar estudis de fluorescència intrínseca. La síntesi en fase sòlida i posterior purificació ha proporcionat un rendiment superior al 80% en tots els casos.

2. Les tres seqüències peptídiques presenten activitat superficial. Per a l'E2 (125-139) i l'E2 (120-139) aquesta augmenta amb la longitud de la cadena peptídica. L'increment en 5 aminoàcids de la cadena suposa doblar amb escreix la pressió màxima assolida a la interfície aire-aigua.

3. Les cinètiques de penetració indiquen la incorporació dels pèptids en monocapes. Per als lípids anònics i zwitteriònics, i empaquetaments lipídics elevats, és a dir pressió superficial inicial alta; els pèptids de cadena llarga, E2 (120-139) i E2 (99-118), assoleixen pressions màximes d'inserció més elevades. Mentre que per a DPTAP, la pressió màxima d'inserció és més alta per al pèptid més curt E2 (125-139). Això indica que la interacció és predominantment de natura electrostàtica tot i que la hidrofòbica també hi intervé.

4. Els tres pèptids formen isoterms característiques de pèptids de baix pes molecular. Per al pèptid curt E2 (125-139), els isocicles demostren una elevada estabilitat de la monocapa, ja que no s'observa histèresi en els cicles de compressió-descompressió. En el cas de l'E2 (120-139) s'observa histèresi en el primer cicle, indicant la seva dissolució parcial en la subfase.

5. El tres pèptids modifiquen la forma de les isoterms de compressió dels lípids purs DPPC, DPPG i DPTAP, desplaçant-les cap a àrees menors. Aquest desplaçament és més significatiu per a les isoterms mixtes de DPPC o DPTAP/pèptid que per a les de DPPG/pèptid.

-
6. Totes les isoterms mixtes presenten pressió de col·lapse que en general disminueix a relacions molars elevades de pèptid (PL/Pèptid: 0,4/0,6 i 0,2/0,8) però no de forma gradual, fet indicatiu d'una immiscibilitat dels components de la monocapa.
 7. Les dades obtingudes a partir de les isoterms mixtes indiquen que no hi ha miscibilitat entre els lípids estudiats i els pèptids excepte per a la seqüència E2 (120-139) a pressions superiors a 20 mN/m , properes a la pressió de col·lapse.
 8. Els estudis de fluorescència pel pèptid E2 (125-139) realitzats amb MC₅₄₀, mostren, en concordança amb els altres estudis realitzats, que per a temperatures per sobre de la T_m , quan la bicapa està fluida, el pèptid penetra més en la bicapa i desplaça a la sonda cap entorns més hidròfils.
 9. Els estudis d'absorbància amb temperatura, amb la sonda MC₅₄₀, mostren que per a temperatures per sobre de la T_m la relació A_{570}/A_{530} augmenta a l'incrementar la concentració de pèptid a la mostra. La $K_d(\text{app})$ incrementa amb l'addició de pèptid, confirmant-se d'aquesta manera que, un canvi en la fluïdesa de la membrana per efecte de la temperatura, afavoreix la recol·locació de la sonda en zones més profundes de la bicapa.
 10. Els estudis de fluorescència realitzats amb E2 (99-118) mostren un desplaçament del màxim cap a λ més baixes, independentment de la temperatura, el que indica que el triptòfan es troba en un entorn més hidròfob i per tant, s'ha incorporat a zones més profundes de la bicapa. Les isoterms de repartiment a temperatures per sobre i per sota de la temperatura de transició, mostren clarament l'afinitat del pèptid per monocapes aniòniques en comparació a les zwitteriòniques.
 11. Les dades d'anisotropia amb la sonda interna DPH indiquen que els tres pèptids s'internalitzen en bicapes de DPPC mentre que no s'observa cap penetració en presència de DPPG, factor indicatiu de la influència de les repulsions electrostàtiques entre el lípid i els pèptids

ambdós amb càrrega negativa.

12. La barreja de lípids, determinada per les dades de transferència d'energia per ressonància de fluorescència, depèn de l'estat de rigidesa de les bicapes. Per als pèptids E2 (125-139) i E2 (120-139) només es produeix en liposomes formats per DMPC i DMPC/DMPG, mentre que no s'observa cap efecte quan en la barreja hi ha un fosfolípid de cadena llarga DMPC/DPPC i DMPC/DPPG (C₁₄/C₁₆). Lleugerament diferents són els resultats obtinguts per la seqüència E2 (99-118) que també és capaç de generar barreja de lípids en liposomes formats per fosfolípids de C₁₄ i C₁₆.
13. La seqüència E2 (99-118) presenta un coeficient de repartiment més gran per a la barreja aniònica DMPG/DPPC (1:1) que per a la zwitteriònica DMPC/DPPC (1:1) tant a temperatures per sota com per sobre de la T_m de la DPPC i és superior per a la membrana en estat fluid (55 °C).
14. Els pèptids presenten una estructura desordenada de *random coil* en medi aquós però s'estructuren en α -hèlix i en menor proporció en fulla β en presència de mono i bicapes i d'agents estructurants segons els resultats de dicromisme circular.
15. La conclusió global dels assaigs realitzats amb E2 (125-139) i E2 (120-139) és que la interacció dels pèptids amb els fosfolípids depèn bàsicament de la longitud de la cadena hidrocarbonada i de la càrrega. Així, independentment del nombre d'aminoàcids de la cadena peptídica, la incorporació en monopaes lipídiques es produeix majoritàriament en presència del lípid catiònic DPTAP i en menor mesura amb el zwitteriònic DPPC. Aquests resultats són coherents amb la càrrega negativa del pèptid. No obstant, el increment de pressió en presència de monocapes aniòniques de DPPG també suggereix un efecte hidrofòbic.

VI. BIBLIOGRAFIA

Akbarzadeh, A.; Rezaei-Sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N.; Hanifehpour, Y.; Kouhi, M.; Nejati-Koshki, K. (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.*, **8**: 102-110.

Alay, M.; Prat, J.; Haro, I.; Rojo, N.; Alsina, M. A.; Busquets, M.A. (2003) Spectroscopic analysis of the interaction of a peptide sequence of Hepatitis G virus with bilayers. *Talanta*, **60**: 269-277.

Alay, M.; Haro, I.; Alsina, M. A.; Girona, V.; Prat, J.; Busquets, M.A. (2013). Interaction of two overlapped synthetic peptides from GB virus C with charged mono and bilayers. *Colloid Surface B: Biointerfaces*, **105**: 7-13.

Ambroggio, E.E.; Separovic, F.; Bowie, J.; Fidelio, G.D. (2004). Surface behaviour and peptide lipid interactions of the antibiotic peptides, maculatin and citropin. *BBA-Biomembranes*, **1664**: 31-37.

Angelova, M.I.; Dimitrov, D.S. (1986). Liposome Electroformation. *Faraday Discuss*, **81**: 303-311.

Aranda, F.J.; Villalain, J. (1997) The interaction of abietic acid with phospholipid membranes. *BBA-Biomembranes*, **1327**: 171-180.

Bhattacharai, N.; Stapleton, J. T. (2012). GB virus C: the good boy virus? *Trends microbiol.*, **20**: 124-130.

Birdi, K.S. (1989). *Lipid and Polymer Monolayers at Liquid Interface*. New York, Plenum Press.

Bilski, P; McDevitt, T.; Chignell, C. F. (1999). Merocyanine 540 solubilized as an ion pair with cationic surfactant in nonpolar solvents: spectral and photochemical properties. *Photochem. Photobiol.*, **9**: 671-676.

Björkman, P.; Flamholz, L.; Nauclér, A.; Molnegren, V.; Wallmark, E.; Widell, A. (2004) GB virus C during the natural course of HIV-1 infection: viremia at diagnosis does not predict mortality. *Aids*, **18**: 877-886.

Blumenthal, R.; Gallo, S.A.; Viard, M.; Raviv, Y.; Puri, A. (2002) Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids*, **116**: 39-55.

Bradley, D. W. (1993) *Introduction: The diversity of human hepatitis viruses*. In *Seminars in virology* (Vol. 4, No. 5, pp. 269-271). Academic Press.

Brockman, H. (1999) Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Structural Biol.*, **9**: 438-443.

Brown, R. S. (2005) Hepatitis C and liver transplantation. *Nature*, **436**: 973-978.

Cantó, J.; Pérez, J.A.; Centeno, N.B.; Haro, I.; Pérez, J.J. (1997) Conformational study of the preferred conformations of the peptide sequence VP3(110-121) of HAV by circular dichroism and molecular mechanics. *Lett. Peptide Sci.*, **4**: 13-19.

Chen, Y.H.; Yang, J.T.; Martinez, H.M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochem.*, **11**: 4120-4131.

Christiaens, B.; Symoens, S.; Vanderheyden, S.; Engelborghs, Y.; Joliot, A.; Prochiantz, A.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Vanloo, B. (2002). Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 2918-2926.

Christiaens, B.; Grooten, J.; Reusens, M.; Joliot, A.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J.; Prochiantz, A.; Rosseneu, M. (2004) Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur. J. Biochem.*, **271**: 1187-1197.

Collins, M. D.; Gordon, S. E. (2013) Giant liposome preparation for imaging and patch-clamp electrophysiology. *J. Vis. Exp.*, **76**: 50227-50236.

Davies, J.T.; Rideal, E.K. (1963) *Interfacial Phenomena*, 2nd Ed. New York, Academic Press.

Dawson, G. J.; Schlauder, G. G.; Pilot-Matias, T. J.; Thiele, D.; Leary, T. P.; Murphy, P.; Mushahwar, I. K. (1996) Prevalence studies of GB Virus-C infection using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **50**: 97-103.

Devaux, H. (1912) Oil films on water and Hg. *J. Phys.*, **2**: 699-734.

Edelhoch, H., Bernstein, R.S., Wilchek, M. (1968a) Fluorescence of tyrosyl and tryptophanyl ketopiperazines. *J. Biol. Chem.*, **243**: 5985-5992.

Edelhoch, H., Perlman, R.L., Wilchek, M. (1968b) Fluorescence Studies with Tyrosyl Peptides. *Biochem.*, **7**: 3893-3900.

Ellens, H., Bentz, J., Szoka, F.C. (1984) pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes. Role of bilayer contact. *Biochem.*, **23**: 1532-1538.

Engel, L.W.; Prendergast, F.G. (1981) Values for and significance of order parameters and cone angles of fluorophore rotation in lipid bilayers. *Biochem.*, **20**: 7338-7345.

Fauci, A. S.; Johnston, M. I.; Dieffenbach, C. W.; Burton, D. R.; Hammer, S. M.; Hoxie, J. A.; Greene, W. C. (2008) HIV vaccine research: the way forward. *Science*, **321**: 530-532.

Gaines, G.L. (1966) *The properties of liquid surfaces. In: Insoluble monolayers at Liquid-Gas Interfaces.* New York, Wiley Interscience Publishers, pp. 25.

Goodrich F.C. (1957) Proceedings of the 11th International Congress on Surface Activity. London, Bultorworths.

Gómara, M. J.; Fernández, L.; Pérez, T.; Tenckhoff, S.; Casanovas, A.; Tillmann, H. L.; Haro, I. (2011) Diagnostic value of anti-GBV-C antibodies in HIV-infected patients. *Chem. biol. drug design*, **78**: 277-282.

Grainger, D.W.; Alhers M.; Ringsdorf, H.; Salesse, C.; Herron, J.N.; Lim, K. (1992) Modeling membrane targeting: interaction and recognition of proteins with model biomembranes systems. *J. Control. Release*, **19**: 201-218.

Greenfield, N.J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.*, **235**: 1-10.

Gregoriadis, G. (1984) *Preparation of Liposomes.* CRC, Boca Raton, FL.

Gump, W.C.; Walsh, J.W. (2005) Intrathecal colistin for treatment of highly resistant *Pseudomonas ventriculitis*. *J. Neurosurgery*, **102**: 915-917.

Halasz, R.; Weiland, O.; Sällberg, M. (2001) GB virus C/hepatitis G virus. *Scand. J. Infect. Dis.*, **33**: 572-580.

Jung, S.; Knauer, O.; Donhauser, N.; Eichenmüller, M.; Helm, M.; Fleckenstein, B.; Reil, H. (2005) Inhibition of HIV strains by GB virus C in cell culture can be mediated by CD4 and CD8 T-lymphocyte derived soluble factors. *Aids*, **19**: 1267-1272.

Kaiser, R.D.; London, E. (1998) Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: Comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochem.*, **37**: 8180-8190.

Kanda, T.; Yokosuka, O.; Ehata, T.; Maru, Y.; Imazeki, F.; Saisho, H.; Omata, M. (1997) Detection of GBV-C RNA in patients with non-A-E fulminant hepatitis by reverse-transcription polymerase chain reaction. *Hepatology*, **25**: 1261-1265.

Kaschny P.; Goñi F.M. (1992) The components of merocyanine-540 absorption spectra in aqueous, micellar and bilayer environments. *Eur. J. Biochem.*, **207**: 1085-1091.

Koynova,R.; Caffrey,M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *BBA*, **1376**: 91-145.

Koedel, Y.; Eissmann, K.; Wend, H.; Fleckenstein, B.; Reil, H. (2011) Peptides derived from a distinct region of GB virus C glycoprotein E2 mediate strain-specific HIV-1 entry inhibition. *J. Virol.*, **85**: 7037-7047.

Kupfer, B.; Ruf, T.; Matz, B.; Nattermann, J.; Spengler, U.; Rockstroh, J. K.; Kaiser, R. (2005). Comparison of GB virus C, HIV, and HCV infection markers in hemophiliacs exposed to non-inactivated or inactivated factor concentrates. *J. Clin. Virol.*, **34**: 42-47.

Lakowicz JR. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd edn. Kluwer Academic/Plenum: New York,.

Lasic, D.D.; Martin, F.J. (1991) Preparation and the mechanism of liposome formation. *J. Surface Sci. Technol.*, **7**: 291-305.

Lee, S.; Aoki,R.; Oishi,O.; Aoyagi,H.; Yamasaki, N. (1992) Effect of amphipathic peptides with different alpha-helical contents on liposome-fusion. *BBA-Biomembranes*, **1103**: 157-162.

Lefrère, J. J.; Ferec, C.; Roudot-Thoraval, F.; Loiseau, P.; Cantaloube, J. F.; Biagini, P.; Mercier, B. (1999). GBV-C/hepatitis G virus (HGV) RNA load in immunodeficient individuals and in immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.*, **59**: 32-37.

Lelkes, P.; Miller, IR. (1980) Perturbations of membrane structure by optical probes: I. Location and structural sensitivity of merocyanine 540 bound to phospholipid membranes. *J. Memb. Biol.*, **52**: 1-15.

Lentz, B.R.; Wu, J.R.; Zheng, L.X.; Prevratil, J. (1996) The interfacial region of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers is perturbed by fusogenic amphipaths. *Biophys. J.*, **71**: 3302-3310.

Linnen, J.; Wages, J.; Zhang-Keck, Z. Y.; Fry, K. E.; Krawczynski, K. Z.; Alter, H.; Kim, J. P. (1996) Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, **271**: 505-508.

Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B.A. (2002) DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics*, **18**: 211-212.

Macalalad, A. R.; Snyderman, D. R. (2002) GB virus C and mortality from HIV infection. *New Eng. J. Med.*, **346**: 377.

Maget-Dana, R. (1999) The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *BBA-Biomembranes*, **1462**: 109-140.

Maget-Dana, R.; Lelievre, D.; Brack, A. (1999) Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: Comparison between alpha-helical and beta-sheet conformations. *Biopolymers*, **49**: 415-423.

Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D. (2002) Fluorescent lipid probes: some properties and Applications. *Chem. Phys. Lipids*, **116**: 3-18.

Matar, G.; Nasir, M.N.; Besson, F.J. (2010) Interfacial properties and structure stability of the gp41 tryptophan-rich peptide from HIV-1. *J. Colloid Interface Sci.*, **352**: 520-525.

Mohr, E. L.; Xiang, J.; McLinden, J. H.; Kaufman, T. M.; Chang, Q.; Montefiori, D. C.; Stapleton, J. T. (2010) GB virus type C envelope protein E2 elicits antibodies that react with a cellular antigen on HIV-1 particles and neutralize diverse HIV-1 isolates. *J. Immunol.*, **185**: 4496-4505.

Moscho, A.; Orwar, O.; Chiu, D.T.; Modi, B.P.; Zare, R.N. (1996) Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 11443-11447.

Nag, K.; Harbottle, R.; Panda, A.K.J. (2000) Molecular architecture of a self-assembled bio-interface: lung surfactant. *Surf. Sci. Technol.*, **16**: 157-170.

Needham, D.; Evans, E. (1988) Structure and mechanical-properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20 oC below to 10 oC above the liquid crystal-crystalline phase transition at 24 oC. *Biochem.*, **27**: 8261-8269.

Nicol, F.; Nir, S.; Szoka, F.C. (2000) Effect of phospholipid composition on an amphipathic peptide-mediated pore formation in bilayer vesicles. *Biophys. J.*, **78**: 818-829.

Nieto-Suárez, N.; Vila-Romeu, N.; Prieto, I. (2008) Behaviour of insulin Langmuir monolayers at the air-water interface under various conditions. *Thin Solid Films*, **516**: 8873-8879.

Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D. (1979). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *BBA-Biomembranes*, **557**: 9-23.

Pagano, R.E.; Gershfeld, N.L. (1972) A millidyne film balance for measuring intermolecular energies in lipid films. *J. Colloid Interface Sci.*, **41**: 311-317.

Patil, Y.P.; Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids*, **177**: 8-18..

Peisajovich, S.G.; Epand, R.F.; Pritsker, M.; Shai, Y.; Epand, R.M. (2000) The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion. *Biochem.*, **39**: 1826-1833.

Pérez-López, S.; Nieto-Suárez, M.; Mestres, C.; Alsina, M.A.; Haro, I.; Vila-Romeu, N. (2009). Behaviour of a peptide sequence from the GB virus C/hepatitis G virus E2 protein in Langmuir monolayers: Its interaction with phospholipid membrane models. *Biophys. Chem.*, **141**: 153-161.

Pérez-López, S.; Blanco-Vila, N.M.; Vila Romeu, N. (2011) Bovine insulin-phosphatidylcholine mixed Langmuir monolayers: behavior at the air-water interface. *J. Pys. Chem.*, **115**: 9387-9394.

Pilon, M.; Jordi, W.; De Kruijff, B.; Demel, R.A. (1987) Interaction of mitochondrial precursor protein apocytochrome C with phosphatidylserine in model membranes. A monolayer study. *BBA-Biomembranes*, **902**: 207-216.

Poklar, N., Fritz, J., Macek, P., Vesnaver, G., & Chalikian, T.V. (1999) Interaction of the pore-forming protein equinatoxin II with model lipid membranes: A calorimetric and spectroscopic study. *Biochem.*, **38**: 14999-15008.

Polgreen, P. M.; Xiang, J.; Chang, Q.; Stapleton, J. T. (2003) GB virus type C/hepatitis G virus: a non-pathogenic flavivirus associated with prolonged survival in HIV-infected individuals. *Microbes infect.*, **5**: 1255-1261.

Rapaport, D.; Shai, Y. (1994) Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes. *J Biol. Chem.*, **269**: 15124-15131.

Richardson, J.S.; Richardson, D.C. (1988) Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science*, **240**: 1648-1652.

Rojo, N.; Gómara, M.J.; Busquets, M.A.; Alsina, M.A.; Haro, I. (2003) Interaction of E2 and NS3 synthetic peptides of GB virus C/hepatitis G virus with model lipid membranes. *Talanta*; **60**: 395-404.

Sallie, R.; Shaw, J.; Mutimer, D. (1996) GBV-C virus and fulminant hepatic failure. *Lancet*, **347**: 1552-1553.

Steinkopf, S., Achjelderup, A., Gjerde H. L., Pfeiffer J., Thoresen S., Gjerde A. U. and Holmsen H. (2008). The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa®) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers. *Biophys.Chem.*, **134**: 39-46.

Sánchez-Martín, M.J.; Haro, I.; Alsina, M.A.; Busquets, M.A.; Pujol, M. (2010) A Langmuir Monolayer Study of the Interaction of E1(145-162) Hepatitis G Virus Peptide with Phospholipid Membranes. *J. Phys. Chem. B*. **114**: 448-456.

Sánchez-Martin, M.J.; Busquets, M.A.; Girona, V.; Haro, I.; Alsina, M.A.; Pujol, M. (2011) Effect of E1(64-81) hepatitis G peptide on the in vitro interaction of HIV-1 Fusion Peptide with membrane models. *BBA-Biomembranes*, **1808**: 2178-2188.

Shankar, E. M.; Solomon, S. S.; Vignesh, R.; Murugavel, K. G.; Sundaram, M.; Solomon, S.; Kumarasamy, N. (2008) GB virus infection: a silent anti-HIV panacea within? *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.*, **102**: 1176-1180.

Schwarz, S.M.; Lambert, A.S.; Medow, M.S. (1992) Ontogeny of proximal colon basolateral membrane lipid-composition and fluidity in the rabbit. *BBA-Biomembranes*, **1107**: 70-76.

Shinitzky, M.; Barenholz, Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *BBA-Biomembranes*, **515**: 367-394.

Simons, J. N.; Leary, T. P.; Dawson, G. J.; Pilot-Matias, T. J.; Muerhoff, A. S.; Schlauder, G. G.; Mushahwar, I. K. (1995) Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nature med.*, **1**: 564-569.

Slavik, J. (1982) Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane-composition and function. *BBA-Biomembranes*, **694**: 1-25.

Stapleton, J. T. (2003). *GB virus type C/hepatitis G virus*. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 23, No. 2, pp. 137-148). New York: Thieme-Stratton, c1981.

Stillwell, W.; Ehringer, W.; Wassall, S.R. (1992) Interaction of alpha-tocopherol with fatty-acids in membranes and ethanol. *BBA-Biomembranes*, **1105**: 237-244.

Stillwell, W.; Wassall, S. R.; Dumaul, A. C.; Ehringer, W. D.; Browning, C. W.; Jenks, L. (1993) Use of merocyanine (MC540) in quantifying lipid domains and packing in phospholipid vesicles and tumor cells. *BBA-Biomembranes*, **1146**: 136-144.

Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. *PNAS*, **75**: 4194-4198.

Tanaka, E.; Kiyosawa, K.; Shimoda, K.; Hino, K.; Tacke, M.; Schmolke, S.; Hess, G. (1998) Evolution of hepatitis G virus infection and antibody response to envelope protein in patients with transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. *J. Viral Hepatitis*, **5**: 153-159.

Tanford, G. (1980). *Formation of micelles and biological membranes*. New York, Wiley-Interscience.

Tian, C.; Tetreault, E.; Huang, C.K.; Dahms, T.E.S. (2006) Electrostatic interactions of colicin E1 with the surface of Escherichia coli total lipid. *BBA-Biomembranes*, **1758**: 693-701.

Tillmann, H. L.; Manns, M. P. (2001) GB virus-C infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Antiviral Res.*, **52**: 83-90.

Van der Bij, A. K.; Kloosterboer, N.; Prins, M.; Boeser-Nunnink, B.; Geskus, R. B.; Lange, J. M.; Schuitemaker, H. (2005) GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: the Amsterdam cohort study. *J. Infect. Dis.*, **191**: 678-685.

Van Ginkel, G.; Van Langen, H.; Levine, Y. K. (1989) The membrane fluidity concept revised by polarised fluorescence spectroscopy on different model membrane containing unsaturated lipid and sterols. *Biochimie*, **71**: 23-32.

Vance, D.E.; Vance, J. (1996). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Amsterdam (Nederland) Ed Elsevier Science.

Veatch, W.; Stryer, L. (1977) Dimeric nature of gramicidin-A Transmembrane channel - conductance and fluorescence energy-transfer studies of hybrid channels. *J. Mol. Biol.*, **113**: 89-102.

Vereyken, G.; Chupin, V.; Demel, R.A.; Smeekens, S.S.M.; De Kruijff, B. (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *BBA-Biomembranes*, **1510**: 307-320.

Verger, R.; Pattus, F. (1982) Lipid-Protein Interactions in Monolayers. *Chem. Phys. Lipids*, **30**: 189-227.

Walde, P.; Cosentino, K.; Engel, H.; Stano, P. (2010) Giant vesicles: preparations and Applications. *Chembiochem.*, **11**: 848-865.

Whitmore, L.; Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.*, **32**: 668-673.

Williams, B.W.; Scotto, A.W.; Stubbs, C.D. (1990) Effect of proteins on fluorophore lifetime heterogeneity in lipid bilayers. *Biochem.*, **29**: 3248-3255.

Williamson, P.; Mattocks, K.; Schlegel, R.A. (1993) Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. *BBA-Biomembranes*, **732**: 387-393.

Woody, Y. (1996) *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Plenum Press, New York.

Xiang, J.; Wünschmann, S.; Diekema, D. J.; Klinzman, D.; Patrick, K. D.; George, S. L.; Stapleton, J. T. (2001) Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. *New Engl. J. Med.*, **345**: 707-714..

Xiang, J.; George, S. L.; Wünschmann, S.; Chang, Q.; Klinzman, D.; Stapleton, J. T. (2004). Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , and SDF-1. *Lancet*, **363**: 2040-2046.

Yamashita, Y.; Oka, M.; Tanaka, T.; Yamazaki, M. (2002) A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals. *BBA-Biomembranes*, **1561**: 129-134.

Zhang, L. J.; Rozek, A.; Hancock, R.E.W. (2001) Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.*, **276**: 35714-35722.

Zhang, W.; Chaloner, K.; Tillmann, H. L.; Williams, C. F.; Stapleton, J. T. (2006) Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. *HIV Med.*, **7**:3 173-180.

