

Universidade de São Paulo
Instituto de Física
Departamento de Física Geral

Membranas lipídicas e suas interações com moléculas de interesse biológico

Estudos por ressonância paramagnética eletrônica
e outras técnicas espectroscópicas

Maria Teresa Lamy Freund



Tese apresentada ao IFUSP
como parte dos requisitos ao
Concurso de Livre-Docência

Setembro de 1998



Agradecimentos

Certamente são muitas as pessoas que têm contribuído para o meu trabalho ao longo dos anos. Gostaria de lembrar o Prof. Sérgio Costa Ribeiro que teve a visão da importância da física aplicada a sistemas biológicos, e trouxe o Prof. Bemski para a PUC do Rio de Janeiro, no início dos anos setenta. A partir daí foi desenvolvido um pequeno grupo de físicos interessados em moléculas biológicas – Otaciro R. Nascimento, Sônia W. Louro e Paulo Costa Ribeiro e, mais tarde, Eliane Wajnberg. Com eles compartilhei o aprendizado inicial em biofísica, e, mais importante, o grande prazer de trabalharmos juntos. Mais recente, devo à amiga Shirley Schreier, do IQUSP, a introdução às membranas lipídicas e ao método de marcadores de spin, o rigor e entusiasmo no trabalho. Agradeço aos amigos Amando, Cecil e Regina que me receberam tão calorosamente no Grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP, e com quem o dia-a-dia tem sido estimulante e prazeroso. Também agradeço aos muitos amigos e colaboradores, em especial Celina Castuma (no IQUSP), Carla, Vera, e aos alunos com quem tive, e tenho, o prazer de trabalhar, vários deles co-autores do trabalho aqui apresentado – Vergínia (no IQUSP), Celina, Márcia, Cláudio, Ernane, Karim, Rozane, Roberto, e ao nosso técnico de laboratório, Roberto. Agradeço à USP, FAPESP, CNPq e FINEP o apoio financeiro. E a Norberto, Rita e Ricardo o apoio amigo, nestes tempos de "livre demência".

Resumo

Estão apresentados os aspectos mais relevantes do trabalho que desenvolvemos nos últimos anos, relativo à interação de várias moléculas com membranas lipídicas, usadas como modelo simples de membranas biológicas, e a caracterização estrutural destas membranas. Algumas técnicas espectroscópicas foram empregadas, como fluorescência, espalhamento de luz e dicroísmo circular, sendo que o enfoque principal está na utilização da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de radicais livres, incorporados aos sistemas em estudo como sondas paramagnéticas. Discutimos as alterações provocadas pelo hormônio peptídico α -MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) na estrutura da membrana lipídica, e os efeitos mais evidentes causados pelo análogo biologicamente mais potente [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH. Também estão aqui analisadas várias características do hormônio melatonina, como solubilidade em meio aquoso, partição e posicionamento em bicamadas lipídicas. Outro assunto estudado foi o comportamento termotrópico de dispersões lipídicas carregadas de dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG), onde discutimos a variação do potencial eletrostático da superfície da bicamada lipídica na transição de fase principal, gel-liquido cristal, e as possíveis alterações estruturais na pós-transição, esta última ainda muito pouco compreendida. Este trabalho mostra a aplicação, e aperfeiçoamento, de métodos e modelos físicos em sistemas de interesse biológico.

Abstract

Lipid membranes and its interaction with biologically relevant molecules

A study by electron paramagnetic resonance and other spectroscopic techniques

The most relevant aspects of the work we have developed in the last years are presented here. They are related to the interaction of different molecules with lipid membranes, used as simple models of biological membranes, and the structural characterization of those systems. Among the different spectroscopic techniques applied, like fluorescence, light scattering and circular dichroism, the main emphasis has been on the analysis of the electron paramagnetic resonance (EPR) free radicals used as spin probes. Membrane structural alterations caused by the interaction of the native peptide *α-melanocyte stimulating hormone* (*α*-MSH) with lipid bilayers are discussed here, and compared to the much more evident changes induced by the biologically more potent analog [*Nle*⁴, *D-Phe*⁷]-*α*-MSH. Several characteristics of the hormone melatonin are also analyzed, like aqueous solubility, lipid membrane partition coefficient and localization. Another aspect discussed concerns the thermal properties of charged lipid dispersions. An increase on the electrostatic surface potentials of dimyristoyl phosphatidyl glicerol (DMPG) vesicles at the main lipid phase transition, gel to liquid crystal, is proposed, and the observed membrane alterations at the less understood thermal transition, the post-transition, are analyzed. The present work focuses on the application and discussion of physical methods and models to biologically relevant systems.

Índice

I.	Introdução	1
II.	Interação de peptídeos melanotrópicos com membranas lipídicas	
1.	Apresentação	6
2.	Alterações na membrana vistas por marcadores de spin de cadeia acila	7
3.	Alterações na membrana vistas por marcador de spin esteroídico	17
4.	Alterações na superfície da membrana	19
5.	Efeitos de diferentes concentrações de peptídeo na membrana	22
6.	Dicroísmo circular dos peptídeos	30
III.	Algumas propriedades da melatonina e de sua interação com agregados anfifílicos	
1.	Apresentação	33
2.	Solubilidade da melatonina em meio aquoso	34
3.	Permeabilidade da bicamada lipídica à melatonina	35
4.	Interação da melatonina com bicamadas lipídicas	37
IV.	Dispersões lipídicas carregadas: estudos com o DMPG	
1.	Apresentação	47
2.	Espalhamento de luz	48
3.	RPE de marcadores de spin incorporados em dispersões de DMPG	52
4.	Modelo de Gouy-Chapman-Stern	54
5.	Superfície de vesícula de DMPG vista por um marcador de spin catiônico aquo-solúvel	57
6.	Alguns resultados preliminares com dCAT1 monitorando interação peptídeo-lipídio	68
7.	Resultados preliminares com 16-PCSL em dispersões de DMPG	72
V.	Conclusões	78
A1.	RPE de marcadores de spin	81
A2.	Partição (associação) de moléculas em (com) agregados anfifílicos	98
A3.	Medidas de emissão de fluorescência por amostras que espalham luz	107
VI.	Bibliografia	113
A4.	Cópias dos artigos nos quais se baseia o presente trabalho	117

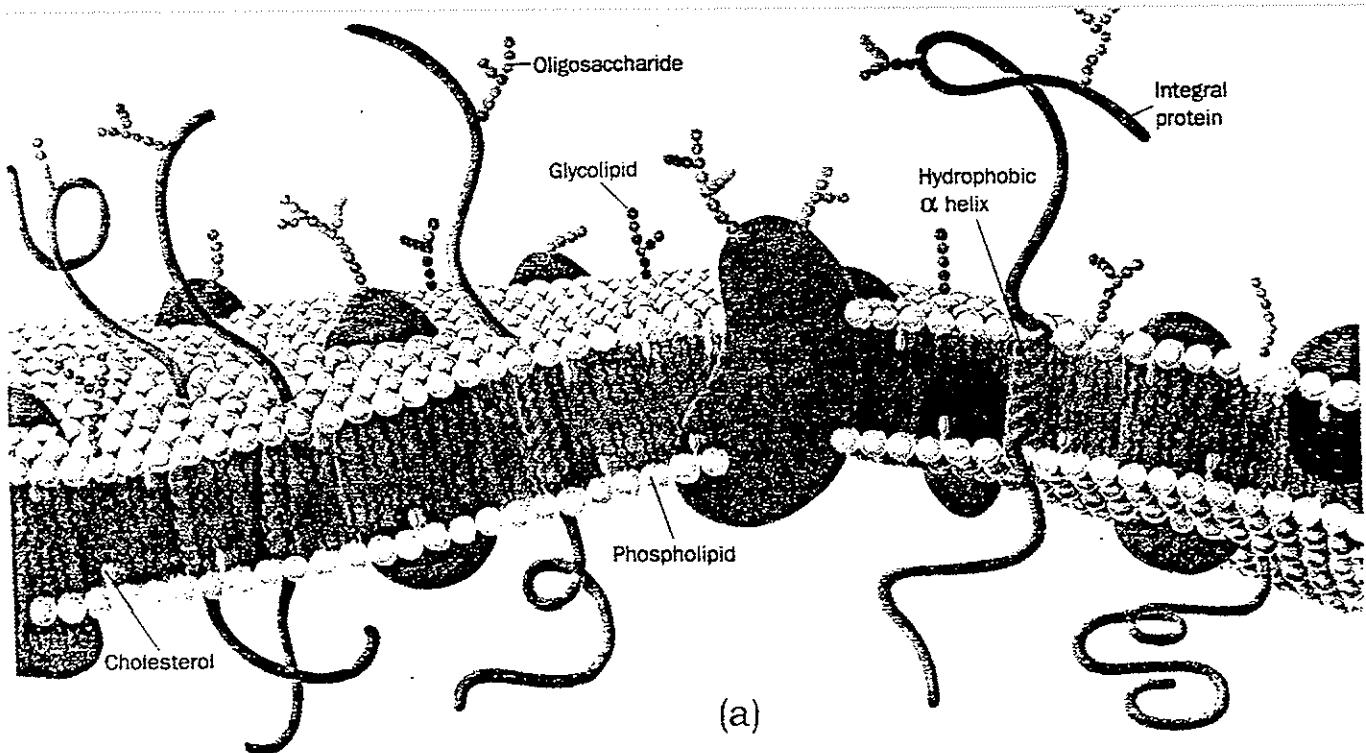
I. Introdução

Estão apresentados neste trabalho, os aspectos mais relevantes das pesquisas por nós desenvolvidas nos últimos anos, em colaboração com os vários colegas mencionados no decorrer do texto. Alguns desses resultados, já publicados, estão rediscutidos à luz de novas análises e/ou investigações. Foram também incluídos dados mais recentes que, embora preliminares, são instigantes o suficiente para merecerem registro, e, esperamos, discussões.

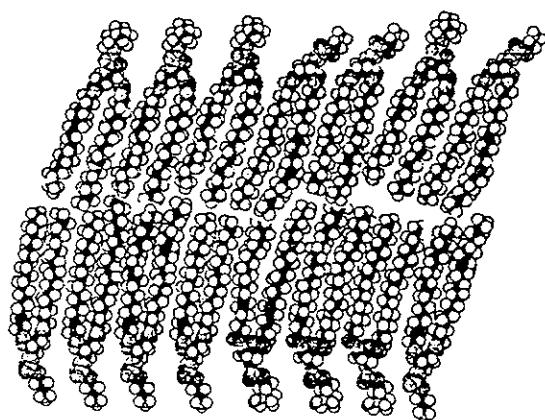
Mostramos aqui estudos da interação de alguns hormônios, e seus derivados, com membranas lipídicas, usadas como sistema modelo da fase lipídica de membranas biológicas. Discutimos também algumas propriedades térmicas de dispersões lipídicas carregadas. Várias técnicas espectroscópicas foram utilizadas, com ênfase na RPE (ressonância paramagnética eletrônica) de marcadores de spin. Muitas vezes as questões iniciais foram colocadas por sua relevância biológica e, ao longo do estudo, vários aspectos interessantes surgiram e foram desenvolvidos, relativos aos métodos empregados e à físico-química dos sistemas.

Membranas lipídicas são, sem dúvida, modelos muito simples de membranas biológicas, sendo estas últimas constituídas de lipídios de diferentes cabeças polares e cadeias hidrocarbonadas, além de proteínas e açúcares (Fig. I.1a). Considerando a dificuldade de trabalhar com os complexos sistemas biológicos, e deles obter informações moleculares específicas, nosso enfoque tem sido o estudo da interação de pequenas moléculas biologicamente relevantes com membranas constituídas por somente um tipo de lipídio. Pelo seu caráter anfifílico, em solução aquosa, muitos lipídios agrupam-se em bicamadas (Na Fig. I.1), que podem estar bastante organizadas, ou empacotadas, na chamada fase gel (b), ou mais fluidas, fase líquido cristal (c). Muitas vezes estas bicamadas naturalmente organizam-se em vesículas unilamelares (Fig. I.1d) ou multilamelares (Fig. I.1e), estas últimas também chamadas lipossomos. Dependendo de suas características, os lipídios podem também agregar-se formando vários outros tipos de estruturas, como micelares, hexagonais, cúbicas, etc (ver, p. ex., Gennis, 1989).

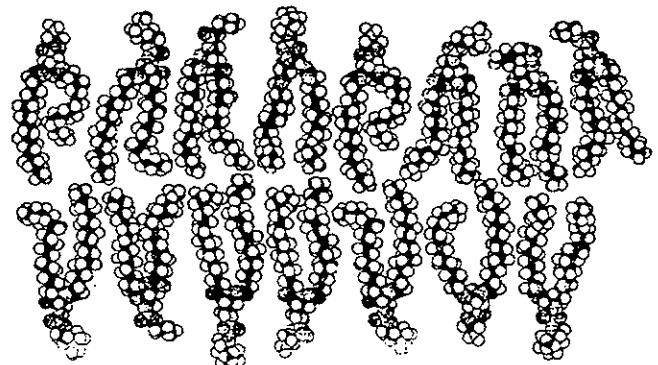
A interação de peptídeos melanotrópicos, as melanotropinas, com membranas lipídicas (capítulo II) é um dos estudos que vem sendo desenvolvido por nosso grupo há vários anos. Essa linha de pesquisa surgiu de uma conversa, em uma reunião da Associação dos Docentes da USP (ADUSP), entre os professores Amando S. Ito, do Instituto de Física (IFUSP) e Ana M.L. Castrucci, do Instituto de Biociências (IBUSP). Os dois, recém-chegados de trabalhos no exterior, procuravam colaboradores no Brasil que trouxessem aspectos complementares às suas áreas de pesquisa. Pouco tempo depois passei a fazer parte do Grupo de Biofísica e Física



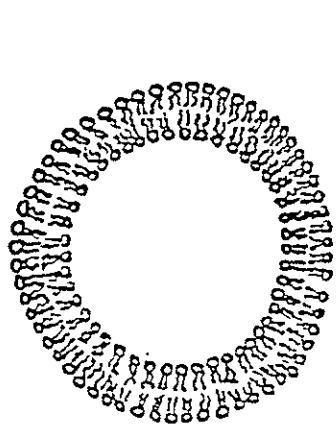
(a)



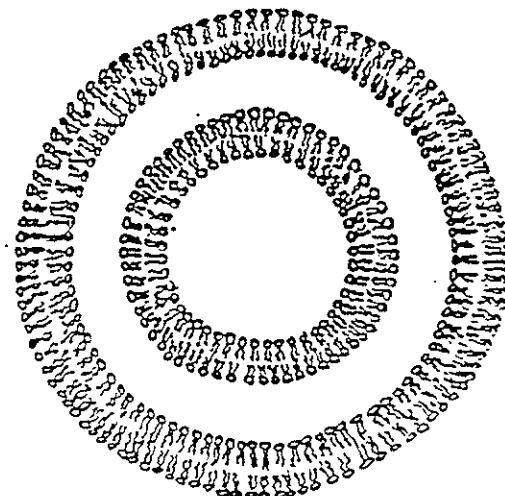
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. I.1. Representações esquemáticas de: (a) membrana biológica (Fig 11.21, Voet e Voet, 1990); (b) e (c) bicamada lipídica nas fases gel e líquido cristalina, respectivamente (Fig 11.17, Voet e Voet, 1990); (d) e (e) vesículas unilamelares e multilamelares (lipossomos), respectivamente (Fig int-1, Riske, 1997).

Médica do IFUSP, e, em colaboração com Amando Ito, tenho testemunhado e aproveitado da riqueza da interação entre biólogos, bioquímicos e físicos no campo das melanotropinas. Ana Castrucci e seu grupo enriqueceram-nos com aspectos biologicamente relevantes do estudo da pigmentação, discutindo as várias atuações dos peptídeos melanotrópicos, tanto na pigmentação como em outras funções nos organismos (Castrucci e col., 1990).

Sabendo que hormônios peptídicos muito provavelmente interagem com receptores proteicos na superfície de membranas, iniciamos um trabalho conjunto de estudo da interação de peptídeos com agregados anfifílicos, em especial bicamadas lipídicas. Era nosso interesse descobrir as afinidades dos vários peptídeos pela fase lipídica das membranas, e as modificações estruturais que ambos sofrem (caso sofram alguma), peptídeo e bicamada lipídica, ao interagirem entre si. Fora o interessante aspecto físico-químico da proposta acima, relativo à partição do peptídeo em dois meios, água e membrana, este estudo é biologicamente relevante, pois a fase lipídica da membrana celular pode funcionar como um "catalisador" da interação peptídeo-receptor proteico (Sargent e Schwyzer, 1986; Schwyzer, 1986), tanto aumentando a concentração local de peptídeo próxima ao receptor, como favorecendo uma certa estrutura espacial do hormônio, necessária para sua atividade biológica.

Amando Ito estudou a interação peptídeo-lipídio com a técnica de fluorescência, monitorando o próprio peptídeo através das alterações da fluorescência do triptofano nele presente (Ito e col., 1993; Macedo e col., 1996). Foram, também, feitos estudos teóricos de modelagem molecular dos peptídeos em solução, e na presença de modelos simples de membrana (Jacchieri e Ito, 1995; Pascutti e col., 1998).

Nós temos investigado a mesma interação sob um outro ângulo: as alterações causadas em membranas lipídicas pela presença dos peptídeos. Para isso utilizamos a análise da RPE de marcadores de spin incorporados às bicamadas. Como modelo de membrana temos usado vesículas lipídicas aniônicas de DMPG (dimiristoil fosfatidil glicerol) ou neutras de DMPC (dimiristoil fosfatidil colina), com vários marcadores de spin a elas incorporados (Fig. I.2). Por outro lado, a conformação dos peptídeos em meio aquoso, e em dispersões anfifílicas, foi monitorada por dicroísmo circular.

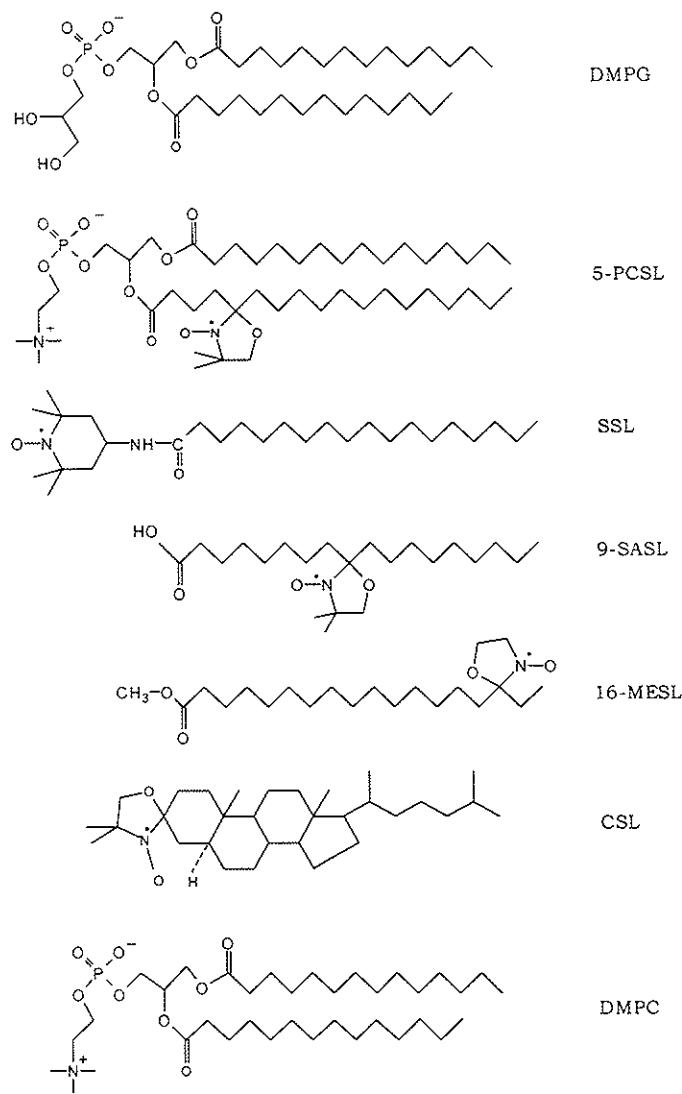


Fig. I.2. Representação esquemática da estrutura de fosfolipídios e marcadores de spin

Paralelo ao trabalho com as melanotropinas, temos estudado as propriedades da melatonina e de sua interação com agregados anfifílicos (capítulo III). Já há algum tempo este hormônio está presente na literatura de divulgação científica (p. ex., Newsweek, Agosto 1995), e na prateleira dos interessados nas novas milagrosas descobertas relacionadas à busca da juventude. Isto porque, foi mostrado que a biosíntese de melatonina diminui com a idade, sendo este hormônio, possivelmente, um bom supressor natural de radicais livres (Reiter e col., 1993; Marshall e col., 1996; Garcia e col., 1997), estes últimos, vilões consagrados do envelhecimento celular (apesar de alguns radicais livres participarem em reações biológicas fundamentais). Além disso, a melatonina tem sido também usada no controle de insônia. Ao mesmo tempo, como em geral tem acontecido com as várias "drogas da moda", estudos sugerem que se tenha cautela na ingestão de melatonina, apontando efeitos colaterais de excesso de melatonina (p. ex., a desaceleração na renovação dos tecidos mucosos, Castrucci, comunicação pessoal), e chamando a

atenção para o equilíbrio do importante sistema regulador do qual ela participa, estando sua síntese correlacionada com a produção de serotonina (ver Fig. III.1.1), fazendo parte do relógio biológico do organismo (Huether, 1996; Filadelfi e Castrucci, 1996).

Como no estudo das melanotropinas, o trabalho com este hormônio também surgiu de conversas entre nosso grupo e o da Dra. Ana Castrucci, do IBUSP. Soubemos por eles que a melatonina teria muitas funções no organismo (Reiter, 1991), fora e dentro de células, sugerindo que nem sempre ela necessitasse de um receptor proteico específico na superfície das membranas celulares. Na literatura existia a crença de que a melatonina seria "insolúvel" em meio aquoso, e portanto, na corrente sanguínea, fosse transportada por proteínas até as células alvo (Cardinali e col., 1972). Além disso, pela sua grande hidrofobicidade, era possível que a parte lipídica da membrana pudesse ter um papel importante nas suas várias atividades. Existia uma certa confusão na literatura, pois ao mesmo tempo em que a melatonina era considerada insolúvel em meio aquoso, era sugerido que ela atravessava a bicamada lipídica, penetrando no citoplasma, e atuando no núcleo das células como agente antioxidante (Reiter e col., 1993; Tan e col., 1993).

Considerando o quadro acima descrito, resolvemos estudar a interação da melatonina com bicamadas lipídicas - a possibilidade dela interagir e alterar a estrutura de membranas lipídicas, e de atravessá-las. Para isso utilizamos as propriedades de fluorescência do hormônio, e marcadores de spin incorporados às vesículas.

Foi ao longo do nosso trabalho com o DMPG como membrana modelo, no estudo de interação hormônio-lipídio, que encontramos algumas características interessantes deste lipídio, que deram origem ao estudo mais detalhado de suas propriedades (capítulo IV). Dispersões de DMPG têm sido usadas por nós, e por vários outros grupos, como sistema modelo da fase lipídica de membranas biológicas. Isto porque existe um grande interesse no estudo de lipídios aniônicos, dado que a maioria das membranas celulares apresenta carga resultante negativa, sendo esta característica fundamental para a aproximação, e posterior interação com a membrana dos vários peptídeos e proteínas carregados positivamente. Por outro lado, a utilização de dispersões de DMPG também é muito conveniente pois este lipídio apresenta temperatura de transição de fase principal gel-líquido cristal (T_m) em torno de 20 °C, permitindo facilmente o estudo tanto na fase gel, como na fase líquido cristal, sem destruição da molécula de interesse (peptídeo ou proteína). Mostramos aqui resultados e discussões sobre a variação térmica da estrutura de vesículas de DMPG, e sua dependência com a força iônica do meio. Na

caracterização de dispersões de DMPG, além da RPE de marcadores de spin, foi fundamental a utilização da técnica de espalhamento de luz.

Para complementar as análises feitas ao longo do trabalho, um resumo da teoria de RPE de marcadores de spin, com a citação bibliográfica relevante, é apresentado no Apêndice 1, e o conceito de partição de moléculas em agregados anfifílicos, com os modelos e equações aqui usados, está discutido no Apêndice 2. No Apêndice 3 mostramos as correções que fazemos nas medidas de fluorescência, para amostras que espalham luz, como as dispersões lipídicas aqui estudadas. Muitos dos métodos usados estão descritos ao longo de texto, mas para informações mais detalhadas dos materiais, aparelhos e técnicas empregados, anexamos cópias dos artigos nos quais se baseia o presente trabalho (Apêndice 4).

II. Interação de peptídeos melanotrópicos com membranas lipídicas

(Parte dos trabalhos de Doutorado de Márcia H. Biaggi, e Iniciação Científica de Karin A. Riske, IFUSP. Biaggi e col., 1996; Biaggi e col., 1997)

1. Apresentação

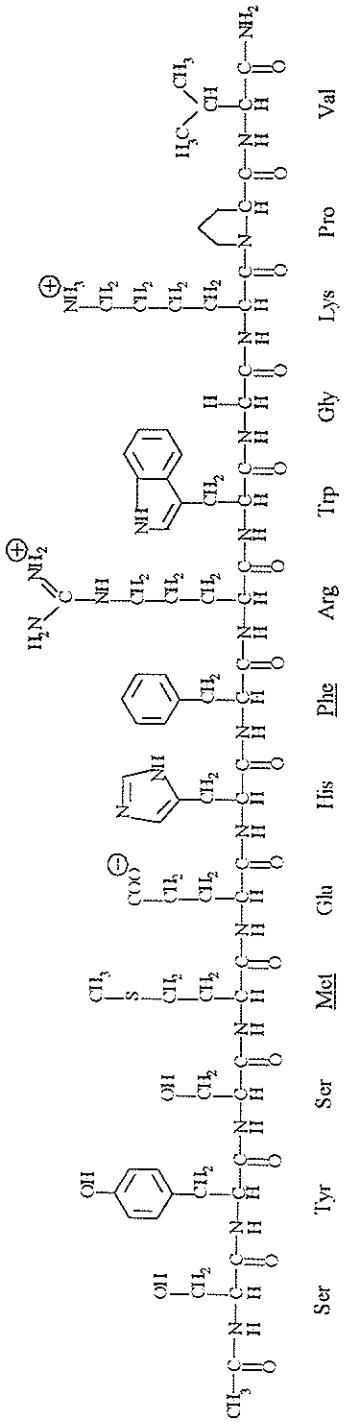
Vamos discutir aqui algumas alterações estruturais e/ou dinâmicas provocadas por dois peptídeos melanotrópicos em membranas lipídicas, monitoradas por RPE. Apresentaremos também dados recentes de fluorescência, e medidas de dicroísmo circular dos peptídeos em solução, e na presença de dispersões de anifílicos.

O hormônio α -MSH (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂), hormônio estimulador de melanócito (*melanocyte stimulating hormone*), é principalmente produzido pela glândula pituitária, sendo da família dos peptídeos obtidos por clivagem da proteína precursora POMC (*proopiomelanocortin*). Na maioria dos vertebrados, α -MSH é o hormônio que regula a pigmentação, causando escurecimento da pele. Durante muito tempo, desde sua identificação em 1955 (Lerner e Lee, 1955), acreditou-se não ser muito relevante o papel do α -MSH em humanos adultos. Nos últimos anos, uma grande quantidade de trabalho tem aparecido, apontando as múltiplas funções deste peptídeo, e seus análogos, no organismo humano, relacionadas, por exemplo, às atividades comportamental e imunológica, e também a aplicações terapêuticas (p. ex., Castrucci e col., 1990; Lerner, 1993; Abel-Malek e col., 1995).

Na Fig. II.1.1 estão mostradas as estruturas primárias do α -MSH e de um análogo, derivado do α -MSH, [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, que chamaremos de MSH-I, onde a metionina foi substituída por uma norleucina, e a *L*-fenilalanina pelo seu *D*-enantiômero. Em vários ensaios biológicos, este análogo mostrou-se muito mais potente (chegando a ser 100 vezes mais potente em ensaios com pele de sapo, Sawyer e col., 1980), e com atividade prolongada, quando comparado com o peptídeo natural. Foi interesse nosso estudar as alterações causadas nas bicamadas lipídicas pela presença dos dois peptídeos, comparando os seus efeitos. Esse trabalho nos ajudou também a entender melhor as particularidades dos espectros de RPE de vários marcadores de spin em diferentes bicamadas lipídicas.

Utilizamos como sistema modelo bicamadas de DMPG (aniônico) e DMPC (neutro) (Lipídios e marcadores de spin estão esquematizados na Fig. I.2). Nas concentrações utilizadas de peptídeos, até 20% em moles da concentração lipídica, nenhuma alteração pôde ser observada nas membranas neutras de DMPC.

α -MSH



MSH-I

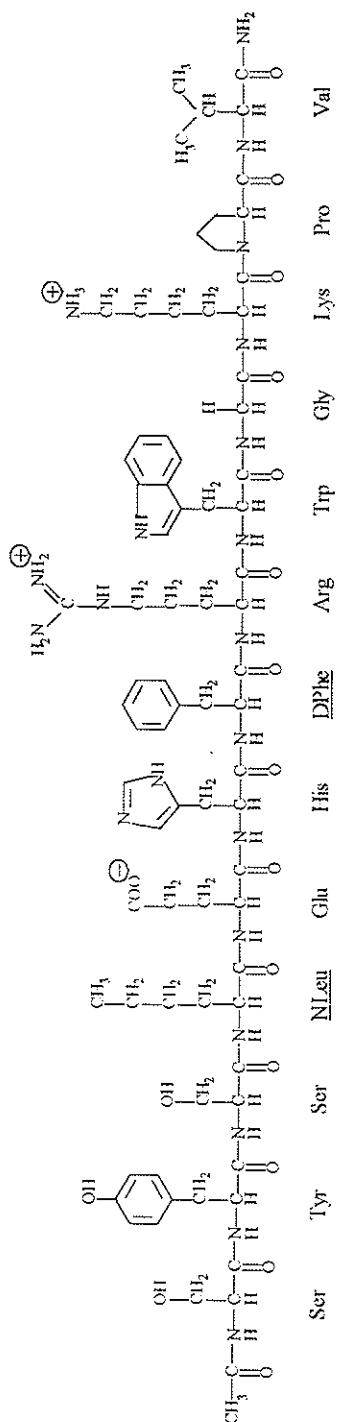


Fig. II. 1.1. Estrutura primária dos peptídeos α -MSH e MSH-I.

Considerando que os dois peptídeos estão carregados (igualmente) nas condições aqui usadas (carga $\approx +1$, ver Fig. II.1.1), fica evidente que a interação eletrostática tem o papel fundamental de aproximar o peptídeo da superfície da membrana, aumentando sua concentração local, favorecendo sua interação com membranas de DMPG.

2. Alterações na membrana vistas por marcadores de spin de cadeia acila

Efeitos observados com 5- e 12-SASL e 5- e 12-PCSL

A Fig. II.2.1 mostra os espectros de RPE dos marcadores de spin 5- e 12-SASL¹, derivados de ácido esteárico, e 5- e 12-PCSL, derivados de fosfolipídio, em dispersões de DMPG², na ausência e na presença dos peptídeos. Os espectros obtidos às várias temperaturas foram analisados através de medidas do parâmetro A_{max} , que monitora o máximo de amplitude de interação hiperfina observada no espectro (Fig. II.2.2). Optamos por esse parâmetro empírico, que contém contribuições tanto de ordem como de mobilidade das cadeias hidrocarbonadas, pela possibilidade de medi-lo às várias temperaturas. Lembramos que a temperatura de transição de fase gel-líquido cristal (T_m) do DMPG é em torno de 20 °C (maiores discussões em IV). Alguns pontos ficam evidentes na Fig. II.2.2:

- i. Comparando os valores de A_{max} dos diferentes marcadores em DMPG (•), observa-se, como esperado, que os marcadores que contêm o anel doxil no carbono 5 monitoram uma região menos fluida da bicamada, apresentando maiores valores de A_{max} . É interessante notar que existe também uma diferença no posicionamento dos SASL e PCSL marcados no mesmo carbono. Voltaremos a este ponto mais adiante.
- ii. Acima da T_m os dois peptídeos restringem o movimento das cadeias hidrocarbonadas (amplitude e/ou taxa) (Griffith e Jost, 1976), diminuindo a fluidez da bicamada lipídica, aumentando a anisotropia espectral, portanto A_{max} .
- iii. Os marcadores de spin deixam evidente que é maior o efeito causado na bicamada pelo análogo MSH-I quando comparado ao α -MSH.

¹ Os números designam a posição do anel doxil na cadeia hidrocarbonada (ver Fig. I.2). Os marcadores derivados de ácido esteárico, dependendo da temperatura, apresentam uma pequena partição no meio aquoso. Portanto, os espectros apresentados aqui são o resultado do sinal composto menos o sinal do marcador livre no meio aquoso, este último obtido na ausência de lipídio.

² A não ser que seja especificado, foi usado 10 mM de DMPG em 10 mM Hepes, pH 7,4, com 1 mol % (com relação ao lipídio) de marcador de spin.

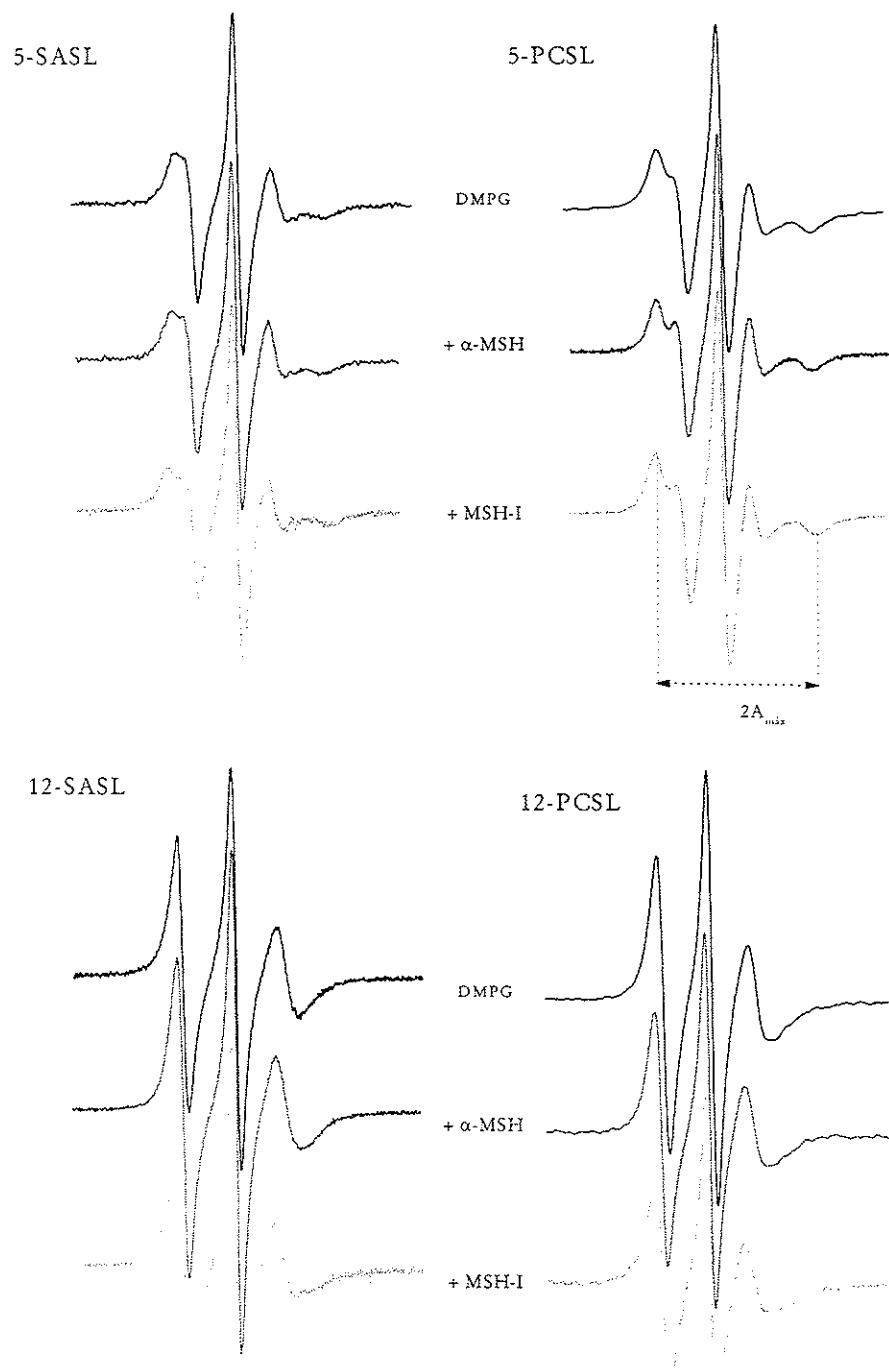


Fig. II.2.1. Espectros de RPE de diferentes marcadores de spin em 10 mM DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo (α -MSH ou MSH-I). $T = 35^{\circ}\text{C}$. Varredura total 100 G.

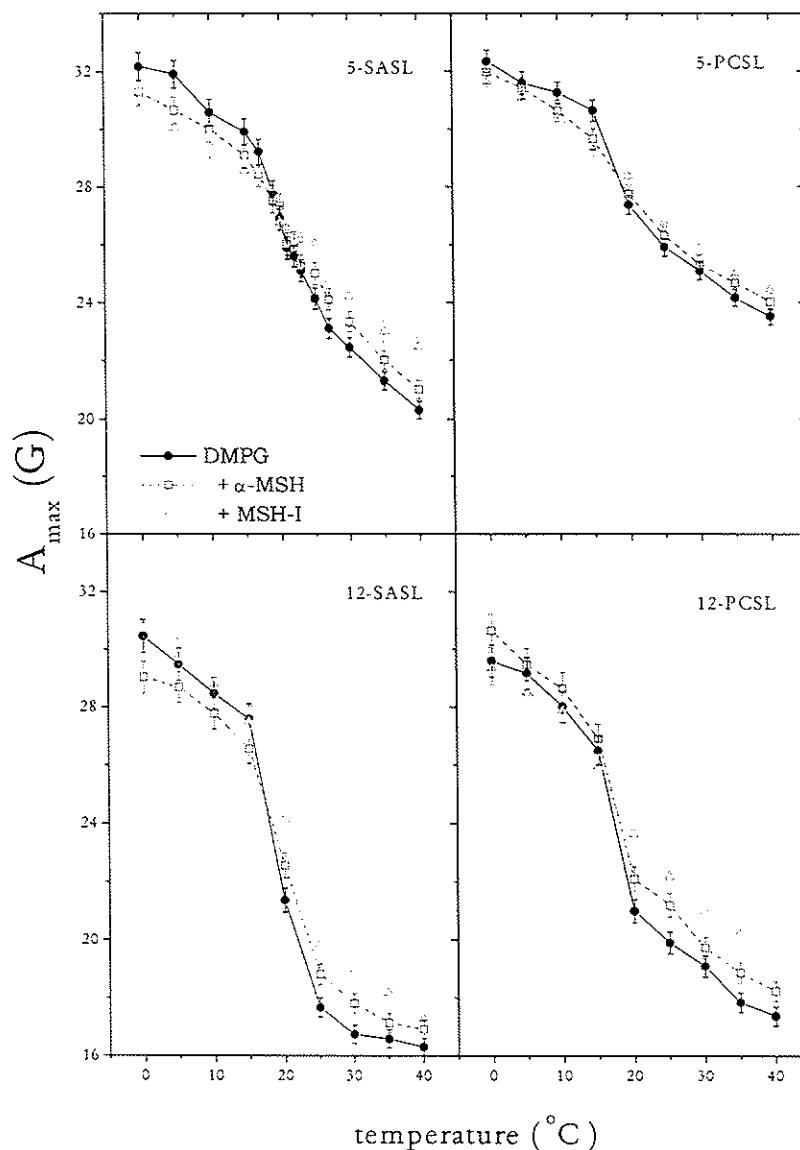


Fig. II.2.2. Variação com a temperatura do parâmetro A_{\max} (ver texto), para diferentes marcadores em 10 mM de DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo. (Em todos os gráficos aqui apresentados os valores são médias de, pelo menos, três experimentos, e os erros, só não mostrados quando menores do que o símbolo, são desvios médios quadráticos).

iv. Os peptídeos alargam a faixa de temperatura onde se observa a transição de fase gel-líquido cristal. Novamente, é maior o efeito observado para o MSH-I.

v. O 5-PCSL parece ser pouco sensível às variações da membrana. Isto pode ser devido à pouca variação da fluidez da microregião monitorada por este marcador (bastante próxima à cabeça polar) e/ou à pouca sensibilidade de seu sinal de RPE (muito imóvel e/ou ordenado) a pequenas variações.

vi. Abaixo da T_m o efeito dos peptídeos não é muito claro, e não será comentado aqui pois necessita maior estudo.

Este trabalho nos levou a uma discussão paralela, sobre o posicionamento dos marcadores anfifílicos em bicamadas de DMPG. A posição dos marcadores derivados de ácido esteárico na bicamada lipídica é muito dependente de seu estado de ionização. Foi mostrado que quando protonados, portanto descarregados, esses marcadores penetram mais profundamente na membrana, apresentando um sinal de RPE bastante mais móvel do que aquele obtido para o mesmo marcador ionizado (Ptak e col., 1980). A Fig. II.2.3 compara os valores de A_{max} obtidos com os marcadores 5-SASL e 5-PCSL em DMPG e DMPC. É interessante notar que nas bicamadas de DMPC, neutro, os dois marcadores estão em posições muito semelhantes (A_{max} similares), enquanto que em DMPG, negativo, o anel doxil do 5-SASL está certamente mais abaixo do que o do 5-PCSL (A_{max} para o 5-SASL menor do que A_{max} para o 5-PCSL). Concluímos, portanto:

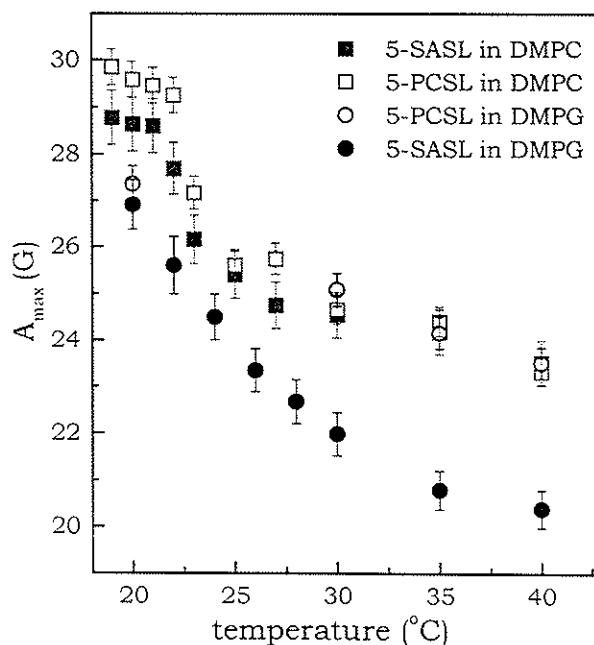


Fig. II.2.3. Variação com a temperatura do parâmetro A_{max} de marcadores de spin derivados de ácido esteárico (SASL) e fosfolipídio (PCSL), em dispersões do lipídio aniónico DMPG e do lipídio neutro DMPC.

- i. Para o marcador fosfolipídico 5-PCSL, a fluidez do DMPG é muito semelhante àquela do DMPC, para temperaturas acima da T_m .
- ii. Em DMPC o 5-SASL deve estar carregado, ficando sua cabeça polar na interface da membrana, dando origem a espectro de RPE muito semelhante àquele obtido com 5-PCSL, estando, portanto, os dois marcadores em posições muito semelhantes na bicamada lipídica. Este último, devido a sua cabeça polar, como os demais fosfolipídios, certamente está ancorado na superfície da membrana..

iii. Em DMPG o 5-SASL está protonado, descarregado, penetrando mais na bicamada³, apresentando menores valores de A_{max} .

As conclusões acima estão de acordo com os valores de pK_a obtidos para os ácidos esteáricos em DMPC ($pK_a \sim 6.5$, Ptak e col., 1980), mostrando que eles estão principalmente carregados em pH 7.4 aqui usado, e principalmente descarregados na superfície negativa de vesículas de DMPG, onde a concentração de H^+ deve ser muito alta (baixo pH local). Esta discussão é muito relevante em todo o nosso trabalho onde marcadores SASL são usados. Mostramos aqui que em vesículas de DMPG os marcadores derivados de ácido esteárico estão principalmente neutros, apresentando pouca interação eletrostática específica com os peptídeos catiônicos. Eles, portanto, devem monitorar a bicamada como um todo, e não somente as regiões próximas aos peptídeos. Certamente a conclusão acima vale para as condições aqui usadas de pH e força iônica. Entretanto, ela pode ser estendida para forças iônicas até 50 mM, sendo que até este valor o espectro do marcador 5-SASL em DMPG varia muito pouco (resultados não mostrados).

Quando falamos em posição do marcador na membrana, estamos falando de um posicionamento médio, já que sabemos de sua grande flutuação vertical na bicamada lipídica (Godici e Landsberger, 1974; Ellena e col., 1988; Yin e col., 1988). Nossos resultados estão de acordo com a maior flutuação do marcador nas extremidades da cadeia (Yin e col., 1988). Isto é, considerando que o SASL está posicionado mais no interior da bicamada do que o PCSL, a diferença entre os valores (médios) de A_{max} dos dois marcadores é mais evidente para o nitróxido na posição 5 (5-SASL e 5-PCSL) do que na posição 12 (12-SASL e 12-PCSL) (Fig. II.2.2), sugerindo que o marcador no 12º carbono "varre" uma região mais ampla do que o marcador no 5º carbono da cadeia.

Efeitos observados com os vários n-SASLs

A seguir mostramos o estudo feito com marcadores de spin derivados de ácido esteárico, marcados em diferentes posições da cadeia hidrocarbonada, n-SASL, sendo $n = 5, 7, 9$ ou 12 . As variações observadas em seus espectros de RPE, na presença dos peptídeos (Fig. II.2.4), também foram analisadas em termos das variações do parâmetro A_{max} . Na Fig. II.2.5 estão mostradas as variações deste parâmetro com a temperatura.

³ Recentemente vimos que o marcador derivado do metil éster do ácido esteárico (5-MESL) penetra ainda mais profundamente na bicamada lipídica, provavelmente pelo caráter mais hidrofóbico do grupo metila, quando comparado com a hidroxila do 5-SASL.

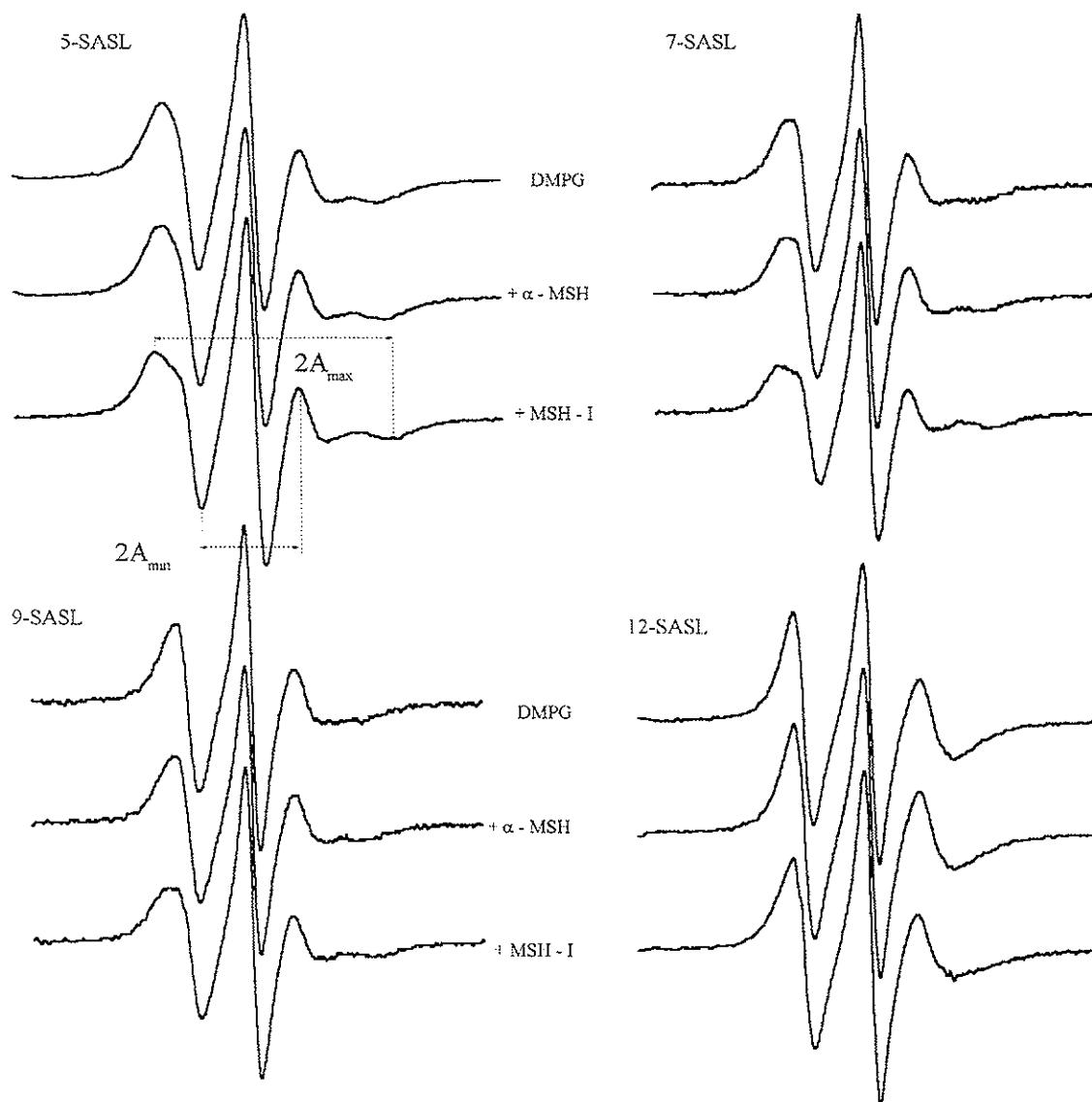


Fig. II.2.4. Espectros de RPE de marcadores de spin derivados do ácido esteárico, marcados em diferentes carbonos da cadeia acila (n-SASL), em 10 mM DMPG na ausência e presença de 1 mM de peptídeo (α -MSH ou MSH-I). T = 40 °C. Varredura total 100 G.

Simplesmente comparando os diferentes marcadores em dispersões de DMPG (●), novamente verificamos que, apesar de suas flutuações verticais, eles monitoram regiões de profundidades diferentes: quanto maior n menor A_{max}, mais próximo do centro da bicamada encontra-se o nitróxido (em média). Com os vários marcadores, acima da T_m, o efeito dos peptídeos na estrutura da bicamada lipídica é mais simples e mais evidente: para todas as posições do nitróxido, o análogo enriquece mais a bicamada do que o peptídeo natural.

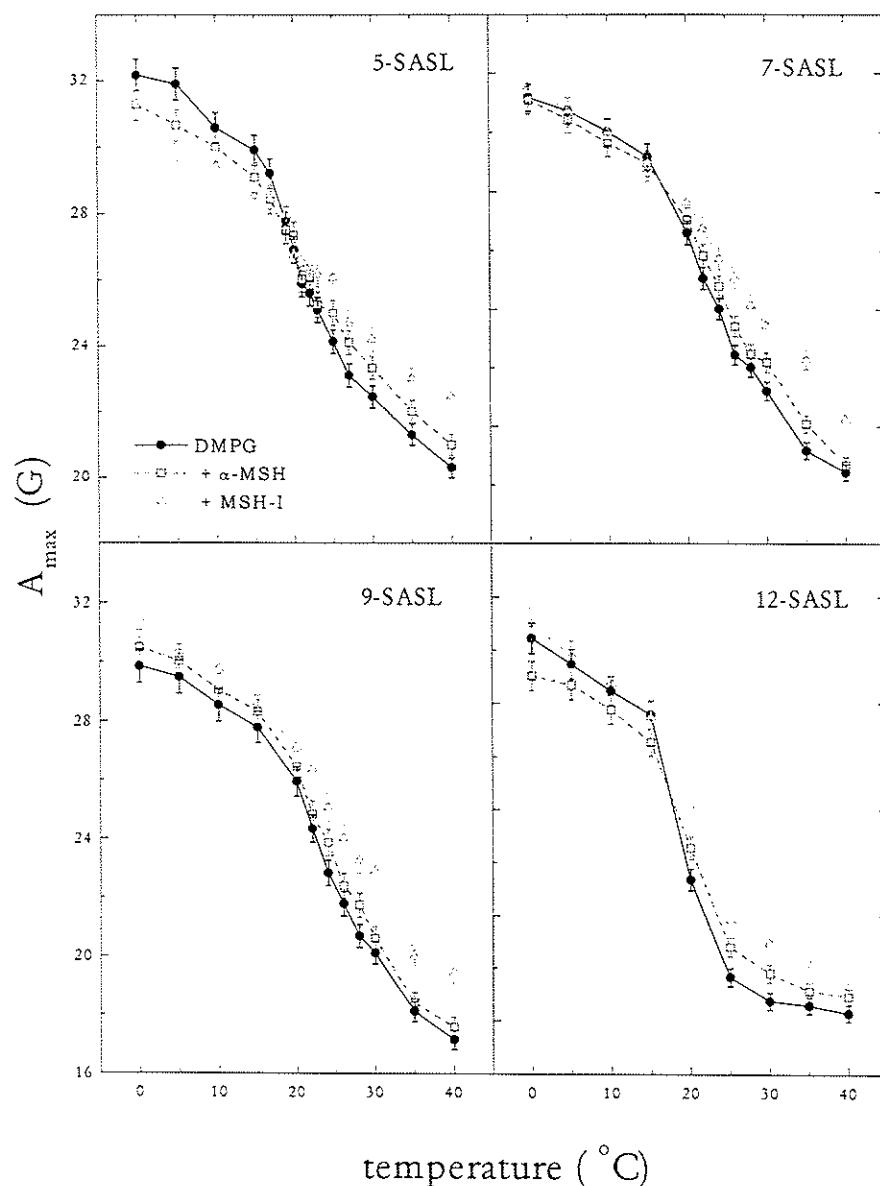


Fig. II.2.5. Variação com a temperatura do parâmetro A_{\max} , para os marcadores n-SASL ($n = 5, 7, 9$ e 12) em 10 mM de DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo.

O efeito dos peptídeos nas membranas de DMPG foi também quantificado através do cálculo do parâmetro S_{eff} , para os diversos marcadores, a várias temperaturas acima de T_m . Como discutido no Apêndice 1 (Eq. A1.15), apesar deste parâmetro, como o A_{\max} , também ter uma contribuição de ordem e mobilidade, para marcadores com aparente movimento rápido (Lange e col., 1985), S_{eff} está principalmente relacionado com a amplitude de movimento dos segmentos da cadeia acila. Além de ficar evidente o maior efeito do análogo MSH-I (Fig. II.2.6), observa-se que, enquanto para o α -MSH o efeito é semelhante para os marcadores nas três posições, 5, 7 e 9, as modificações causadas pelo análogo são principalmente sentidas pelos marcadores 7- e 9-SASL. Este resultado pode estar

indicando que o MSH-I penetra mais profundamente na bicamada do que o peptídeo natural, causando um maior efeito na região do carbono 9 da cadeia do ácido esteárico. Por outro lado, o maior efeito observado com o 9-SASL pode

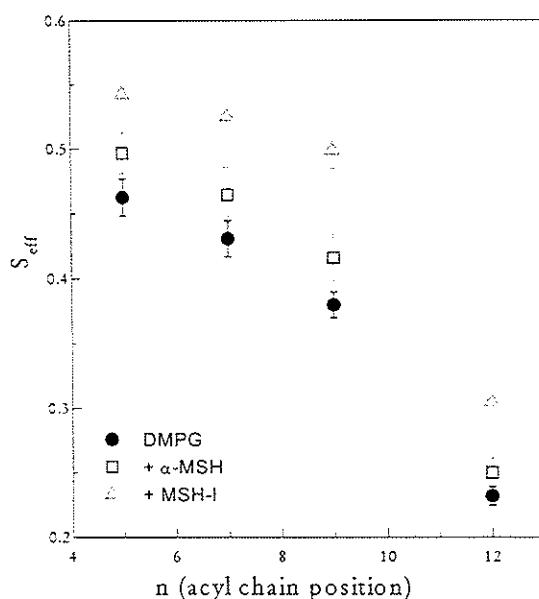


Fig. II.2.6. Variação do parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}) (ver texto) com a posição do nitróxido na cadeia hidrocarbonada, para os marcadores n-SASL ($n = 5, 7, 9$ e 12) em 10 mM de DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo. $T = 30^\circ\text{C}$.

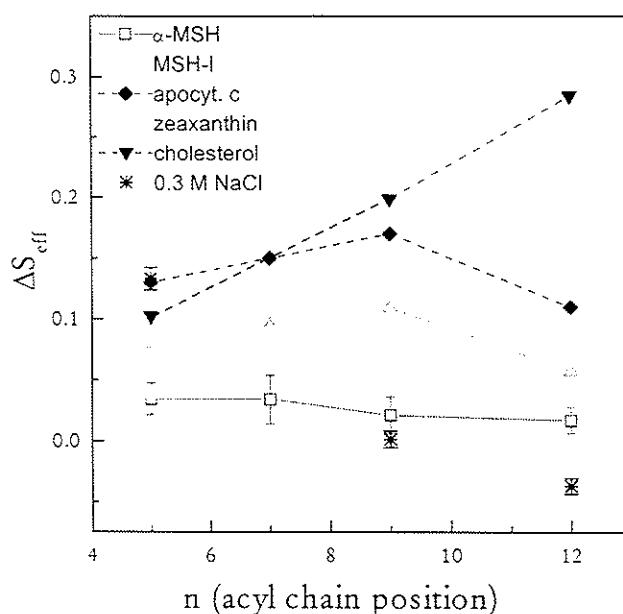


Fig. II.2.7. Variação do parâmetro ΔS_{eff} (S_{eff} relativo ao lipídio puro) com a posição do nitróxido na cadeia hidrocarbonada, para os marcadores n-SASL ($n = 5, 7, 9$ e 12) em diferentes dispersões lipídicas na presença de várias moléculas (ver texto). $T = 30^\circ\text{C}$.

também estar relacionado com a maior sensibilidade do marcador nesta região da membrana às mudanças na ordem/mobilidade da bicamada lipídica. Voltaremos a este ponto mais adiante.

Uma melhor análise da extensão das alterações causadas pelos dois peptídeos na bicamada de DMPG, está mostrada na Fig. II.2.7, onde comparamos seus efeitos, através do parâmetro ΔS_{eff} (variação de S_{eff} relativa ao DMPG puro), com os efeitos observados em alguns outros sistemas. Deste gráfico observamos:

- i. O perfil de variação de ΔS_{eff} com n, para os compostos que se intercalam na bicamada lipídica, colesterol e zeaxanthin (calculados de Subczynski e col., 1992) é diferente daquele obtido aqui para os peptídeos, os primeiros mostrando um maior efeito na região do carbono 12 do ácido esteárico.
- ii. O perfil de variação de ΔS_{eff} com n, do MSH-I, é muito semelhante àquele apresentado pela apocitocromo c, que sabidamente interage na superfície da membrana, parcialmente penetrando na bicamada lipídica (calculado de Görriksen e col., 1986). Perfis semelhantes podem ser encontrados na literatura com outras proteínas extrínsecas, que também parcialmente penetram nas membranas (p.ex., Sankaram e col., 1989).
- iii. O perfil de variação de ΔS_{eff} com n, para DMPG com excesso de sal, 0.3 M de NaCl, é muito diferente daquele observado com os peptídeos. Isto mostra que o empacotamento das caudas hidrocarbonadas observado na presença dos peptídeos catiônicos não é simplesmente um efeito de aumento de blindagem eletrônica devido à diminuição da repulsão eletrostática das cabeças polares dos lipídios. É interessante notar que a presença de 0.3 M de NaCl aumenta o S_{eff} próximo à superfície da bicamada, não alterando muito, ou até diminuindo, a ordem na região central da membrana.

Por outro lado, é interessante observar na Fig. II.2.8 que o perfil de variação de ΔS_{eff} com n, causado simplesmente por diminuição de temperatura da amostra (está mostrada a variação entre espectros obtidos a 26 °C e 40 °C), para marcadores incorporados em vesículas de DMPG, é semelhante àquele obtido com o MSH-I, sendo que os marcadores de spin nas posições 7 e 9 "sentem" mais a diminuição de movimento das cadeias hidrocarbonadas. (Comparar com a variação de h_{+1}/h_0 para marcadores livres em solução, que apesar de ser muito pequena, aproximadamente cresce com n). Portanto, a presença do MSH-I, a maneira como ele interage com a bicamada, certamente causa maior empacotamento na membrana. Porém, somente com os resultados mostrados acima, não é possível afirmar que o análogo penetra mais profundamente na bicamada do que o peptídeo natural.

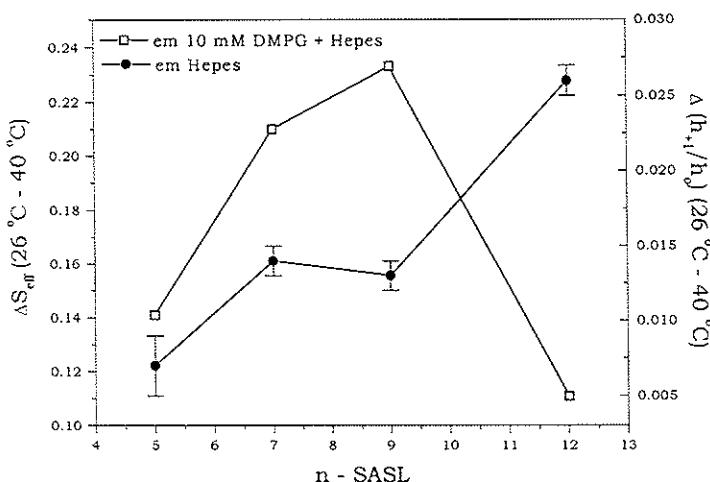


Fig. II.2.8. Variação de parâmetros de RPE de marcadores derivados de ácido esteárico, em DMPG (Ser) e tampão (h_{+1}/h_0), com a posição do nitróxido na cadeia acila (n). As variações foram calculadas entre amostras a 26 °C e 40 °C.

Nenhum dos marcadores de spin aqui utilizados indicou a presença de duas componentes no espectro de RPE, sendo uma mais anisotrópica, que pudesse ser atribuída ao marcador mais imobilizado, próximo ao peptídeo. Apesar desta segunda componente estar presente nos espectros das proteínas extrínsecas mencionadas acima, em outras proteínas, que também supostamente penetram na bicamada lipídica, esta componente mais imóvel não foi observada (Pérez-Gil e col., 1995; Ge e Freed, 1993).

É interessante, portanto, comparar nossos resultados com aqueles obtidos com medidas de supressão da fluorescência do triptofano presente nos peptídeos. Usando como supressores os mesmos marcadores de spin aqui utilizados, derivados de ácido esteárico e de fosfolipídio, utilizando o método da paralaxe (Chattopadhyay e London, 1987), foi encontrado que o análogo MSH-I penetra mais profundamente na bicamada lipídica do que o hormônio α -MSH (Macedo e col., 1996). Apesar das várias críticas que se pode fazer a este método, questionando-se a validade do cálculo da posição do cromóforo no interior da bicamada, certamente é relevante que para o α -MSH os marcadores 5-, 10- e 12-PCSL suprimam pouco, e igualmente, a fluorescência do triptofano no peptídeo, enquanto que para o MSH-I a supressão seja muito maior para os marcadores localizados mais no interior da bicamada lipídica, 10- e 12-PCSL, do que para o marcador próximo à superfície da membrana, 5-PCSL. Esses resultados vêm reforçar a hipótese de penetração mais profunda na bicamada lipídica para o análogo MSH-I, quando comparado ao hormônio α -MSH.

3. Alterações na membrana vistas por um marcador de spin esteroídico

É sempre interessante comparar os efeitos observados com os marcadores derivados de ácidos graxos, que informam sobre o movimento/ordem do segmento da cadeia hidrocarbonada onde está ligado o anel doxil, com aqueles observados com marcadores rígidos, que "vêem" a membrana como um todo, como o CSL. Este marcador tinha sido por nós utilizado em bicamadas ordenadas de DMPG e colesterol, mostrando efeitos interessantes, por que opostos, dos dois peptídeos nas membranas lipídicas (Biaggi e col., 1993). Mostramos, também, que somente na presença de certas concentrações de colesterol os peptídeos atuam diferentemente nas membranas (resultados preliminares não apresentados). Entretanto, o estudo com DMPG e colesterol em bicamadas orientadas e lipossomos mostrou-se bastante complexo, ainda necessitando maiores esclarecimentos.

Apresentaremos somente os resultados obtidos com os peptídeos em presença de lipossomos de puro DMPG. Na Fig. II.3.1 fica claro que o CSL monitora alterações na estrutura das bicamadas lipídicas, principalmente para baixas temperaturas. Utilizamos aqui também o parâmetro A_{max} , medido às várias temperaturas (Fig. II.3.2), apesar da incerteza na medida deste parâmetro para este marcador de spin em algumas temperaturas. Semelhante ao observado com os marcadores com cadeias acilas, o aumento do desdobramento hiperfino máximo do marcador CSL indica que ambos os peptídeos diminuem a fluidez da bicamada lipídica na sua fase líquido cristalina (acima da T_m). É interessante que o CSL mostra claramente que os peptídeos causam significativa diminuição da temperatura de transição de fase do DMPG, com maior efeito observado para o MSH-I. Este resultado indica que o CSL, com sua estrutura rígida, monitorando a bicamada como um todo, "enxerga" que os peptídeos prejudicam o empacotamento das cadeias hidrocarbonadas, diminuindo a T_m , certamente porque penetram na membrana lipídica. Este efeito é contrário ao que se obtém somente com o aumento da força iônica do meio (Träuble e Eibl, 1974, e ver IV), quando a diminuição da repulsão eletrostática estabiliza a bicamada na fase gel, aumentando a T_m .

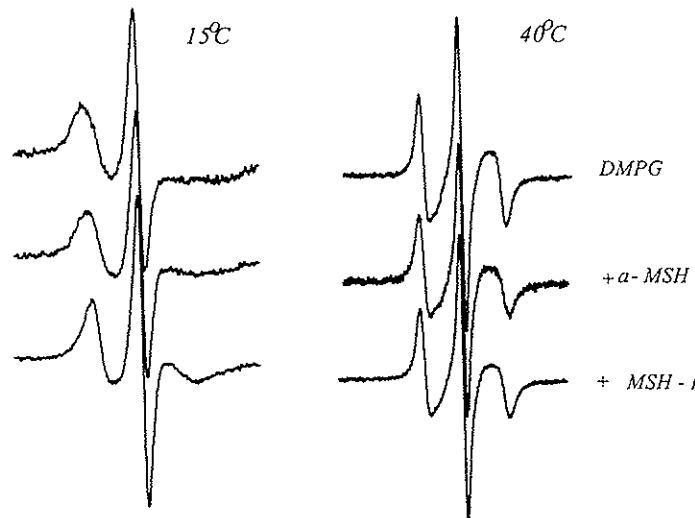


Fig. II.3.1. Espectros de RPE de CSL em presença de dispersões de 10 mM de DMPG, na ausência e na presença de 1 mM de peptídeo, abaixo (10°C) e acima (40°C) da temperatura de transição de fase do lipídio.

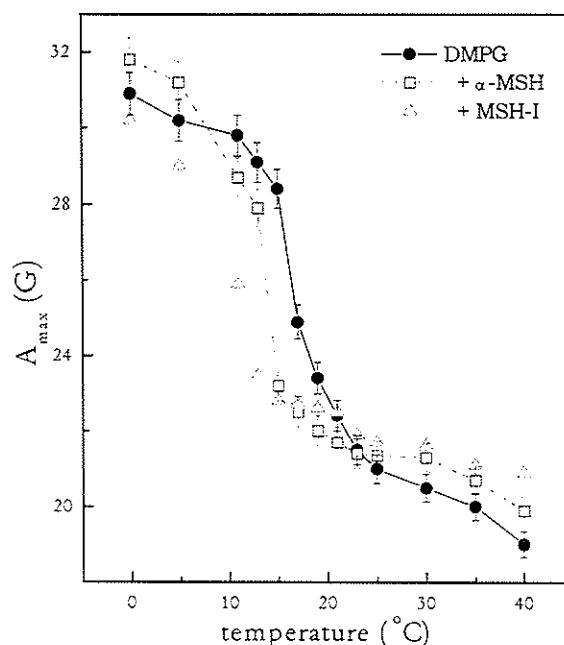


Fig. II.3.2. Variação com a temperatura do parâmetro A_{\max} de CSL em dispersões de 10 mM de DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo.

Por outro lado, é importante ter em mente que o CSL é uma molécula análoga ao colesterol, e, apesar de usado em muito baixa concentração (1 mol % da concentração de DMPG), pode estar modificando o efeito dos peptídeos em bicamada de puro fosfolipídio. Foi observado que o colesterol, mesmo em muito baixas concentrações, causa mudanças estruturais em membranas (Subczynski e Kusumi, 1986). Como mencionado acima, este aspecto do trabalho está ainda aberto a novos experimentos.

4. Alterações na superfície da membrana

Usamos o marcador SSL, um anfifílico marcado na cabeça polar (Fig. I.2), para comparar as modificações que fazem os dois peptídeos na superfície de vesículas de DMPG.

Semelhante ao obtido com marcadores de spin que monitoram outras regiões da bicamada lipídica, o SSL mostra variações da estrutura lipídica com a presença dos peptídeos (Fig. II.4.1a). Como esperado, por estar na interface da membrana, a baixa anisotropia do sinal de RPE do SSL em lipossomos de DMPG indica a alta mobilidade e baixa ordem desta região da bicamada. É interessante notar que, diferente dos marcadores SASL e PCSL, o espectro de RPE do SSL indica rotação preferencial em torno do eixo x do nitróxido (ver Apêndice 1), com $h_{+1} > h_0$. Os peptídeos parecem alterar a simetria de rotação da molécula, modificando a relação h_{+1}/h_0 (Fig. II.4.1b). Novamente, o efeito do MSH-I é semelhante ao do α -MSH, mas em maior escala. Da Fig. II.4.1b concluímos que o efeito dos peptídeos na cabeça polar de lipossomos de DMPG é semelhante àquele obtido com a diminuição de temperatura da amostra, podendo estar associado a aumento de ordem e/ou diminuição de mobilidade da região da interface. Entretanto, considerando que a ordem na região da interface água/lipídio deva ser muito baixa para temperaturas acima da T_m , foram calculados tempos de correlação rotacional, como descritos por Marsh (1989), onde é assumida a inexistência de potencial diretor. Os espectros foram analisados (ver Apêndice 1) de acordo com Bales (1989), com ajuste de cada uma das linhas (Halpern e col., 1993). Neste ajuste usamos os parâmetros apropriados para rotação preferencial em torno do eixo x (Marsh, 1989), apesar do MSH-I alterar esta tendência do marcador. Os valores dos tempos de correlação assim calculados devem ser vistos como valores aproximados, mas importantes na comparação dos efeitos dos dois peptídeos. Fica nítido na Fig. II.4.2a que o MSH-I causa um grande aumento no tempo de correlação rotacional relativo ao movimento em torno do eixo x, $\tau_{||}$ (compare com o pequeno aumento observado em DMPG puro, para temperatura decrescendo de 40 °C a 25 °C). Provavelmente nesta variação calculada de $\tau_{||}$ está embutida uma mudança da direção preferencial de movimento. Considerando o modelo simples aqui utilizado, com a decomposição do movimento do nitróxido em dois eixos, paralelo e perpendicular ao eixo x da molécula, é interessante observar que os valores de τ_{\perp} praticamente não se alteram na presença dos peptídeos, apesar de mostrarem uma pequena diminuição para altas temperaturas (Fig. II.4.2b). Portanto, o efeito global dos peptídeos parece ser um empacotamento da região da cabeça polar. Novamente, este efeito é específico

da interação de peptídeos com a superfície do DMPG, não tendo sido observado simplesmente com o aumento de íons em solução. O efeito de alta força iônica, 0.3 M de NaCl, chega a ser semelhante ao causado pelo α -MSH, mas é ainda muito menor do que o observado com o MSH-I (Fig II.4.2).

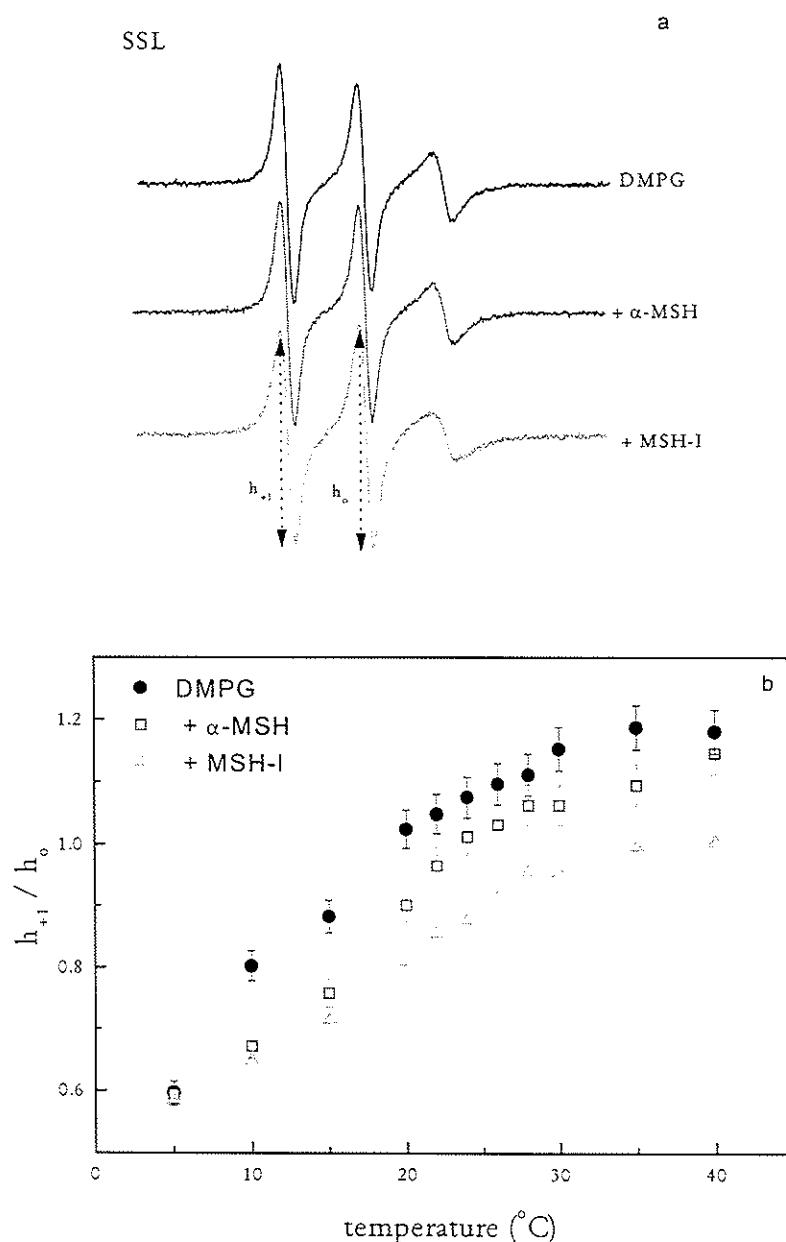


Fig. II.4.1. (a) Espectros de RPE de SSL em dispersões de 10 mM de DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo, T = 30 °C. (b) Variação com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 , medido diretamente nos espectros de RPE.

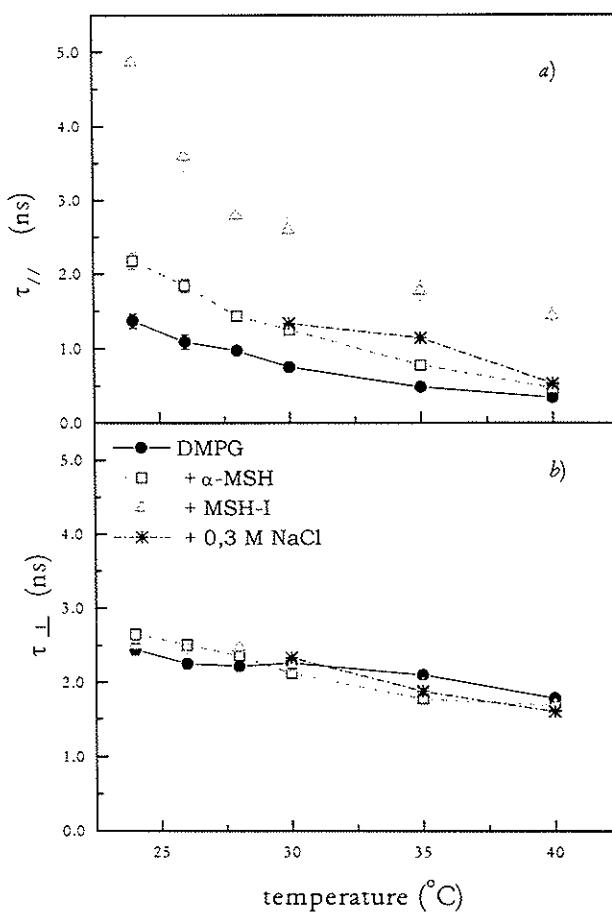


Fig. II.4.2. Variação com a temperatura dos tempos de correlação rotacional paralelo (τ_{\parallel}) e perpendicular (τ_{\perp}) ao eixo x do nitróxido (Apêndice 1), para SSL em dispersões de 10 mM DMPG, na ausência e presença de 1 mM de peptídeo, e com 0,3 M de NaCl.

É interessante comparar esses resultados com os obtidos com RMN de ^2H , com a utilização de lipídios deutériados na cabeça polar. O trabalho com RMN foi realizado na *University of Oxford*, em colaboração com o grupo de A. Watts, onde foram sintetizados os lipídios deutériados nas posições desejadas. Usamos DMPG deutério nos segmentos α , β e γ do glicerol da cabeça polar. Foram também feitos experimentos com lipossomos de DMPC deutério nas posições α , β sem que qualquer alteração causada pelos peptídeos pudesse ser detectada (Biaggi e col., 1996). É apontado como vantagem da utilização deste método, com relação à RPE de marcadores de spin, o fato do deutério perturbar menos a bicamada lipídica original. A alteração da estrutura original pela presença de moléculas repórter tem sido uma longa discussão na literatura. Inclusive, com relação à RMN de ^2H , alguns lipídios deutériados na cabeça polar não apresentam a pré-transição de fase, transição esta ainda pouco entendida, como mencionado no início, relacionada com a passagem de uma fase gel lamelar para lamelar-ondulada (Cevc, 1991).

Não vamos discutir aqui em detalhes os experimentos feitos com RMN, mas simplesmente colocaremos suas conclusões mais relevantes. As variações

observadas no desdobramento quadrupolar do segmento α , diminuição de $\alpha\text{-}\Delta\nu_Q$ na presença dos peptídeos, podem estar relacionadas a pequenas mudanças conformacionais na região da cabeça polar, ou, simplesmente, a variações na densidade superficial de carga (Seelig e col., 1987; Marrassi e MacDonald, 1991). (Nenhuma variação significativa foi observada no desdobramento quadrupolar dos segmentos β e γ). Comparando com os resultados obtidos com o marcador de spin SSL, estas pequenas mudanças poderiam acarretar as variações de h_{+1}/h_0 observadas. Por outro lado, a RMN de deutério mostrou que, em pequenas quantidades, o efeito do MSH-I é bem maior do que o do α -MSH, porém, para maiores concentrações dos dois peptídeos, as variações causadas em $\alpha\text{-}\Delta\nu_Q$ pelas duas moléculas são muito semelhantes. Portanto, a diferença seria simplesmente relacionada a diferentes coeficientes de partição para os dois peptídeos. Resultado diferente foi obtido com RPE de SSL. Nas condições usadas, variando-se a concentração de peptídeo até 20 % em moles da concentração lipídica, o efeito do MSH-I é sempre significativamente maior do que o do α -MSH (Fig. II.5.2). (Mais à frente vamos discutir partição usando medidas de RPE). Portanto, aparentemente, a RPE do SSL mostrou-se mais sensível do que a RMN de deutério para monitorar alterações na superfície de membranas de DMPG⁴.

Para avaliar as variações na mobilidade da cabeça polar foram feitas medidas de tempo de relaxação spin rede T_1 . A partir destes valores, para a aproximação de movimento rápido e isotrópico (Brown e col., 1979; Davis 1983), tempos de correlação para os movimentos rápidos segmentares, C-²H, foram estimados ($\tau_c \sim 6$ ns). Aqui, novamente, não se observou diferença nos tempos de correlação associados aos segmentos β e γ , mas foi observado um pequeno aumento (~ 20 %) do tempo de correlação do segmento α com a presença de ambos os peptídeos. Novamente, a RMN de ²H mostrou-se menos sensível do que a RPE do nitróxido situado na região da cabeça polar dos lipídios (aumento de $\tau_{11} > 100$ %, Fig. II.4.2a).

5. Efeitos de diferentes concentrações de peptídeo na membrana

Até agora, nos experimentos de RPE, comparamos os efeitos dos dois peptídeos em lipossomos de DMPG, mantendo fixa a concentração de lipídio (10 mM de DMPG) e a de peptídeo (1 mM), de tal maneira que temos 10 % em moles de peptídeo, com relação a concentração lipídica. Apesar desta ser uma concentração relativa bastante alta, a concentração de peptídeo de fato na membrana pode ser

⁴ É interessante lembrar que foi necessário que a concentração lipídica nos experimentos de RMN fosse 100 vezes maior do que aquela usada em RPE, e a relação peptídeo/lipídio até 5 %.

muito menor, dependendo da partição do peptídeo na fase lipídica. Faremos aqui um discussão preliminar sobre este assunto.

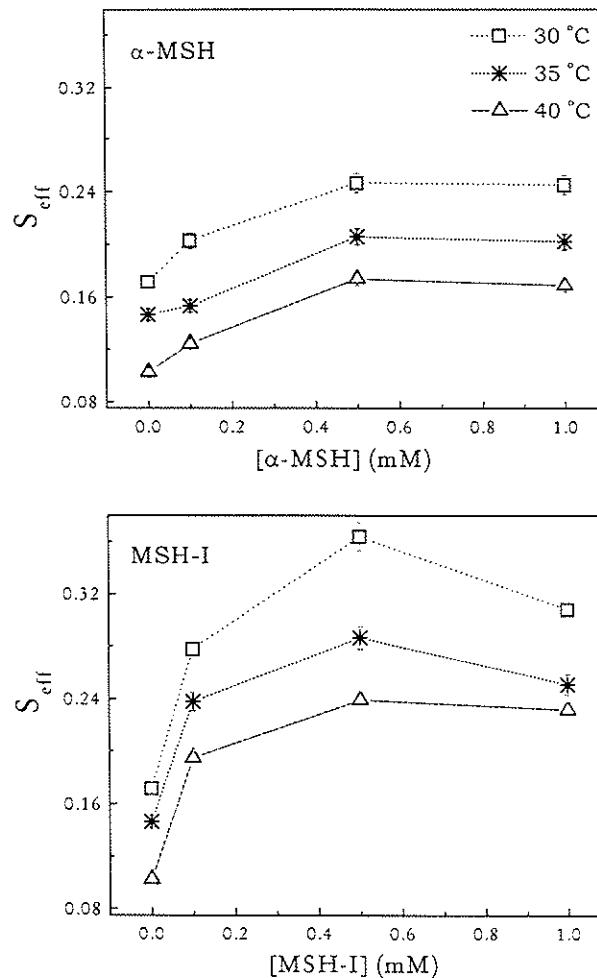


Fig. II.5.1. Variação com a concentração de peptídeo do parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}) do 12-SASL em dispersões de 10 mM de DMPG, para três temperaturas.

Na Fig. II.5.1 mostramos a variação do parâmetro S_{eff} do 12-SASL em dispersões de DMPG, para três temperaturas diferentes, em função da concentração de peptídeo. A concentração lipídica é mantida fixa em 10 mM, e a concentração de peptídeo varia até 1 mM. Foi baseado nesta figura, mostrando que há uma saturação do efeito de ambos os peptídeos em torno da concentração de 0.5 - 1.0 mM, que optamos por trabalhar com 1 mM de peptídeo nos experimentos comparativos mostrados acima. Entretanto, observamos mais tarde que a concentração saturante de peptídeo parece depender da posição do marcador de spin na bicamada. Apesar deste ser um estudo que ainda necessita maior atenção, na Fig. II.5.2 mostramos a porcentagem de variação dos parâmetros A_{max} do marcador 5-SASL, e h_{+1}/h_0 de SSL, em 10 mM DMPG com diferentes concentrações peptídicas. Vemos que para os dois marcadores que monitoram regiões próximas à

superfície da membrana, até 2 mM de peptídeo não é atingida a concentração saturante, apesar do efeito do MSH-I ser sempre maior do que o do α -MSH.

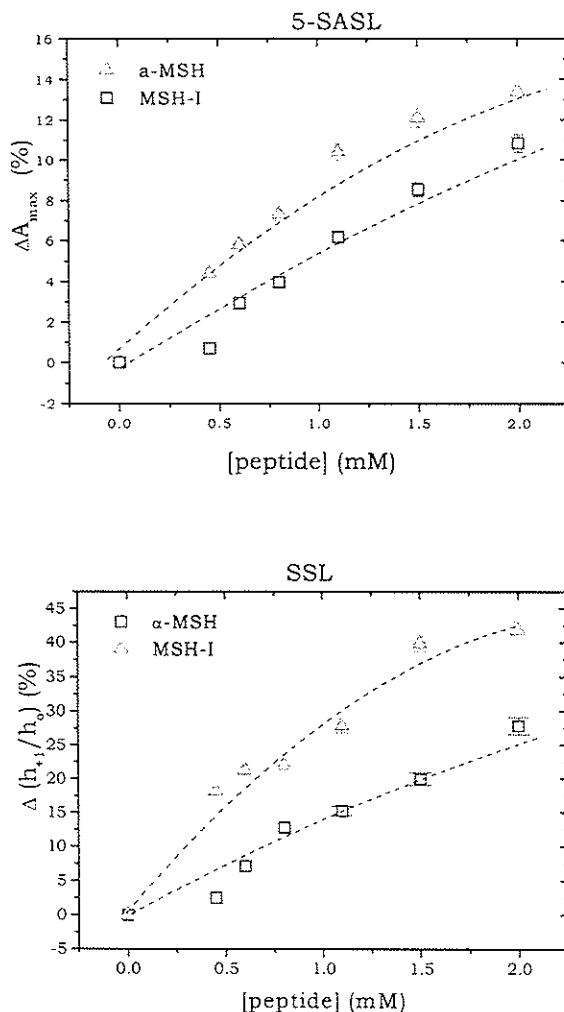


Fig. II.5.2. Porcentagem de variação de parâmetros dos espectros de RPE de 5-SASL (A_{max}) e SSL (h_{+1}/h_0) com a concentração de peptídeo presente, em 10 mM DMPG. T = 30 °C.

Estimativa da partição dos peptídeos em membranas de DMPG por RPE de marcadores de spin incorporados à bicamada lipídica

Para estimar um coeficiente de partição membrana/água para os dois peptídeos, utilizamos o método apresentado por Lissi e col. (1990), que parte da definição de coeficiente de partição

$$K_p = \frac{n_M / V_M}{n_{H_2O} / V_{H_2O}} = \frac{C_M}{C_{H_2O}}$$

onde n_M e n_{H_2O} são as concentrações de peptídeo na membrana e no meio aquoso, sendo a concentração total de peptídeo $n_T = (n_M + n_{H_2O})$. V_M e V_{H_2O} correspondem, respectivamente, aos volumes de membrana e de meio aquoso, sendo que fazemos

V_{H_2O} igual ao volume total da amostra. V_M é calculado assumindo a densidade da membrana igual a 1 g/ml.

O modelo considera que sistemas com diferentes concentrações de lipídio e peptídeo, mas que apresentam a mesma porcentagem de variação de um dado parâmetro que monitora a estrutura da membrana, têm a mesma concentração de peptídeo na membrana, isto é, mesmo valor de $C_M = n_M/V_M$.

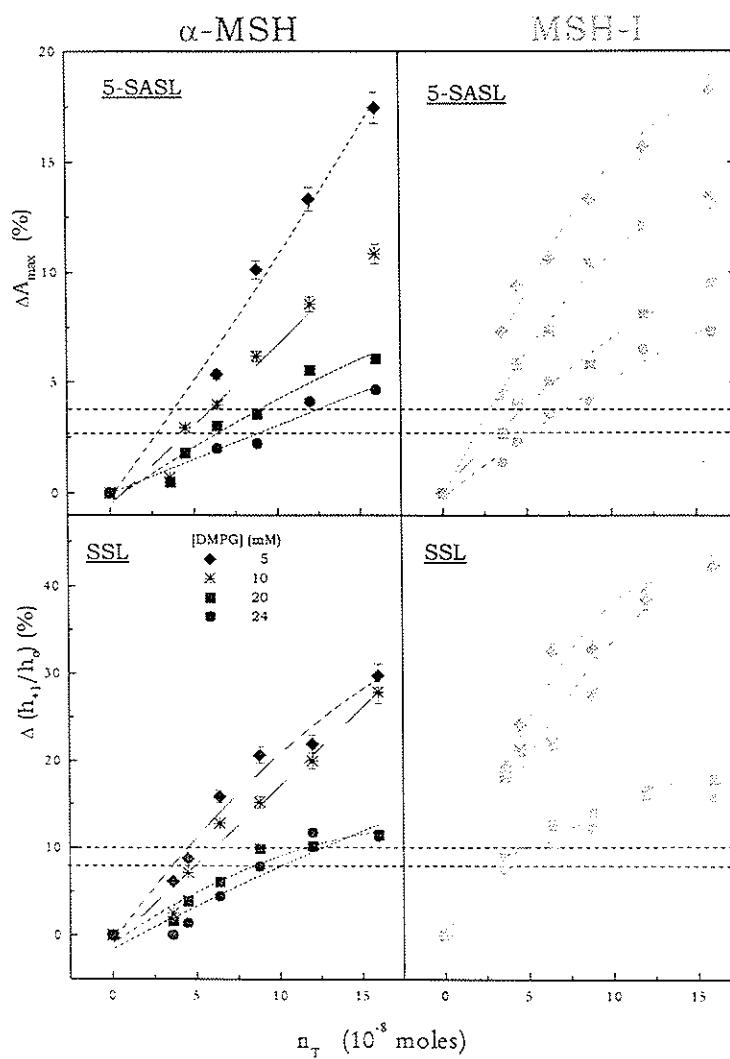


Fig. II.5.3. Porcentagem de variação de parâmetros dos espectros de 5-SASL (A_{max}) e SSL (h_{+1}/h_0) com a concentração de peptídeo (n_T = número de moles de peptídeo em $V_{H_2O} = 80 \mu\text{l}$, corresponde às concentrações: 0; 0,45; 0,6; 0,8; 1,1; 1,5; e 2 mM de peptídeo), em dispersões de DMPG a diferentes concentrações (Para $V_{H_2O} = 80 \mu\text{l}$, $V_M = 0,27; 0,55; 1,11$; e $1,32 \mu\text{l}$).

Na Fig. II.5.3 estão mostradas as variações dos parâmetros A_{max} do marcador 5-SASL, e h_{+1}/h_0 de SSL, para diferentes concentrações de DMPG e de peptídeo. Segundo o modelo apresentado acima, todos os pontos sob uma linha com a mesma ordenada na Fig. II.5.3 (por exemplo, as linhas tracejadas desenhadas)

corresponderiam a um valor fixo de C_M . Para achar K_p bastaria usar estes pontos fazendo um gráfico de n_T versus V_M . Isto porque

$$K_p = \frac{C_M}{(n_T - n_M) / V_{H_2O}}, \text{ portanto } n_T = \frac{C_M \cdot V_{H_2O}}{K_p} + C_M \cdot V_M$$

Os gráficos de n_T versus V_M , obtidos a partir dos pontos sob as linhas tracejadas, estão mostrados na Fig. II.5.4. Valores médios para K_p , com os dois marcadores de spin, foram calculados para os dois peptídeos, e estão apresentados na Tabela 1.

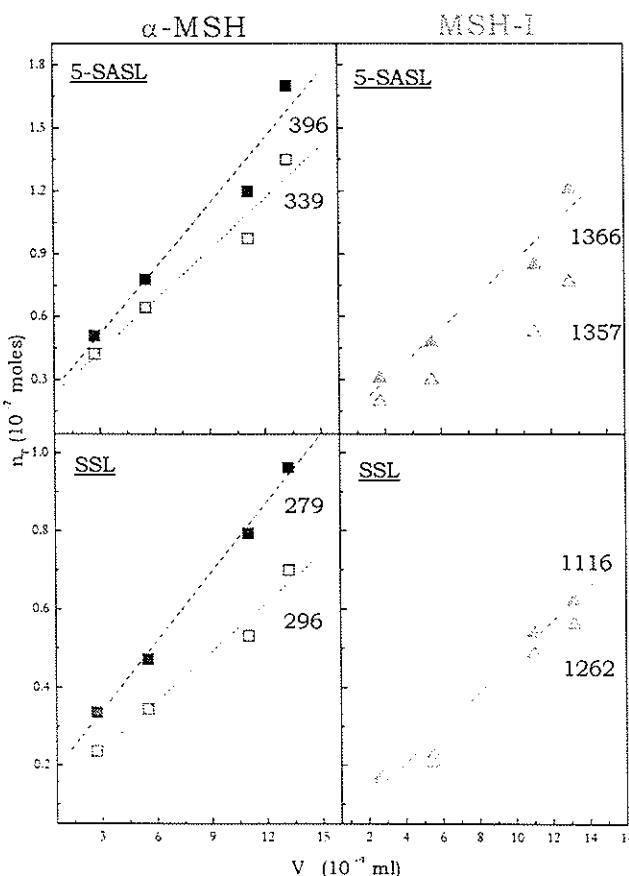


Fig. II.5.4. Gráficos feitos a partir dos valores de n_T e V_M sob as linhas tracejadas mostradas na Fig. II.5.3. As retas foram traçadas pelo método dos mínimos quadrados, e os coeficientes de partição resultantes (ver texto) estão assinalados.

Tabela II.5.1. Valores de coeficiente de partição (K_p) dos peptídeos em vesículas de DMPG, calculados a partir de marcadores de spin incorporados às membranas (RPE), e variação da intensidade de emissão fluorescente dos peptídeos (Fluor.).

peptídeo	K_p (RPE) ^a ($\times 10^3$)	K_p (Fluor.) ^a ($\times 10^3$)
α -MSH	$0,33 \pm 0,05$	29 ± 5
MSH-I	$1,28 \pm 0,12$	42 ± 15

^aVer texto.

O modelo discutido é certamente muito simplificado, pois assume que K_p independe das concentrações lipídicas e peptídicas, não levando em conta o número de sítios disponíveis para o ligante (Apêndice 2). Portanto, o modelo descrito acima deveria ser aceitável sempre que a concentração de peptídeo na membrana fosse muito menor do que a concentração lipídica. Apesar deste, talvez, não ser o caso para todas as concentrações lipídicas e peptídicas usadas aqui ([peptídeo] variando de 0,5 até 2 mM, e [DMPG] variando de 5 até 24 mM), é importante observar que retas são boas aproximações para os gráficos de n_T versus V_M (Fig. II.5.4).

Também não é considerada a parte eletrostática das interações entre os vários compostos presentes. Portanto, os valores dos coeficientes de partição calculados são valores comparativos para os dois peptídeos, que possuem a mesma carga. Isto é, não foi considerado que a concentração peptídica na superfície da membrana é muito maior do que a concentração total de peptídeo em solução, devido às cargas negativas na superfície dos lipossomos de DMPG. Também não é levado em conta a interação repulsiva entre os peptídeos.

Além das simplificações do modelo já apontadas, nós encontramos alguns outros problemas e restrições quanto a sua utilização, mesmo somente para comparar as partíciones do α -MSH e MSH-I. Observamos que, com alguns outros marcadores de spin, não foi possível a obtenção de retas no gráfico n_T versus V_M , a partir de diferentes conjuntos de pontos, que gerassem valores de K_p semelhantes entre si, e, portanto, confiáveis. Esta é uma discussão ainda em aberto para nós.

Estimativa da partição de peptídeos em membranas de DMPG por fluorescência

(Parte do trabalho de doutorado de Roberto M. Fernandez em colaboração com Armando S. Ito, e o técnico Roberto H. Lopez)

Dadas as questões colocadas acima, referentes ao método utilizado, demos início ao trabalho de comparar os valores encontrados por RPE com valores obtidos com a variação da fluorescência do triptofano presente nos peptídeos. Esta última, parece ser uma boa técnica para o cálculo da partição de um fluoróforo entre dois meios com polaridades bem diferentes, pois é sabido que a intensidade de fluorescência de uma molécula (e posição da banda de emissão) é função do meio onde ela se encontra (Lakowicz, 1983). Apresentamos aqui alguns resultados preliminares interessantes, onde calculamos a partição dos peptídeos por fluorescência, nas mesmas condições (pH, força iônica e temperatura) usadas por RPE. (Os experimentos foram feitos como descrito em Macedo e col., 1996). A variação da intensidade de fluorescência do triptofano presente nos dois peptídeos, com a concentração de DMPG, I/I_{min} , está mostrada na Fig. II.5.5, sendo I_{min} o valor

na ausência de lipídio. Os pontos experimentais foram ajustados com curvas, de acordo com dois modelos: número infinito de sítios de ligação (A2.15); número finito de sítios de ligação (A2.7). Estes modelos estão discutidos no Apêndice 2.

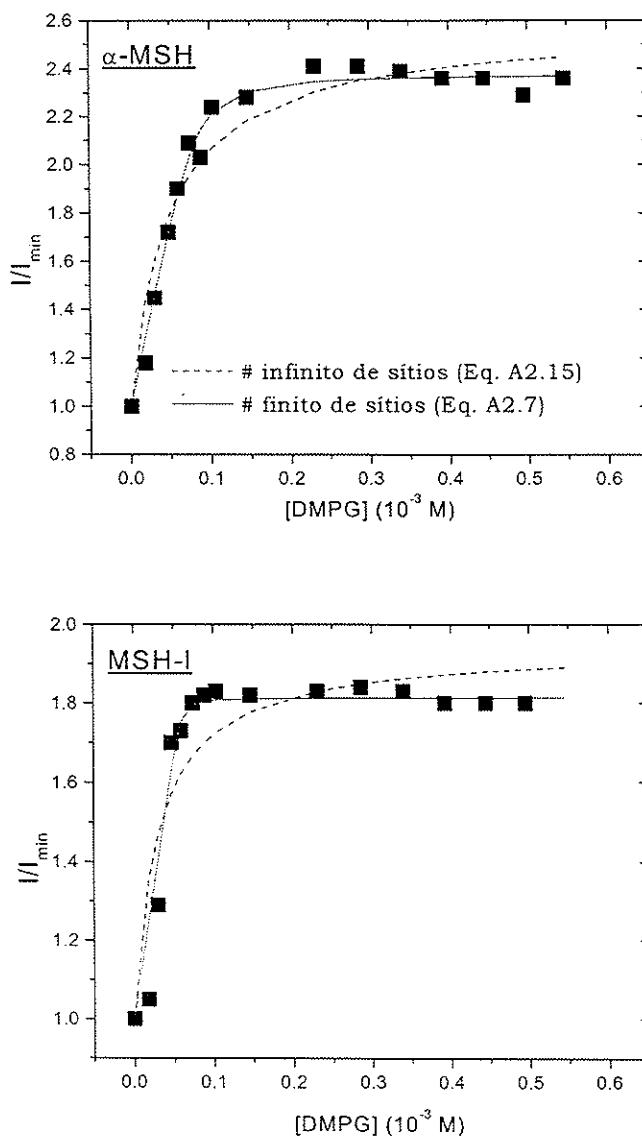


Fig. II.5.5. Variação relativa da intensidade de fluorescência dos peptídeos com a concentração de DMPG no meio (■). Os ajustes dos dados experimentais (curvas nos gráficos) foram feitos de acordo com as equações citadas do Apêndice 2.

Para os dois peptídeos, fica claro que não podemos considerar o modelo mais simples, que assume K_p constante, mas sim o modelo onde o número de sítios de ligação é restritivo. Portanto, fica difícil a direta comparação com os dados de RPE. Entretanto, mesmo se quiséssemos compará-los com os valores de K_p obtidos do melhor ajuste do modelo mais simples, esses valores são aproximadamente duas ordens de grandeza maiores do que os obtidos com RPE (Tabela II.5.1), apesar de ambos os métodos indicarem maior partição na membrana para o análogo MSH-I.

Ainda que, todavia, não tenhamos uma explicação para as diferenças observadas, é de grande interesse nosso a sua compreensão, não só pelo estudo específico dos peptídeos melanotrópicos, mas como um procedimento geral de cálculo de partição de pequenos compostos em agregados anfifílicos. (É bom lembrar que no estudo de moléculas não fluorescentes o método com marcadores de spin, ou marcadores fluorescentes de membrana, será o único disponível.)

Teremos que levar em conta que as concentrações lipídicas e peptídicas usadas para os dois métodos são muito diferentes, e descobrir se isto poderia estar afetando as medidas de partição. Gostaríamos de poder usar um mesmo método em um intervalo grande de concentrações lipídicas e peptídicas. Poderíamos, por exemplo, usar a metodologia empregada nos experimentos de RPE, porém medindo a anisotropia de fluorescência de uma sonda tipo DPH (difenilhexatrieno). Com esta sonda esperamos ser possível varrer um intervalo grande de concentrações de DMPG e peptídeo. Isto porque ela é sensível em muito baixas concentrações, permitindo o uso de baixa concentração lipídica e, como pode ser irradiada em comprimentos de onda altos ($\lambda \approx 350$ nm), pode-se aumentar a concentração de DMPG sem grandes problemas com a distorção do espectro de fluorescência devido ao espalhamento de radiação (ver Apêndice 3).

Para efeito de interpretação da constante de partição k , em termos de diferença dos potenciais químicos intrínsecos do peptídeo na água e na membrana (Apêndice 2), será necessário fazer as correções considerando a presença de cargas elétricas, tanto na membrana, como nos peptídeos.

Podemos destacar dois aspectos importantes do conhecimento das constantes de partição dos peptídeos na membrana. O primeiro relacionado com a comparação das afinidades do hormônio e seu análogo mais ativo com a fase lipídica. Este aspecto poderia explicar a maior permanência do MSH-I em tecidos, mesmo depois de sucessivas lavagens (Hadley e col., 1985). Ou também, a maior atividade de MSH-I pode depender, pelo menos em parte, dele estar disponível em maior quantidade para seu receptor proteico na membrana.

O segundo aspecto relaciona-se com a utilização dos coeficientes de partição para o cálculo das concentrações de peptídeos que estão de fato na membrana, e a partir daí comparar os efeitos dos dois peptídeos quando presentes nas mesmas concentrações na membrana. Na Fig. II.5.6 estão mostradas as variações de A_{max} de 5-SASL em vesículas de DMPG, na presença dos dois peptídeos, em função da concentração de "peptídeo ligado", assumindo-se que suas partições em DMPG são dadas pelos valores de K_p calculados por RPE (Tabela II.5.1). O importante resultado

desta figura é: para a mesma concentração na membrana o efeito do MSH-I ainda é maior do que o do peptídeo natural. É importante notar que, caso usássemos os valores de K_p obtidos por fluorescência, esta diferença seria ainda maior, pois as constantes de partição dos dois peptídeos obtidas por fluorescência são mais próximas entre si (Tabela II.5.1). Este resultado leva-nos a concluir que o análogo causa maior perturbação à bicamada lipídica do que o peptídeo natural, muito provavelmente porque o primeiro penetra mais profundamente (ou mais extensamente) na membrana. Isto viria reforçar a discussão que fizemos relativa aos resultados obtidos com os marcadores a diferentes profundidades (Fig. II.2.7), apesar dos questionamentos então apontados.

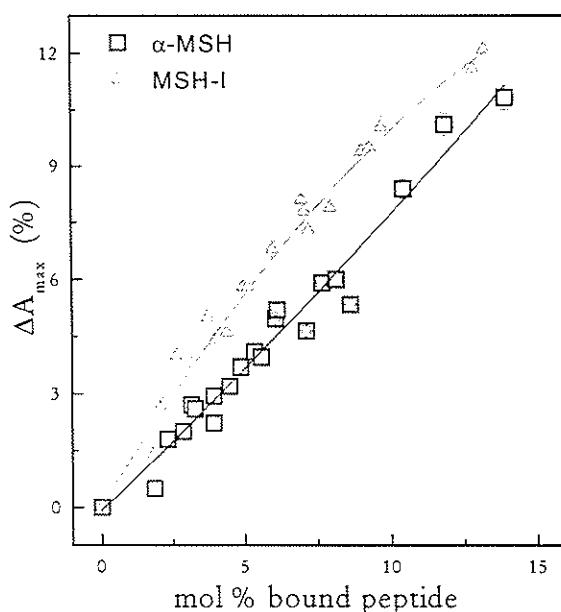


Fig. II.5.6. Variação de A_{max} de 5-SASL incorporado em vesículas de DMPG com a concentração de peptídeo na membrana, estas últimas calculadas a partir dos dados experimentais da Fig. II.5.3, usando os coeficientes de partição calculados da Fig. II.5.4 (Tabela II.5.1).

6. Dicroísmo circular dos peptídeos

Foi nosso interesse complementar os estudos de RPE e fluorescência – referentes às alterações da estrutura de agregados anfifílicos pela presença dos peptídeos, e às modificações do espectro de fluorescência dos peptídeos – com medidas de dicroísmo circular (CD). Esta última técnica dá informações sobre as possíveis conformações dos peptídeos nos vários ambientes (Fasman, 1996).

Na Fig II.6.1 mostramos alguns resultados obtidos. Vemos que tanto α -MSH como MSH-I, em solução (Fig II.6.1a e b), apresentam uma larga banda negativa em torno de 200 nm, característica de estrutura randômica. Entretanto, quando colocados no solvente TFE (2,2,2-trifluoroetanol), um indutor de α -hélice, eles têm

comportamentos diferentes: o hormônio α -MSH muito mais facilmente adquire a estrutura de α -hélice (bandas negativas em torno de 208 e 222 nm). Quando em presença de vesículas de DMPG, ou micelas de SDS, ambos os peptídeos mostram uma ligeira mudança de conformação, com o aparecimento de uma pequena porcentagem de estrutura β , evidente pela banda negativa em torno de 220 nm (Fig II.6.1c e d).

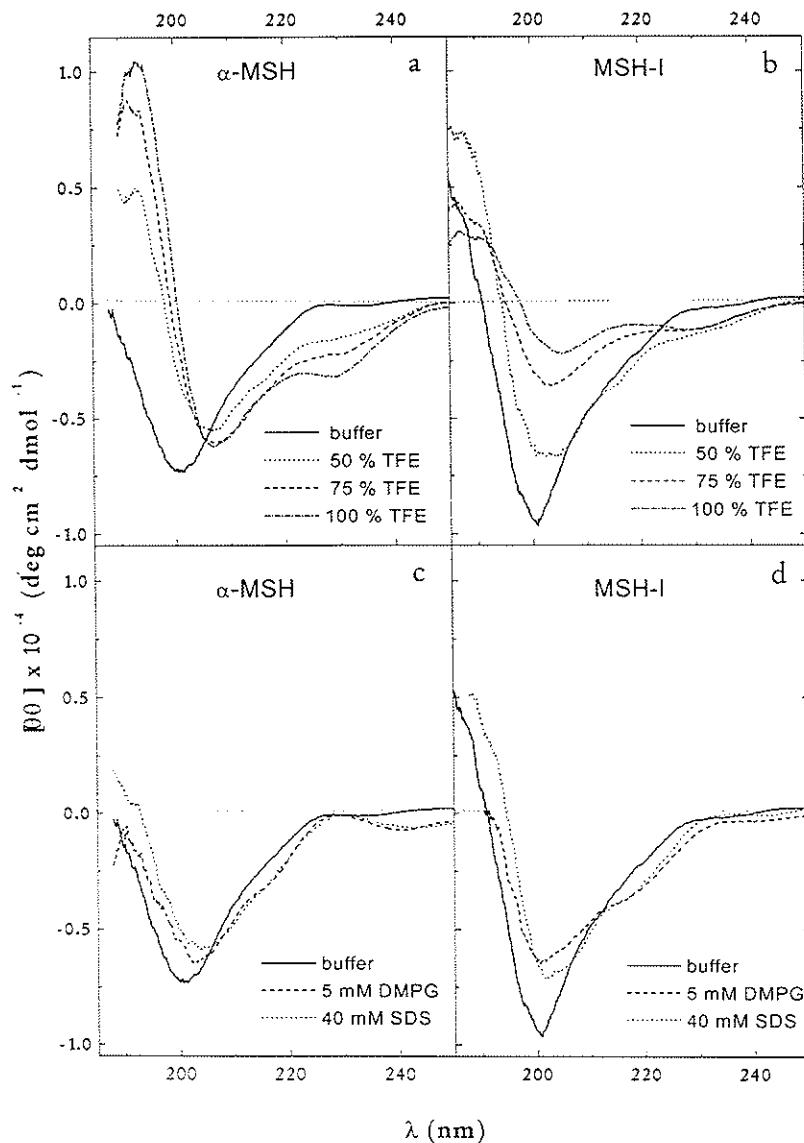


Fig. II.6.1. Espectros de dicroismo circular dos peptídeos em solução aquosa, em meios com diferentes concentrações de TFE, e em dispersões de DMPG e de SDS.

Vários estudos sugeriram uma estrutura não ordenada para o α -MSH em meio aquoso. Por RMN, Hruby e col. (1988) propuseram a estrutura randômica para o peptídeo natural, e sugeriram que análogos mais potentes tendo a *L*-Phe⁷ substituída pelo *D*-enantiômero, como o MSH-I, tenderiam a estabilizar uma

estrutura β . Esta dobra β foi identificada com a maior atividade biológica do análogo, sendo que análogos cílicos do α -MSH, superpotentes, contendo uma ponte S-S, foram sintetizados, confirmado a previsão acima (Hruby e col., 1993). Entretanto, o espectro de CD do MSH-I em solução aquosa não indica a presença de dobra- β . Podemos somente dizer que a facilidade de adquirir α -hélice é maior para o α -MSH do que para o MSH-I.

Poderíamos tentar relacionar os resultados de CD com os cálculos estruturais feitos por Jacchieri e Ito (1995; 1998, comunicação pessoal), onde foram considerados os vários rotâmeros da cadeia lateral do Trp. Foi visto que ambos os peptídeos tendem a apresentar estrutura β , mas a barreira de energia para a interconversão de diferentes famílias conformacionais é muito menor para o α -MSH do que para o MSH-I. Isto explicaria a grande flexibilidade do peptídeo natural em solução, inclusive com a possibilidade de formação de hélice α em solvente indutor desta estrutura.

Cálculos recentes com dinâmica molecular (Pascutti e col., 1998) também sugerem que a estrutura do α -MSH em meio de alta constante dielétrica ($\epsilon = 80$, água) seja muito flexível, sem estabilização de qualquer conformação particular. Neste trabalho a bicamada lipídica foi simulada como uma faixa de constante dielétrica 2 em um meio de $\epsilon = 80$, e o método das imagens foi usado para descrever os efeitos de polarização induzidos nas interfaces pelas cargas atômicas do peptídeo. Foi encontrado que o α -MSH tem preferência pelo interior da membrana (faixa de $\epsilon = 2$), com a estabilização da região central do peptídeo (posições 6 a 9) em uma conformação definida, com uma dobra β na Arg da posição 8⁵. Foi apontado que esta mudança de conformação do peptídeo, na passagem do meio aquoso para a membrana, estaria de acordo com as variações de tempo de vida do estado excitado do Trp observadas por fluorescência (Ito e col., 1993). Apesar de em pequena porcentagem, nossos resultados de CD acusam a presença de dobra β para as melanotropinas em contato com agregados anfifílicos, embora não haja distinção entre os dois peptídeos. Este resultado, juntamente com a sugestão da necessidade de uma estrutura β para a atividade dos peptídeos, reforça a idéia da relevância da fase lipídica na atividade biológica dos mesmos, sendo a bicamada um catalisador que favoreceria uma determinada conformação da molécula.

⁵ É importante ter em mente que no modelo simplificado de dois meios representados simplesmente por diferentes valores de ϵ (Pascutti e col., 1998), o peptídeo penetra totalmente na bicamada lipídica, o que não é o esperado levando-se em conta seu perfil de hidrofilicidade, e os resultados aqui apresentados de RPE.

III. Algumas propriedades da melatonina e de sua interação com agregados anfifílicos

(Parte dos trabalhos de Mestrado de Cláudio S. Shida e Ernane J.X Costa, IFUSP. Shida e col., 1994; Costa e col., 1995; Costa e col., 1997)

1. Apresentação

A melatonina (5-metoxi-N-acetyltryptamina), sintetizada pela glândula pineal, é uma molécula derivada do triptofano, relativamente pequena e neutra (Fig. III.1.1).

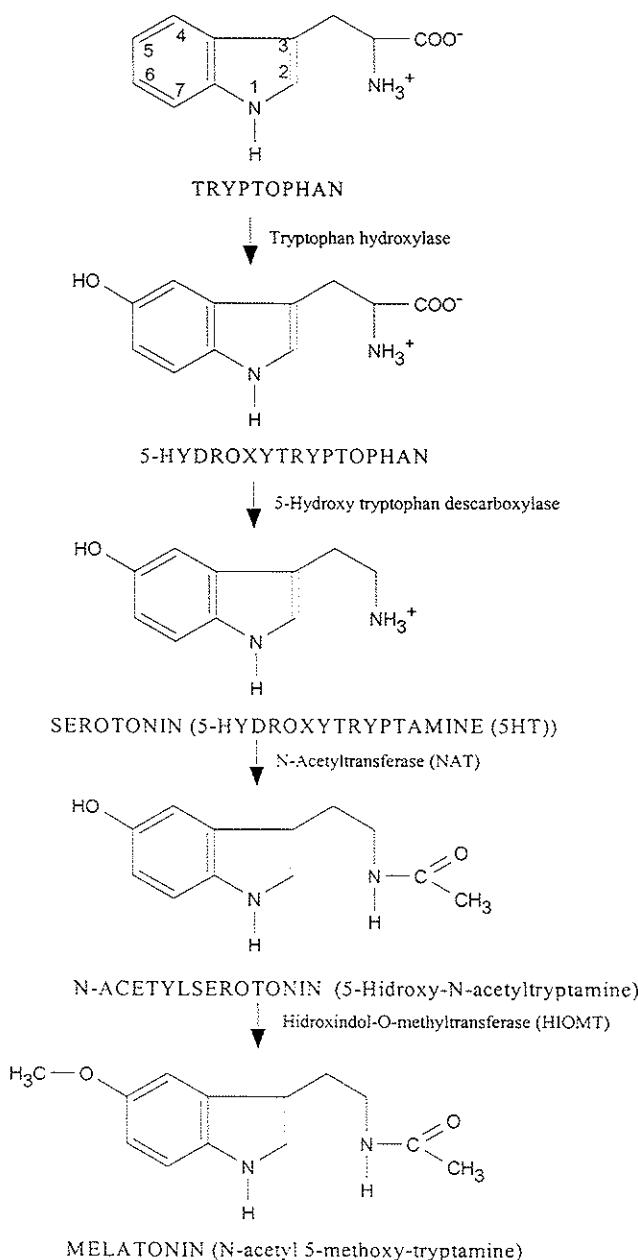


Fig. III.1.1. Esquema da biosíntese da melatonina (Sugden, 1989)

Há muitos anos sabe-se que ela está ligada ao ciclo circadiano (Reiter, 1980), tendo máxima produção na ausência de luz. Como mencionado na Introdução, este hormônio desempenha múltiplos papéis no organismo, alguns certamente dependentes de receptores proteicos nas membranas celulares, mas, aparentemente, também atravessa as membranas e atua no interior das células.

2. Solubilidade da melatonina em meio aquoso

O estudo da solubilidade da melatonina em meio aquoso foi muito interessante, no sentido de ter sido uma descoberta muito simples, mas relevante para a compreensão de propriedades biológicas deste hormônio. Como mencionamos em I, a melatonina era considerada insolúvel em meio aquoso. Sua preparação era sempre feita a partir de uma solução concentrada onde o hormônio liofilizado era dissolvido em solvente orgânico, por exemplo etanol, e depois diluído em tampão aquoso até a concentração desejada. Quando começamos a estudar a interação da melatonina com anfifílicos, acreditando que ela fosse insolúvel em meio aquoso, preparamos a melatonina juntamente com o anfifílico, da maneira tradicional de preparo de amostras de anfifílicos com moléculas hidrofóbicas: todos os compostos hidrofóbicos são dissolvidos em clorofórmio; este solvente é evaporado, sob fluxo de nitrogênio, formando-se um filme na parede do tubo de ensaio; a amostra é deixada no vácuo por pelo menos quatro horas, para a completa evaporação do solvente; o filme de anfifílico junto com outras moléculas é suspenso no tampão aquoso desejado, obtendo-se os agregados anfifílicos com a molécula hidrofóbica no seu interior.

Resolvendo estudar os possíveis agregados formados pela própria molécula de melatonina, fizemos a preparação descrita acima, mas somente com melatonina. Descobrimos, assim, que a molécula de melatonina não era insolúvel em meio aquoso, podendo ser perfeitamente dissolvida até a concentração de 5×10^{-3} M em tampão hepes, 10 mM, pH 7.4. Mostramos que a solução de melatonina preparada por esse método era estável por mais de dez dias, e que apresentava espectros de absorção ótica e fluorescência semelhantes àqueles apresentados pelas soluções preparadas a partir da solubilização do hormônio em etanol (Shida e col., 1994). Em colaboração com Ana Castrucci vimos que a atividade biológica da melatonina preparada pelo novo método era idêntica àquela apresentada pela molécula preparada pelo método tradicionalmente utilizado na literatura (Fig. III.2.1). Ficou, portanto, mostrado, que a crença na "insolubilidade" da melatonina em meio aquoso era devida à dificuldade da solubilização dos microcristais da molécula liofilizada. Uma vez dissolvidos os cristais, o solvente orgânico evaporado, e as

moléculas expostas à água em um filme fino na superfície do vidro, a melatonina é bastante solúvel em meio aquoso.

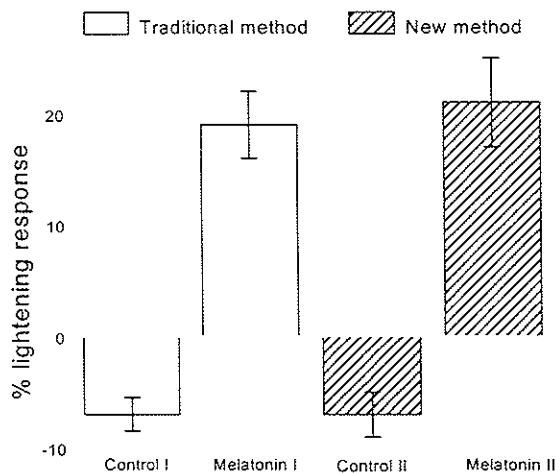


Fig. III.2.1. Efeito em pele de *Bufo ictericus* (Ferroni e Castrucci, 1987) da melatonina preparada pelo método aqui descrito e pelo método tradicional.

Portanto, sendo solúvel em água, a melatonina pode ser sintetizada na glândula pineal e transportada pela corrente sanguínea a todos os tecidos, sem a necessidade de transportadores proteicos. Além disso, nosso trabalho mostrou a possibilidade de preparar em laboratório soluções de melatonina sem qualquer contaminação com solvente orgânico, o que poderia estar causando problemas em alguns experimentos biológicos (Castrucci, comunicação pessoal).

Mais tarde, descobrimos que era possível solubilizar a melatonina simplesmente deixando o pó de melatonina em meio aquoso no ultra-som de banho, não sendo necessário fazer filmes com o hormônio. O trabalho descrito acima foi publicado em um revista biológica especializada (*J. Pineal Research*), onde foi muito elogiado, exemplificando uma contribuição simples e relevante que surgiu da colaboração de pesquisadores com diferentes formações¹.

3. Permeabilidade de bicamadas lipídicas à melatonina

A permeabilidade das células à melatonina tinha sido sugerida na literatura (Reiter e col., 1993; Tan e col, 1993) mas nunca demonstrada. Utilizando um experimento simples de diálise, baseado em método descrito pelas professoras do IQUSP, Ohara Augusto e Ana Carmona-Ribeiro (Augusto e Carmona-Ribeiro, 1989), para utilização

¹ No trabalho publicado sugerimos que a outras moléculas biologicamente relevantes, consideradas hidrofóbicas, fosse aplicada a mesma metodologia usada por nós na solubilização da melatonina.

em curso de graduação em bioquímica, mostramos que a melatonina atravessa bicamadas lipídicas.

Vamos chamar a atenção para alguns pontos importantes do experimento, sem entrarmos em todos os detalhes (descritos em Costa e col., 1995). A idéia do experimento é a utilização de dispersões de vesículas lipídicas contendo melatonina dentro e fora das vesículas. Essa dispersão forma-se naturalmente ao adicionarmos o solvente aquoso, contendo melatonina, a um filme lipídico. A amostra é colocada em saco de diálise, permeável a moléculas pequenas, como a melatonina, e impermeável aos grandes lipossomos, e deixada equilibrar em um recipiente contendo o solvente aquoso, com agitação. Caso as vesículas lipídicas sejam permeáveis à melatonina, espera-se que depois de um tempo longo, com várias trocas de solvente do recipiente, atinja-se uma situação em que se tenha pouca melatonina dentro do saco de diálise. O saco de diálise é então aberto, os lipossomos desfeitos com a ajuda de um detergente (usamos SDS), e a concentração restante de melatonina dosada por seu espectro de absorção ótica ou fluorescência.

Por serem muito estáveis, foram utilizados nos experimentos lipossomos de asolecitina de soja. Usamos como referência a impermeabilidade da asolecitina ao azul de metileno (AM). Na Tabela III.3.1 vemos que em torno de 57% das moléculas de AM ficam retidas nos lipossomos de asolecitina, após prolongada diálise. Pelo volume interno dos lipossomos, era este o resultado esperado caso os lipossomos fossem impermeáveis à molécula. Na tabela comparamos este resultado com aquele obtido com uma amostra de AM em solução, sem a presença das vesículas, onde vemos que somente 3% ficaram retidas no saco de diálise. Os resultados com melatonina mostram que, na ausência ou presença de vesículas, menos de 6% das moléculas ficam retidas dentro do saco de diálise, indicando que os lipossomos são bastante permeáveis à melatonina.

Tabela III.3.1. Absorção ótica do azul de metileno (AM) e da melatonina antes e depois da diálise.

Amostra ^a	Absorbância antes da diálise	Absorbância depois da diálise
AM + asolecitina	0,76	0,43 (57%)
AM	0,76	0,02 (3%)
melatonina + asolecitina	1,24	0,07 (6%)
melatonina	1,24	0,01 (1%)

^aAs absorbâncias foram medidas a 660 nm e 290 nm, para o AM e melatonina, respectivamente, com caminhos óticos de 0,1 cm e 0,5 cm. Os dados mostrados são os valores médios de três experimentos.

O experimento descrito acima, mostrando a permeabilidade de bicamadas lipídicas à melatonina, sendo também muito simples, veio responder uma pergunta há muito feita na literatura de melatonina. Pela sua relevância para os

pesquisadores da área de melatonina, também foi publicado na revista especializada, J. Pineal Research.

4. Interação da melatonina com bicamadas lipídicas

(Em colaboração com Amando S. Ito)

Desde o início do trabalho com a melatonina era nosso interesse estudar vários aspectos da interação da melatonina com bicamadas lipídicas: se, e como, a melatonina altera a estrutura das bicamadas lipídicas; qual a sua localização preferencial na bicamada; se, e como, a membrana altera a estrutura da melatonina; e qual a partição da melatonina no sistema água/membrana. Algumas destas questões estão respondidas abaixo. (A menos que seja especificado, em todo o trabalho a melatonina está em tampão hepes, 10 mM, pH 7,4).

Alterações na membrana lipídica vistas por marcadores de spin

Marcadores de spin posicionados no interior de bicamadas lipídicas de DMPC e DMPG, como o 5- e 12-SASL, o 6-PCSL, e o CSL, têm seus espectros de RPE muito pouco alterados com a presença de até 50% em moles de melatonina (com relação à concentração lipídica – usaremos sempre essa notação). Uma pequena diminuição de A_{max} foi observada com os marcadores 5-SASL e 6-PCSL em DMPG na fase gel em presença de 20 e 50% de melatonina, indicando uma pequena fluidificação da bicamada lipídica com a presença do hormônio. Entretanto, com o marcador SSL, que monitora a interface membrana/água, nítidas alterações podem ser vistas no espectro do marcador de spin, tanto em DMPG como em DMPC, como mostra a variação do parâmetro h_{+1}/h_0 (relação das amplitudes das linhas de campo baixo e médio, $m_l = +1$ e 0, respectivamente) na presença do hormônio (Fig. III.4.1). É interessante reparar que as alterações em h_{+1}/h_0 provocadas pela melatonina (50%) são relevantes mesmo quando comparadas às obtidas na presença do hormônio melanotrópico α -MSH (10%) (Fig. II.4.1). (Para comparar as quantidades de peptídeo e de melatonina de fato na superfície da membrana seria necessário a utilização dos coeficientes de partição das duas moléculas, o que discutiremos mais adiante).

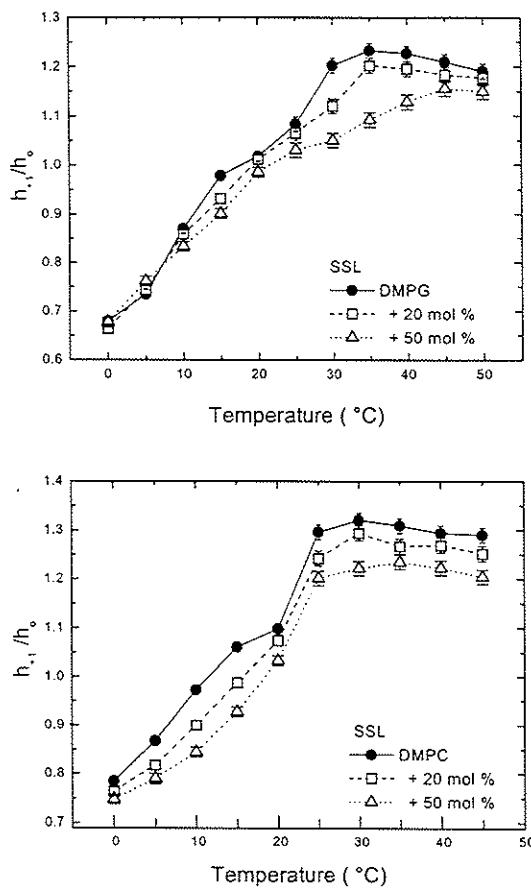


Fig. III.4.1. Variação com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 do SSL incorporado em vesículas de DMPG e DMPC, para 20 e 50 mol % de melatonina (com relação ao lipídio). [lipídio] = 10 mM, [SSL] = 0,1 mM.

Sendo a melatonina uma molécula pequena, seria possível que sua presença no interior da membrana lipídica não modificasse muito a mobilidade/ordem das cadeias hidrocarbonadas, principalmente para temperaturas acima da T_m , e caso sua localização fosse na região central da bicamada. (Essa posição foi sugerida para pequenos hidrocarbonetos aromáticos por Sanioto e Schreier, 1975). Portanto, a melatonina poderia estar próxima ao centro da bicamada e não alterar muito o espectro de marcadores de spin no interior da membrana. Entretanto, devido à significativa variação do espectro de RPE do marcador SSL, e às pequenas variações do espectro de fluorescência da melatonina em presença de vesículas lipídicas (mostrado abaixo), pensamos que o posicionamento preferencial da melatonina seja na superfície da membrana lipídica, como será discutido mais adiante.

A partir dos espectros de RPE do SSL foram calculados os tempos de correlação rotacional paralelo e perpendicular ao eixo x do nitróxido. Como discutido no Apêndice 1, este cálculo de tempos de correlação é uma simplificação, onde se assume que o movimento preferencial da molécula seja em torno do eixo x do nitróxido. Diferentemente da discussão feita com os peptídeos melanotrópicos

(Fig. II.4.2), é difícil afirmar que a melatonina diminui, ou aumenta, a fluidez da região da cabeça polar. Isto porque, ao mesmo tempo em que ela causa um aumento de τ_{\parallel} , tanto em DMPG como DMPC, ela diminui τ_{\perp} (Fig. III.4.2), sendo os dois efeitos pequenos (quando comparados às variações com a temperatura), e semelhantes.

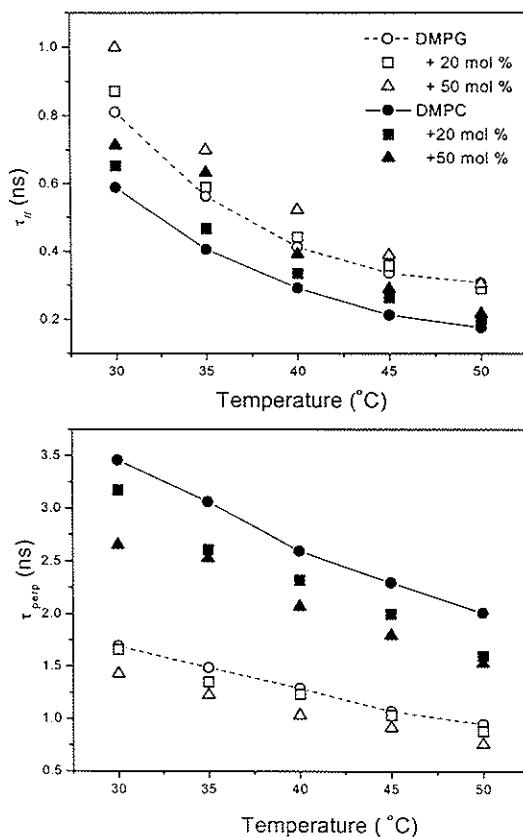


Fig. III.4.2. Efeito da melatonina nos tempos de correlação do SSL, em suspensões de 10 mM de DMPG e DMPC, para diferentes temperaturas.

Indicação do posicionamento da melatonina na membrana lipídica pela variação de seu espectro de fluorescência

Na Fig.III.4.3 estão mostrados os espectros de fluorescência da melatonina em presença de excesso de DMPC². Como visto com o marcador de spin SSL, a melatonina interage com a membrana tanto acima (30 °C) como abaixo (15 °C) da temperatura de transição de fase do lipídio. Observa-se que a variação em seu espectro de fluorescência em presença do anfifílico é pequena. Em todas as medidas de fluorescência apresentadas neste trabalho (incluindo os espectros da Fig. III.4.3)

² Mais abaixo será visto que na concentração de 2,5 mM de DMPC praticamente toda a melatonina está associada às vesículas.

foram feitas as correções necessárias considerando-se o espalhamento da luz incidente e emitida (Apêndice 3).

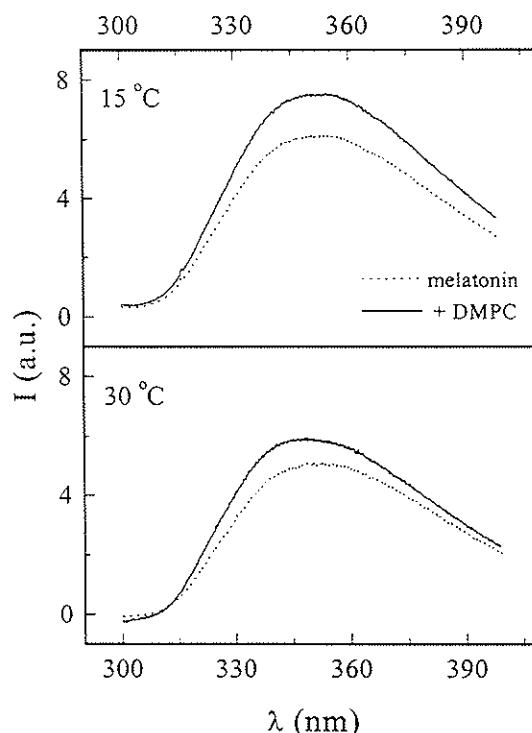


Fig. III.4.3. Espectros de emissão de fluorescência da melatonina (10^{-5} M) em DMPC ($2,5 \times 10^{-3}$ M), para o lipídio na fase gel (15 °C) e na fase líquido cristalina (30 °C). $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm.

Sabendo que a constante dielétrica na membrana lipídica varia, aproximadamente, de 80, na superfície, até 2, no centro da bicamada, para que possamos estimar a posição da melatonina na bicamada lipídica é interessante comparar seu espectro de fluorescência em DMPC com aqueles obtidos em meios de diferentes polaridades. Na Fig. III.4.4a, onde estão mostrados os espectros de emissão da melatonina em diferentes misturas água/etanol, vemos que o hormônio é bastante sensível ao ambiente onde se encontra. Na Fig. III.4.4b estão as variações de sua intensidade de fluorescência (integral sob a curva de emissão, com relação à fluorescência em água, I/I_{\min}), e da posição do máximo de emissão, em função da constante dielétrica do meio. As constantes dielétricas das misturas água/etanol, em volume, foram calculadas a partir dos valores tabelados para diferentes misturas, em peso, de água/etanol (Hartshorn e col., 1929), com 1,00 e 0,80 g/cm³, para as densidades da água e etanol, respectivamente. Considerando que em presença de excesso de DMPC (Fig. III.4.3) obtemos $I/I_{\min} \approx 1,25$ e $\Delta\lambda \approx 3$ nm, podemos concluir que a melatonina está, em média, localizada próximo à interface membrana/água, em região de constante dielétrica em torno de 75, reforçando a discussão feita no item anterior com os marcadores de spin. Esses resultados são

também confirmados pela pequena variação da anisotropia de fluorescência do hormônio em presença de DMPC (de 0,002 a 0,033 em excesso de DMPC).

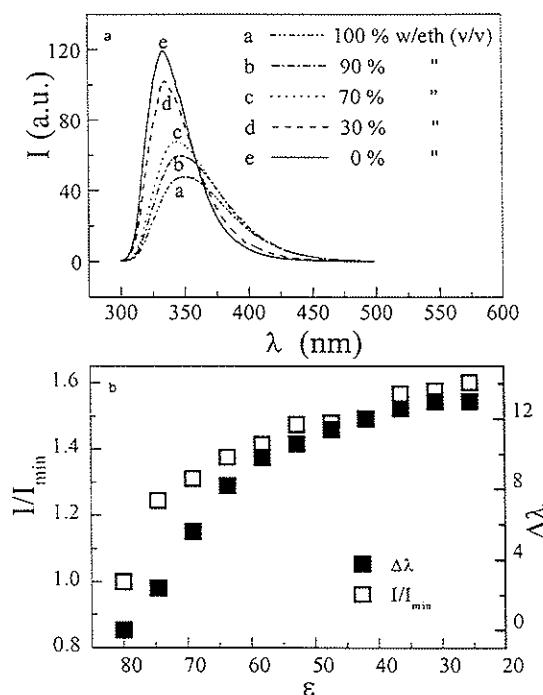


Fig. III.4.4. (a) Variação do espectro de emissão de fluorescência da melatonina com a concentração relativa água/etanol. (b) Dependência da intensidade relativa de fluorescência da melatonina (área sob a curva), e da variação do máximo de emissão fluorescente ($\Delta\lambda$), com a polaridade do meio (I_{min} = intensidade no meio aquoso). As constantes dielétricas (ϵ) dos vários meios foram calculadas como descrito no texto. $\lambda_{ex} = 290$ nm.

Supressão da fluorescência da melatonina por marcadores de spin em diferentes profundidades da bicamada: um modelo dinâmico para o hormônio na membrana.

É, em geral, aceito na literatura que, a grosso modo, a posição do fluoróforo no interior da membrana pode ser estimada usando-se supressores posicionados em diferentes profundidades da bicamada: a posição do fluoróforo será mais próxima daquele que for mais efetivo na supressão de sua emissão (ver, por exemplo, Louro e col., 1994; Macedo e col., 1996; e como já discutido em II.2, com relação aos peptídeos melanotrópicos). Portanto, considerando todos os resultados experimentais discutidos acima, que indicam que a melatonina posiciona-se, em média, em região próxima à superfície da bicamada lipídica, ficamos surpresos ao descobrir que marcadores de spin lipídicos marcados no 12º carbono da cadeia acila são mais efetivos em suprimir a fluorescência da melatonina do que aqueles marcados no 5º carbono (Fig.III.4.5).

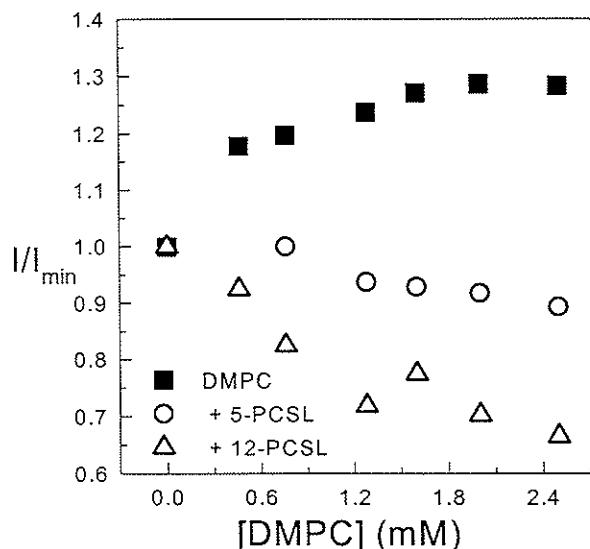


Fig. III.4.5. Supressão da fluorescência da melatonina pelos marcadores de spin 5- e 12- PCSL, para diferentes concentrações de DMPC. $[DMPC]/[PCSL] = 9$. $\lambda_{ex} = 290$ nm, $\lambda_{em} = 350$ nm. $I = I_{min}$ para $[DMPC] = 0$.

Lembrando que a melatonina atravessa a bicamada lipídica (III.3), é interessante analisar nossos resultados experimentais considerando a flutuação vertical dos marcadores de spin de cadeia acila. Foi mostrado que o nitróxido posicionado no carbono 12 "enxerga" uma região da membrana bastante mais ampla do que aquele no 5º carbono (Godici e Landsberger, 1974; Ellena e col., 1988; Yin e col., 1988). Portanto, é possível pensar que, mesmo a melatonina situando-se preferencialmente próxima à interface, como ela está atravessando a bicamada, o 12-PCSL seria melhor supressor do que o 5-PCSL por varrer uma região mais ampla do que o marcador, mais fixo, próximo à superfície (5-PCSL).

Com relação à distribuição média de melatonina na membrana lipídica, com sua preferencial localização na superfície, podemos fazer uma analogia extremamente simplificada com uma partícula sujeita a um potencial harmônico clássico, centrado no meio da bicamada. A partícula oscila entre as superfícies da membrana com uma distribuição de probabilidade dada por:

$$P(x) = \frac{B}{\sqrt{2/m}\sqrt{E - (kx^2/2)}}$$

sendo B uma constante de normalização, k e m característicos da "mola", e E a energia total (cinética + potencial). Portanto, a partícula é, predominantemente, encontrada nos valores máximos de x^2 , correspondendo às superfícies da bicamada. De maneira mais geral, qualquer potencial com um mínimo no centro da bicamada (devido a interações hidrofóbicas, viscosas, etc.), poderia resultar em maior densidade de moléculas de melatonina próxima às interfaces da membrana.

Partição da melatonina em membranas lipídicas

A variação da intensidade de fluorescência da melatonina com a concentração de DMPC foi usada para o cálculo de uma constante de partição da molécula nos dois meios (Apêndice 2). Como mostrado na Fig. III.4.6, a dependência de I/I_{\min} com [DMPC] pode ser bem reproduzida por uma curva dada por A2.15, no limite para número infinito de sítios de ligação, onde se calcula um coeficiente de partição K_p .

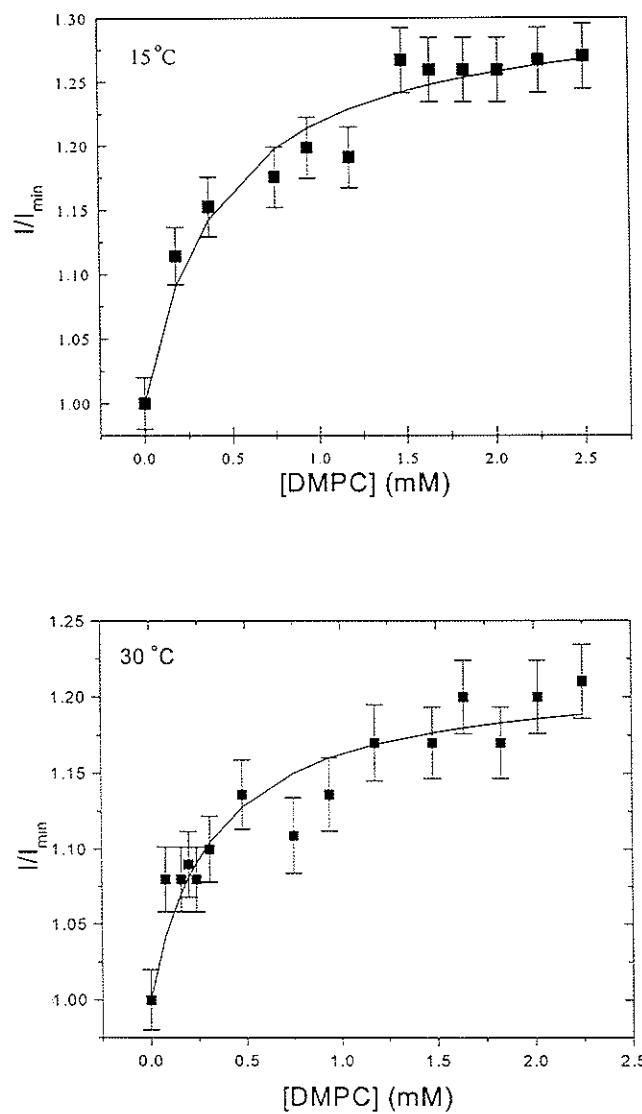


Fig. III.4.6. Variação da intensidade relativa de fluorescência da melatonina com a concentração de DMPC. Os dados experimentais (■) foram ajustados por curvas teóricas, como discutido no texto. $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$. $I = I_{\min}$ para $[\text{DMPC}] = 0$.

Como discutido no Apêndice 2, nos casos em que é possível fazer um bom ajuste com a equação A2.15, estamos tratando de um problema simples de partição

do ligante (melatonina) em dois meios (água e membrana), onde podemos usar o modelo de gás ideal para o ligante nos dois meios. Os valores de K_p resultantes dos melhores ajustes dos dados experimentais (Fig. III.4.6), nas fase gel (15°C) e líquido cristalina (30°C) do lipídio, foram $(3,1 \pm 0,5) \times 10^3$ e $(4,3 \pm 0,8) \times 10^3$. Esses são valores bastante altos, comparados, por exemplo, com os encontrados para os peptídeos melanotrópicos, depois da correção para efeitos eletrostáticos, $K_p \approx 3$ (calculado de Macedo e col., 1996, usando $K_p \approx K_a/0,7$ e $K_a \approx 1/nk$, como mostrado no Apêndice 2). Muito menor é também a partição da melatonina em clorofórmio/água, onde encontramos $K_p \approx 20 \pm 3$, medindo por fluorescência, ou absorção ótica, diretamente o hormônio nos dois solventes em contato, para diferentes concentrações relativas (v/v) dos solventes.

Semelhante ao que foi feito para os peptídeos melanotrópicos (II.5) também foi calculado um coeficiente de partição da melatonina em vesículas de DMPC, acima da T_m , com o marcador de spin SSL, usando-se a metodologia de Lissi e col. (1990). Como descrito anteriormente, a partir de gráficos do efeito causado por diferentes concentrações de hormônio em diferentes concentrações de lipídio (Fig. III.4.7a), faz-se um gráfico do número total de moles de peptídeo (n_T) em função do volume de membrana (V_M), para uma dada porcentagem de efeito (Fig. III.4.7b), de onde se calcula K_p . (Para medir o efeito da melatonina na bicamada lipídica usamos a variação de h_{+1}/h_0). Considerando 4% e 6% de efeito na Fig. III.4.7a encontramos valores de K_p que variam de 70 a 100 (Fig. III.4.7b). Apesar do erro significativo no experimento, evidente na aproximação dos pontos da Fig. III.4.7b por retas, o valor encontrado de K_p é duas ordens de grandeza menor do que o obtido com o experimento de fluorescência ($K_p \approx (4,3 \pm 0,8) \times 10^3$ a 30°C). Obtivemos semelhante discrepância entre os valores calculados pelos dois métodos com os peptídeos melanotrópicos (III.5).

Como mencionamos no início, seria muito interessante obter um valor confiável para K_p , pois permitiria o cálculo da quantidade de melatonina de fato na membrana (n_M) nos experimentos de RPE (Fig. III.4.1): isto é, quando temos na amostra 50% em moles de melatonina, qual a relação melatonina/lipídio na membrana que causa o efeito que detectamos?

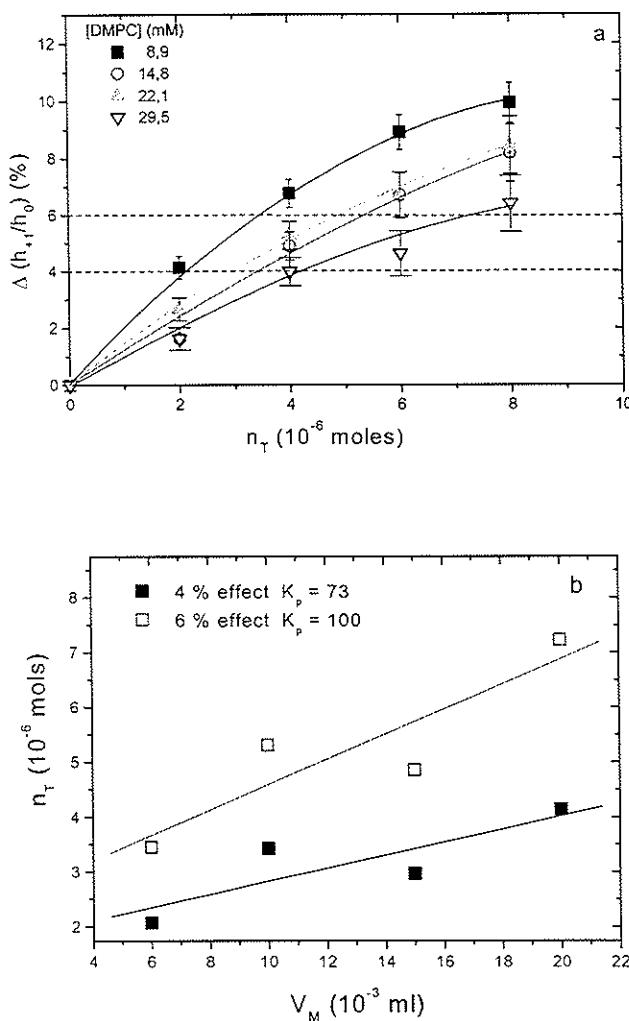


Fig. III.4.7. (a) Porcentagem de variação do parâmetro $h+1/h_0$ de SSL com a concentração de peptídeo (n_T = número de moles de melatonina em $V_{H_2O} = 1$ ml, corresponde às concentrações de melatonina: 2, 4, 6 e 8 mM), em dispersões de DMPC a diferentes concentrações (para $V_{H_2O} = 1$ ml, $V_M = 6, 10, 15$ e 20×10^{-3} ml). (b) Gráfico feito a partir dos valores de n_T e V_M sob as duas linhas tracejadas em (a), correspondendo a 4% e 6% de variação. As retas foram traçadas pelo método dos mínimos quadrados, e os coeficientes de participação resultantes estão dados.

Tendo-se o valor de K_p , a partir da equação A2.11, $K_p = \frac{n_M / V_M}{n_{H_2O} / V_{H_2O}}$, e

$$\text{assumindo } V_{H_2O} = 1 \text{ ml, pode-se calcular } n_M = \frac{K_p V_M n_T}{1 + K_p V_M}.$$

Nos experimentos de RPE a concentração de DMPC usada foi 10 mM, e a concentração máxima de melatonina, 5 mM (50%). Para 1 ml de volume total, considerando 1 g/ml a densidade da membrana, $V_M = 6,74 \times 10^{-3}$ ml e $n_T = 5 \times 10^{-6}$ moles. Obviamente, necessitamos de K_p para o cálculo de n_M . Deixamos na tabela abaixo, para compreensão futura, os resultados obtidos com os dois diferentes

valores, resultados dos experimentos de fluorescência da molécula e RPE de marcadores de spin incorporados à membrana.

Tabela III.4.1. Coeficientes de partição (K_p) resultantes de dois experimentos diferentes, e os cálculos associados do número de moles de melatonina na membrana (n_M)^a e da porcentagem (em moles) de melatonina na membrana com relação ao lipídio, para $[DMPC] = 10 \text{ mM}$ e $[\text{melatonina}] = 5 \text{ mM}$.

Experimento	K_p	n_M	% de melatonina na membrana (com 50% na amostra)
Fluorescência da melatonina	$4,3 \times 10^3$	$4,8 \times 10^{-6}$	48
RPE de marcadores de spin na membrana	85	$1,8 \times 10^{-6}$	18

^aOs cálculos estão feitos para $V_{H_2O} = 1 \text{ ml}$.

Considerando a discussão acima, só podemos concluir que a melatonina apresenta uma partição relativamente alta em vesículas lipídicas, quando comparada com outras moléculas (ver peptídeos melanotrópicos), desde que os valores das constantes de partição sejam obtidos pela mesma metodologia.

IV. Dispersões lipídicas carregadas: estudos com o DMPG

(Parte dos trabalhos de Mestrado e Doutorado de Karin A. Riske, IFUSP. Riske e col., 1997; Riske e col., 1998)

1. Apresentação

Apesar do DMPG ser muito utilizado como sistema modelo, surpreendemos em descobrir que suas propriedades termotrópicas não eram totalmente conhecidas. Era sabido que se formavam estruturas especiais em dispersões de DMPG incubadas a baixa temperatura ou para o lipídio dispersado em água (Epand e Hui, 1986; Gershfeld e col., 1986; Salonen e col., 1989; Epand e col., 1992; Zhang e col., 1997). Baseado nestas informações, em nossos trabalhos sempre utilizamos vesículas preparadas no mesmo dia, e tamponadas em pH 7.4. Entretanto, dois trabalhos na literatura (Salonen e col., 1989; Heimburg e Biltonen, 1994) mencionavam, sem muito aprofundamento, a existência de uma faixa de força iônica e concentração para o DMPG (preparado no mesmo dia), na qual este lipídio apresentava um comportamento atípico com a variação de temperatura, caracterizado por calorimetria diferencial de varredura (DSC) como uma larga região de transição (Heimburg e Biltonen, 1994) ou duas transições de fase¹ (Salonen e col., 1989). A região entre a temperatura de transição principal T_m , e a pós-transição T_{post} , (assim denominada por Salonen e col., 1989) era caracterizada por baixa turbidez da amostra e alta viscosidade (Heimburg e Biltonen, 1994). Enquanto a transição principal de fase estava relativamente bem descrita, como a transição da fase gel (P_g , lamelar ondulada²), onde as cadeias hidrocarbonadas estão estendidas (ligações *trans*) e inclinadas com relação à normal à bicamada, para a fase líquido cristalina (L_a , lamelar), muito mais fluida (com várias ligações *gauche*), nada era sabido sobre a pós-transição. Na fase gel a bicamada lipídica está altamente empacotada, quando comparada com a fase líquido cristal, apresentando menor área superficial por cabeça polar de lipídio, sendo que as cadeias acilas apresentam-se extremamente ordenadas e muito próximas umas das outras, favorecendo as interações atrativas de van der Waals. A espessura da bicamada

¹ Identificamos uma transição de fase (termotrópica) da bicamada lipídica, por um pico na variação da capacidade térmica medida em função da temperatura da amostra. Muitas vezes transições térmicas de fase são também identificadas através da variação brusca de algum parâmetro experimental que esteja monitorando a organização das cadeias acila.

² Apesar de não estar muito claro na literatura, foi visto que o DMPG apresenta uma pré-transição, em temperatura mais baixa do que T_m ($T_p \approx 15.5$ °C, ver Heimburg e Biltonen, 1994), a qual é em geral caracterizada pela passagem de uma fase lamelar ordenada, L_g , para uma fase lamelar ordenada ondulada P_g . (ver, p. ex., Cevc, 1991).

lipídica é maior na fase gel do que na fase líquido cristalina, e também ligeiramente maior é a densidade da membrana (para caracterização de lipídios ver, p. ex., Gennis, 1989)

Resolvemos investigar as propriedades termotrópicas do DMPG com espalhamento de luz, que mede características macroscópicas da amostra, e compará-las com estudos com marcadores de spin, que monitoram regiões específicas, microscópicas, do agregado lipídico. Nos trabalhos descritos abaixo, a não ser que seja especificado, DMPG foi usado na concentração de 10 mM, e o tampão foi Hepes 10 mM, pH 7,4.

2. Espalhamento de luz

Espalhamento de luz a 90°

Fomos levados ao estudo com espalhamento de luz pois observávamos que as amostras de DMPG com as quais trabalhávamos nos experimentos de interação peptídeo-lipídio, eram turvas abaixo de T_m , ficavam quase transparentes acima de T_m , até uma certa temperatura, onde voltavam a ficar turvas (além da literatura previamente citada). O espalhamento de luz da amostra a 90° foi medido em um fluorímetro (Fig. IV.2.1), confirmando quantitativamente o que observávamos. É interessante notar que existem variações grandes e bruscas na intensidade da luz espalhada, tanto em T_m como em T_{post} (manteremos este nome para a 2^a transição de fase), sendo as duas transições reversíveis, mas a região de temperatura mais alta menos estável, com T_{post} diminuindo com o tempo de incubação da amostra.

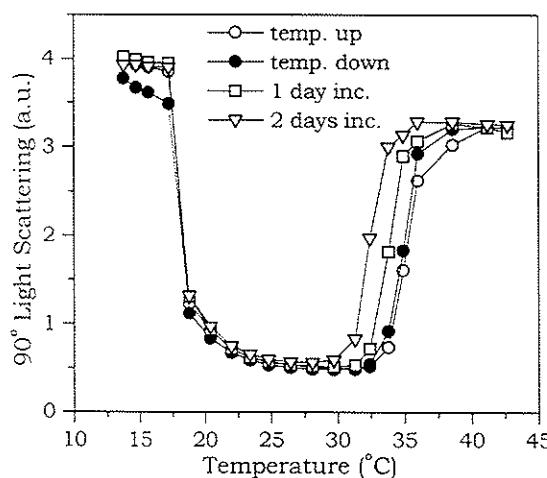


Fig. IV.2.1. Variação com a temperatura do espalhamento de luz a 90° para 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4. Experimento feito subindo (O) e descendo (●) a temperatura, e com a amostra incubada a 35 °C por 1 dia (□) e dois dias (▽).

Tendo o espalhamento de luz mostrado-se uma técnica bastante sensível para medidas de temperatura de transição de fase resolvemos usá-la na caracterização de amostras de DMPG em diferentes forças iônicas. Várias são as informações que obtemos da Fig. IV.2.2 e Tabela IV.2.1.

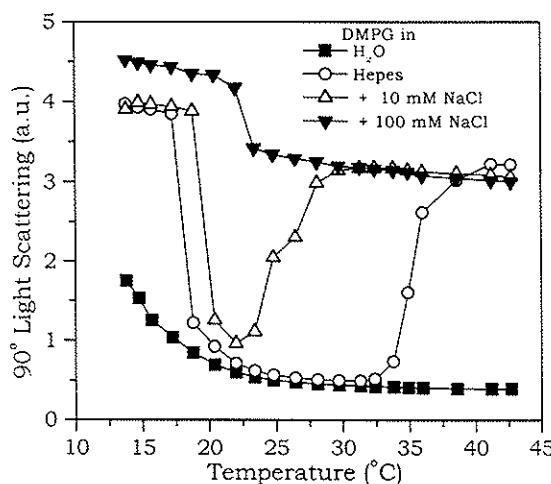


Fig. IV.2.2. Variação com a temperatura do espalhamento de luz a 90° para 10 mM DMPG em água e em 10 mM Hepes pH 7,4, sem o acréscimo de sal e com 10 e 100 mM de NaCl.

Tabela IV.2.1. Temperaturas de transição de fase gel-liquido cristal (T_m) e pós-transição (T_{post}), para amostras de DMPG em várias forças iônicas (n_i)

DMPG em	n_i (mM)	T_m (°C)	T_{post} (°C)
H_2O	0,0025 ^a	~ 16	-
Hepes	4 ^b	18,0	35,0
+ 10 mM NaCl	14	19,5	26
+ 100 mM NaCl	104	22,5	-

^a n_i da água corresponde a $[H^+]$ em pH = 5,6. ^b n_i em Hepes corresponde a $[Na^+]$ que foi colocada no meio para o ajuste de pH em 7,4.

- Como esperado, a temperatura de transição gel-liquido cristal T_m , é dependente da força iônica do meio (n_i), aumentando para amostras de maior força iônica. Este resultado foi obtido com outras técnicas por Cevc e col. (1980), que mostraram que para 2 M de NaCl a T_m do DMPG atinge o valor máximo de 29 °C. O aumento de T_m é explicado (Jähnig, 1976; Träuble e col., 1976; Cevc e col., 1980) pela estabilização da fase gel (onde as cadeias hidrocarbonadas estão mais compactadas) devido à blindagem das cargas negativas do DMPG pelos íons presentes no meio, diminuindo a repulsão eletrostática das cabeças polares.
- Observamos que T_{post} é fortemente dependente da força iônica do meio, diminuindo com n_i , sendo que não observamos a pós-transição tanto em amostras com muito baixa força iônica (DMPG em água), como em amostras com força iônica relativamente altas (~ 100 mM de NaCl ou maiores). O perfil de variação da intensidade de luz espalhada com a temperatura de DMPG + 100 mM de NaCl é muito semelhante ao obtido com dispersões do lipídio neutro DMPC.

Em ambos os casos, a pequena variação de espalhamento observada em T_m pode ser atribuída à variação do índice de refração da amostra n , ou do seu incremento com a concentração lipídica $\partial n / \partial c$, na passagem da fase gel para a líquido cristal (Riske e col., 1997).

- iii. Dispersões de DMPG em água (Mille-Q, pH 5,6, $n_i = 0,0025$) espalham muito pouca luz, em todas as temperaturas estudadas. Voltaremos a discutir este caso mais adiante.
- iv. Resultados semelhantes aos mostrados na Fig. IV.2.1 foram obtidos com DMPG em tampão fosfato, mostrando que os efeitos observados não são específicos de Hepes. Além disso, outros íons apresentaram resultados semelhantes, mas não idênticos aos obtidos com NaCl, com pequenas diferenças na temperatura de pós-transição (Riske e col., 1997). Este é um estudo que ainda necessita maior atenção.

Espalhamento de luz a vários ângulos

(Em colaboração com Wayne Reed e Mário Politi)

Para melhor compreensão das características das partículas presentes nas amostras nas diferentes temperaturas, foram feitas medidas da luz espalhada por duas amostras, DMPG em Hepes e em H₂O, a diferentes ângulos, nas três regiões de temperatura: abaixo da T_m (15 °C), entre T_m e T_{post} (22 °C) e acima da T_{post} (40 °C). O espalhamento de luz foi analisado segundo o modelo de Debye-Rayleigh (ver, p. ex., Hiemenz, 1984; van Holde, 1971 e referências lá citadas), onde se assume flutuações locais de densidade de soluto na amostra aquosa, com interações entre moléculas, expressas na expansão da densidade na série do Virial até o 2º termo, A_2 . Como as dimensões das partículas espalhadoras não são muito menores do que o comprimento de onda da luz incidente (λ), para considerar as interferências de ondas espalhadas pelos diferentes sítios da mesma partícula é necessário a incorporação de um fator de forma da partícula, $P(\mathbf{q})$, onde \mathbf{q} é o vetor espalhamento ($\mathbf{q} = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$), n o índice de refração do solvente e θ o ângulo de espalhamento):

$$\frac{Kc}{I(\mathbf{q})} = \frac{1}{\langle M_w \rangle P(\mathbf{q})} + 2A_2c \quad (\text{IV.2.1})$$

Na expressão acima $I(\mathbf{q})$ é a intensidade da luz espalhada em um certo ângulo θ , c é a concentração lipídica total (g/ml), e, para luz polarizada verticalmente, $K = (4\pi^2 n^2 (\partial n / \partial c)^2) / N_A \lambda^4$, onde N_A é o número de Avogadro e usa-se para $\partial n / \partial c$ um valor médio $\approx 0,12 \text{ ml g}^{-1}$. $P(\mathbf{q}) \approx 1 - (q^2 \langle R_g^2 \rangle_z) / 3$ (para $q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \ll 1$), sendo $\langle R_g^2 \rangle_z$ um valor médio (*z-average*) quadrático dos raios de giração de todas as partículas

presentes. Isto porque consideramos um sistema polidisperso formado por várias espécies de massas moleculares M_i e concentração c_i (g/ml), e o que medimos é

$$\langle M_w \rangle = \frac{1}{c} \sum_i c_i M_i \quad \text{e} \quad \langle R_g^2 \rangle_z = \frac{1}{\langle M_w \rangle} \sum_i \frac{c_i}{c} M_i \langle R_g^2 \rangle_i \quad (\text{IV.2.2})$$

Na aproximação usada podemos escrever a Eq. IV.2.1

$$\frac{Kc}{I(q)} = \frac{1}{\langle M_w \rangle} \left(1 + \frac{q^2 \langle R_g^2 \rangle_z}{3} \right) + 2A_2 c \quad (\text{IV.2.3})$$

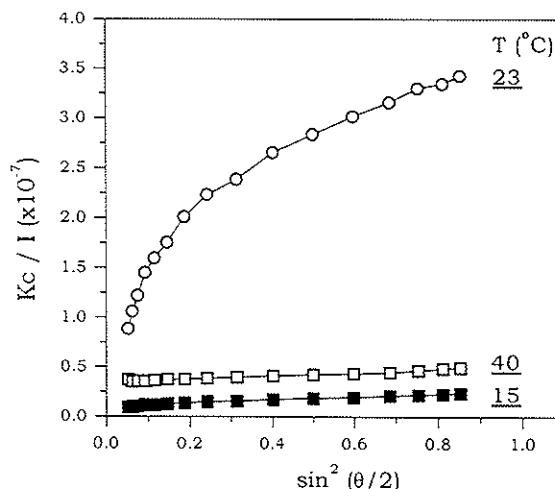


Fig. IV.2.3. Kc/I (ver Eq. IV.2.3) em função do $\sin^2(\theta/2)$ ($\propto q^2$) para 1,0 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4, para diferentes temperaturas.

Na Fig. IV.2.3, onde mostramos a variação de $Kc/I(q)$ em função de q^2 ($\sin^2(\theta/2)$), para DMPG em Hepes, para as três regiões de temperatura – abaixo da T_m , entre T_m e T_{post} e acima de T_{post} – fica evidente o baixo espalhamento de luz entre T_m e T_{post} (23°C). A equação (IV.2.3) foi derivada por Zimm, que desenvolveu um método de análise dos dados de espalhamento de luz a vários ângulos e várias concentrações do soluto, possibilitando o cálculo de $\langle M_w \rangle$, A_2 e $\langle R_g^2 \rangle_z$ (Zimm, 1948). Os valores extraídos desta análise para as dispersões de DMPG, nas três regiões de temperatura, estão mostrados na Tabela IV.2.2. Estes são valores típicos, sendo que variações de até 100 % foram encontradas, mas a tendência nas várias amostras foi sempre a mesma: abaixo de T_m e acima de T_{post} , a massa molecular dos agregados é maior, e A_2 é muito pequeno, ou mesmo negativo, indicando alguma atração entre as partículas, e, portanto, agregação das vesículas; entre T_m e T_{post} , a massa molecular diminui, A_2 cresce indicando repulsão entre as vesículas; difícil falar algo sobre o raio de giração, pois não varia muito.

Tabela IV.2.2. Resultados típicos do *Zimm plot* para dispersões de DMPG, em 10 mM tampão Hepes pH 7,4, nas três regiões de temperatura: abaixo de T_m (13°C) entre T_m e T_{post} (22 °C) e acima de T_{post} (40 °C)

T (°C)	$\langle M_w \rangle$ (MDa)	A_2 (cm.mol/g ²)	$\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$ (nm)
13	60	-2,0 x 10 ⁻⁶	65
22	15	30 x 10 ⁻⁶	80
40	40	1,0 x 10 ⁻⁶	60

Os dados de espalhamento de luz indicam que entre as duas transições de fase as vesículas repelem-se, resultando em partículas de menor massa, sugerindo que a força repulsiva eletrostática se sobrepõe à atração de van der Waals. Isto parece não acontecer para temperaturas abaixo de T_m e acima de T_{post} . Este resultado pode ser explicado com um aumento na densidade superficial de carga das vesículas entre T_m e T_{post} . O aumento da ionização da superfície da membrana de DMPG está de acordo com o aumento da condutividade da amostra nesta faixa de temperatura, com mostra a Fig. IV.2.4.

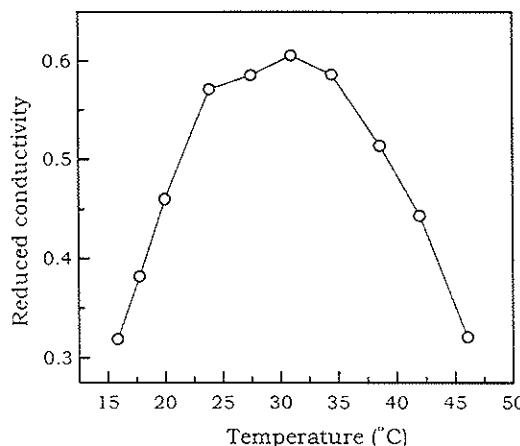


Fig. IV.2.4. Variação com a temperatura da condutividade reduzida (diferença entre as condutividades do DMPG e do tampão, dividida pela condutividade do tampão) de 10 mM DMPG em 10 mM Hepes pH 7,4.

Em água, o espalhamento de luz de DMPG foi muito pouco intenso nos vários ângulos observados, porém indicou uma forte repulsão entre as vesículas, de tal maneira que não foi possível usar o método de Zimm para o cálculo das características das partículas espalhadoras.

3. RPE de marcadores de spin incorporados em dispersões de DMPG

Nas várias figuras já apresentadas neste trabalho (em II e III), onde foram utilizados diferentes marcadores de spin em dispersões lipídicas de 10 mM de

DMPG (em tampão Hepes 10 mM pH 7,4), a transição de fase gel-líquido cristal pode ser observada através da variação com a temperatura de parâmetros medidos diretamente no espectro de RPE, sendo mais evidente quanto mais próximo do centro da bicamada está localizado o nitróxido. Entretanto, a pós-transição não é monitorada por qualquer dos marcadores de spin aqui apresentados.

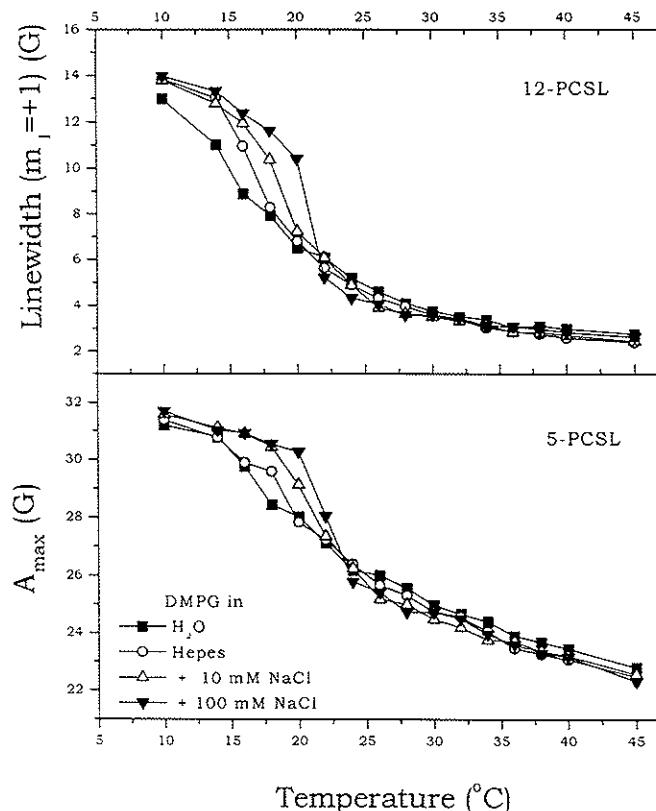


Fig. IV.3.1. Variação com a temperatura de parâmetros medidos diretamente nos espectros de RPE de 5- 12- PCSL (0,1 mM) em dispersões de 10 mM de DMPG em diferentes meios.

Na Fig. IV.3.1 mostramos a variação da largura de linha do pico correspondente a $m_I = +1$ e o valor do desdobramento hiperfino máximo, para o 12- e 5-PCSL, respectivamente. Estes são parâmetros que podem ser medidos nos espectros de RPE a todas as temperaturas, e sua diminuição indica aumento de fluidez da bicamada lipídica, sendo, portanto, parâmetros interessantes para monitorar as transições de fase. Mais uma vez observamos que os marcadores de spin monitoram a transição principal mas não "enxergam" a pós-transição. O aumento da T_m com a força iônica também fica nítido nas medidas com marcadores de spin (Fig. IV.3.1), e seus valores, às várias forças iônicas, são muito semelhantes aos obtidos com espalhamento de luz (Fig. IV.2.2), apesar das transições serem menos bruscas.

Para DMPG em água, apesar da transição de fase monitorada por RPE, pelos marcadores de spin aqui mostrados, ser bem mais suave do que as transições para

as amostras com maior força iônica, o empacotamento das cadeias hidrocarbonadas (monitorado pelos dois marcadores de spin mostrados na Fig. IV.3.1) para todas as amostras é semelhante tanto em baixa temperatura (10°C), quanto em altas temperaturas (acima de 25°C). Isto mostra que a concentração de íons em solução afeta o valor de T_m , mas não altera a estrutura da bicamada lipídica em temperaturas distantes da transição principal de fase. Esta observação é interessante, pois tem sido sugerido na literatura que DMPG em água não formaria vesículas, mas micelas ou discos (Epand e Hui, 1986). A formação de agregados pequenos está de acordo com nossos resultados de espalhamento, porém os marcadores de spin indicam a presença de fase gel a baixa temperatura³, o que só é possível com a existência de bicamada lipídica, com alto empacotamento das cadeias hidrocarbonadas. Portanto, nossos resultados indicam que DMPG em água forma pequenos agregados que apresentam grande repulsão interparticula, mas que mantém a estrutura de bicamada lipídica.

4. Modelo de Gouy-Chapman-Stern

Podemos tentar entender os dados de espalhamento de luz e condutividade mostrados acima, com base no modelo eletrostático de Gouy-Chapman-Stern (ver, p. ex., Evans e Wennerström, 1994). Este modelo considera a superfície da bicamada de DMPG como um plano infinito, uniformemente carregado de densidade $\sigma = e\alpha/A$, onde e é a carga elementar, α o grau de dissociação (ou grau de ionização) do DMPG e A a área por cabeça polar. O grau de dissociação do DMPG dependerá das constantes de associação $\text{PG}^- - \text{H}^+$ e $\text{PG}^- - \text{Na}^+$:

$$K_H = \frac{[\text{PGH}]}{[\text{PG}^-][\text{H}^+]_o} \quad K_{\text{Na}} = \frac{[\text{PGNa}]}{[\text{PG}^-][\text{Na}^+]_o}$$

onde $[]$ se refere à concentração molar em solução e $[]_o$ à concentração molar na superfície do agregado. Esta última pode ser calculada a partir da distribuição de Boltzman, considerando Ψ_o o potencial de superfície e $[]_z$ a concentração em solução, distante das vesículas (bulk):

$$[\text{H}^+]_o = [\text{H}^+]_z e^{-\frac{e\Psi_o}{kT}} \quad \text{e} \quad [\text{Na}^+]_o = [\text{Na}^+]_z e^{-\frac{e\Psi_o}{kT}}$$

sendo k a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta. Portanto, o grau de dissociação do DMPG será dado por:

³ 5- e 12- PCSL em lecitina de soja a 10°C , que está na fase líquido cristalina, ou em micelas formadas por diferentes anfifílicos, dão origem a espectros muito mais móveis do que o observado para DMPG em água.

$$\alpha = \frac{[\text{PG}^-]}{[\text{PG}^-] + [\text{PGH}] + [\text{PGNa}]} = \frac{1}{1 + \left(K_{\text{H}} [\text{H}^+]_\infty + K_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_\infty \right) e^{-\frac{e\psi}{kT}}} \quad (\text{IV.4.1})$$

Na aproximação de Gouy-Chapman para potencial alto temos (no MKS):

$$\Psi_{\circ}^{\text{GCS}} = -\frac{kT}{e} \ln \left(\frac{e^2}{2 \times 10^3 \epsilon \epsilon_0 k T N_A} \frac{\alpha^2}{A^2 n_i} \right) \quad (\text{IV.4.2})$$

sendo ϵ a constante dielétrica do meio, ϵ_0 a permissividade no vácuo e n_i a força iônica da amostra (mol/l). Usando as equações (IV.4.1) e (IV.4.2) é possível escrever uma equação para α que pode ser resolvida numericamente:

$$\beta \alpha^3 + \alpha - 1 = 0 \quad \text{com} \quad \beta = \frac{e^2}{2 \times 10^3 \epsilon \epsilon_0 k T N_A A^2} \left(K_{\text{Na}} \frac{[\text{Na}^+]_\infty}{n_i} + K_{\text{H}} \frac{[\text{H}^+]_\infty}{n_i} \right) \quad (\text{IV.4.3})$$

Após o cálculo de α , com a Eq. (IV.4.2) calcula-se $\Psi_{\circ}^{\text{GCS}}$.

Para o cálculo do grau de dissociação do DMPG, e do potencial de superfície, necessitamos saber os valores de K_{Na} e K_{H} . Usamos para K_{H} o valor de $15,8 \text{ M}^{-1}$, que foi calculado por Toko e Yamafuji (1980), e também pode ser calculado do trabalho de Watts e col. (1978). A escolha do valor de K_{Na} é mais complicada, pois na literatura os valores variam de zero, onde se assume que íons monovalentes não se ligam ao PG⁻ (Träuble e Eibl, 1974; Träuble e col., 1976; Cevc e col., 1980; Copeland e Andersen, 1982), passando por diferentes valores até 1 M^{-1} (Eisenberg e col., 1979; Loosley-Millman e col., 1982; Lakhdar-Ghazal e col., 1983; Helm e col., 1986; Lakhdar-Ghazal e Tocanne, 1988; Tocanne e Teissié, 1990). Na Fig. IV.4.1 está mostrado a variação de $\Psi_{\circ}^{\text{GCS}}$ com K_{Na} , para as fases gel ($A = 48 \text{ \AA}^2$) e líquido cristal ($A = 60 \text{ \AA}^2$)⁴, calculado pelas Eqs. (IV.4.2) e (IV.4.3), para $n_i = 4 \text{ mM}$ (corresponde a $10 \text{ mM Hepes, pH 7,4}$). Antes de discutirmos a Fig. IV.4.1, é interessante observar que, no pH aqui usado, grandes variações de K_{H} não afetam os valores de α ou $\Psi_{\circ}^{\text{GCS}}$. Além disso, para $K_{\text{Na}} = 0$, o lipídio está praticamente todo dissociado, $\alpha \approx 1$ (somente devido ao equilíbrio $\text{PG}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{PGH}$), variando muito pouco com a área por cabeça polar (A) ou com a força iônica do meio (n_i) (Tabela IV.4.1), como esperado para um grupo em um pH distante do valor de seu pK.

⁴ Os valores aqui usados de área por cabeça polar foram baseados em Marsh (1974) e Watts e col. (1981). Para maior discussão ver Riske (1997).

Tabela IV.4.1. Valores do grau de dissociação do DMPG (α) calculados com a utilização do modelo de Gouy-Chapman-Stern (Eqs. IV.4.2 e IV.4.3), em diferentes forças iônicas (n_i), e para alguns valores da constante de associação PG⁻ - Na⁺ (K_{Na}).

DMPG em	n_i (mM)	K_{Na} (M ⁻¹)	α	
			gel ($A = 48 \text{ \AA}^2$)	liq. - crist. ($A = 60 \text{ \AA}^2$)
Hepes	4	0	0,994	0,996
+ 10 mM NaCl	14	0	0,998	0,999
+ 100 mM NaCl	104	0	1,000	1,000
	4, 14, 104	0,3	0,397	0,448
	4, 14, 104	0,1		0,586

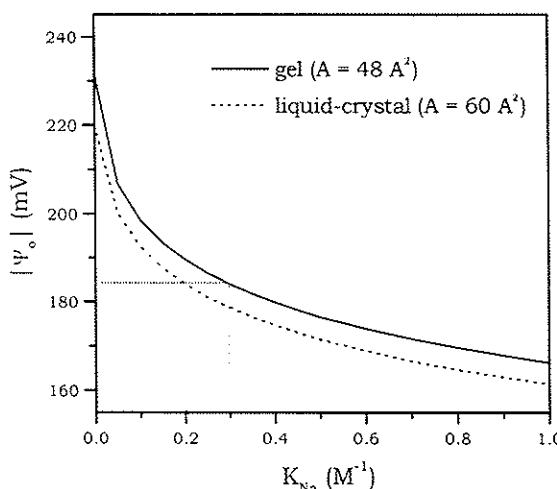


Fig. IV.4.1. Variação do potencial eletrostático de superfície de Gouy-Chapman-Stern (Eqs. IV.4.2 e IV.4.3) com a constante de associação PG⁻ - Na⁺ (K_{Na}), para dois valores de área por cabeça polar (modelando as fases gel e líquido cristal do DMPG). $K_H = 15,8 \text{ M}^{-1}$ e $n_i = 4 \text{ mM}$.

Vemos na Fig. IV.4.1 que, se assumimos o mesmo K_{Na} para as fases gel e líquido cristal, o potencial de superfície da fase gel será sempre maior do que o da fase menos empacotada, isto devido ao aumento de área por cabeça polar para a fase líquido cristal. Desta maneira não explicamos nossos resultados experimentais, que mostram que vesículas na fase líquido cristal repelem-se mais do que vesículas na fase gel, e portanto, segundo este modelo, deveriam apresentar maior potencial de superfície. Assim, ainda de acordo com o modelo aqui usado, é necessário que a constante de associação PG⁻ - Na⁺ da fase líquido cristal seja menor do que a da fase gel. Por exemplo, se assumimos $K_{Na} = 0,3 \text{ M}^{-1}$ para a fase gel, é necessário que K_{Na} para a fase líquido cristal seja menor do que $0,2 \text{ M}^{-1}$ (ver indicação na Fig. IV.4.1). Reforçando a proposta de $K_{Na} > 0$, temos os resultados de condutividade (Fig. IV.2.4) que mostram um aumento de íons em solução para temperaturas maiores que T_m , o que não seria explicado com $K_{Na} = 0$, pois $\alpha \approx 1$ (Tabela IV.4.1) antes e depois da transição principal de fase, (aqui representada simplesmente por um aumento de área por cabeça polar).

Se aplicamos o modelo de Gouy-Chapman-Stern para dispersões de DMPG em água pura ($\text{pH} = 5,6$, $n_i = 0,0025$, e $A = 48 \text{ \AA}^2$), chegamos a um valor bastante baixo para o grau de dissociação do DMPG, $\alpha = 0,12$, de acordo com experimentos com monocamadas (Tocanne e col., 1974; Sacré e Tocanne, 1977). Entretanto, devido à baixa força iônica do meio, a magnitude do potencial de superfície é muito grande, $\Psi_{\circ}^{\text{GCS}} = -313 \text{ mV}$, o que explicaria a grande repulsão intervesícula observada por espalhamento de luz.

Toda a discussão que fizemos acima só diz respeito à transição principal de fase, onde sabemos que existe um aumento da área por cabeça polar do lipídio. Nada podemos dizer sobre a pós-transição, pois ainda não sabemos muito sobre possíveis mudanças estruturais que ocorreriam nesta região de temperatura.

É importante lembrar que a força resultante entre duas vesículas carregadas é o balanço de várias interações: a repulsão eletrostática, que discutimos acima, relacionada com a densidade superficial de carga da vesícula e a força iônica do meio (descrita como uma força entrópica, Israelachvili, 1992); a atração de van der Waals; e, a curta distância, as chamadas forças de hidratação e de volume excluído (LeNeveu e col., 1977; Parsegian e col., 1991). Neste trabalho tratamos simplesmente das forças relacionadas à carga das superfícies das vesículas, sugerindo que entre T_m e T_{post} a constante de ligação $\text{PG}^- - \text{Na}^+$ seja baixa o suficiente para que exista o aumento de potencial de superfície necessário para que a repulsão entre as vesículas seja maior do que a força de atração de van der Waals. Não podemos, entretanto, descartar outros modelos, nos quais a diminuição da força atrativa entre as vesículas em T_m e seu aumento em T_{post} seriam os responsáveis pela região de vesículas não agregadas, e portanto, baixo espalhamento, entre estas duas temperaturas.

5. Superfície de vesícula de DMPG vista por um marcador de spin catiônico aquo - solúvel

(Em colaboração com Barney Bales e Otaciro R. Nascimento)

Considerando a discussão acima, sobre a possível variação do potencial de superfície de agregados de DMPG em T_m e T_{post} , resolvemos usar um marcador de spin aquo-solúvel, catiônico, que particionasse entre o meio aquoso e a superfície da membrana aniônica de DMPG, dependendo do potencial eletrostático da superfície. A medida da quantidade relativa de marcador na superfície da membrana, quando possível de ser feita, informa sobre o valor do potencial da superfície. Este método é baseado em trabalhos na literatura (Castle e Hubbell,

1976; Hartsel e Cafiso, 1986; Khramstov e col., 1992; Franklin e col., 1993; Epand e col., 1996; Krasnowska e col., 1998), que usaram marcadores de spin ou fluorescentes, anfifílicos, carregados, que particionavam na membrana lipídica dependendo de dois fatores: a afinidade com a parte lipídica e o potencial de superfície. São três as principais vantagens do marcador aquo-solúvel aqui utilizado: sua provável menor interferência na estrutura original do agregado, por ficar externo ao mesmo; sua partição na superfície da membrana ser, aproximadamente, só devida à interação eletrostática; e a precisão na análise dos espectros de RPE, por corresponderem à região de *motional narrowing*, e poderem ser analisados de acordo com o método desenvolvido por Bales (1989) (ver Apêndice 1). Para tornar a análise dos espectros ainda mais sensível, usamos o marcador de spin CAT1 deutérioado, dCAT1, para diminuir o alargamento de linha causado por interações hiperfinas não resolvidas com os prótons vizinhos ao nitróxido, como mostrado na Fig. A1.3.

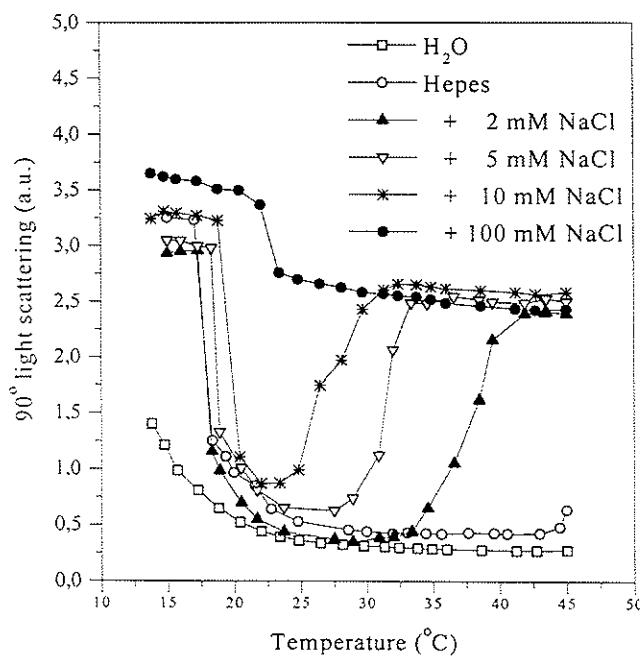


Fig. IV.5.1. Variação com a temperatura do espalhamento de luz a 90° para 10 mM DMPG em diferentes meios.

Reproduzimos na Fig. IV.5.1 o perfil de espalhamento de diferentes amostras de DMPG (em água, em Hepes, e Hepes + 2, 5, 10 e 100 mM NaCl) com a temperatura, algumas delas já mostradas na Fig. IV.2.2. Observamos que os valores de T_m para as amostras que aparecem nas duas figuras, (em água, em Hepes, e Hepes + 10 e 100 mM NaCl), são idênticos, porém o comportamento na região de T_{post} é diferente. O interesse na comparação está no fato das amostras corresponderem a lotes diferentes de DMPG, ambos comprados da Avanti Polar

Lípids. Nota-se que com o lote mais recente de DMPG (Fig. IV.5.1) obtém-se a pós-transição em torno de 35 °C na presença de Hepes + 2 mM de NaCl, o que era observado anteriormente em Hepes puro (Fig. IV.2.2). É importante ressaltar que os espectros de RPE de marcadores de spin incorporados às vesículas de DMPG não mostraram diferenças significativas entre os dois lotes de lipídio. Talvez a observação da diferença entre os dois lotes esteja relacionada à extrema sensibilidade da pós-transição à presença de íons no meio⁵.

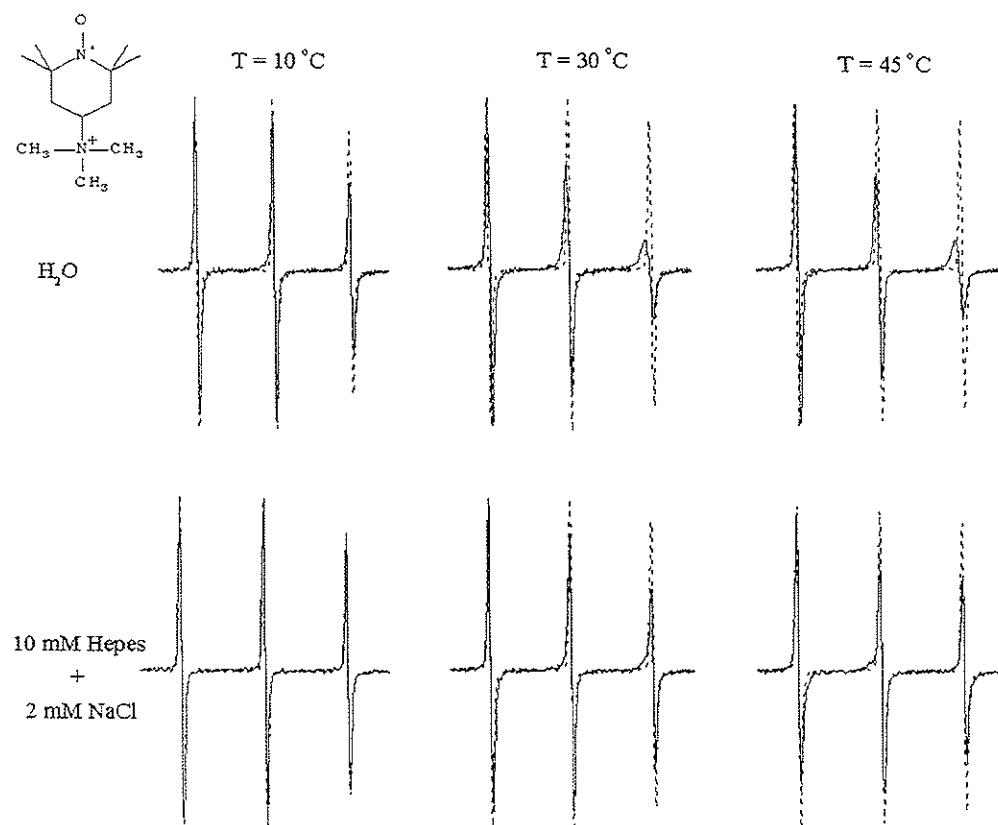


Fig. IV.5.2. Espectros de RPE de 0,1 mM de dCAT1 (mostrado acima à esquerda), livre em solução (---) ou na presença de 10 mM de DMPG (—), em água e em 10 mM Hepes + 2 mM NaCl, para diferentes temperaturas. Largura total dos espectros 50 G.

Na Fig. IV.5.2 estão mostrados espectros de RPE do marcador dCAT1, a três temperaturas, obtidos na presença de agregados de DMPG em água, e em Hepes + 2 mM de NaCl. Para esta última amostra, as três temperaturas correspondem à bicamada lipídica abaixo da T_m , entre T_m e T_{post} , e acima da T_m . Estes espectros podem ser analisados como uma soma de duas componentes: um sinal mais móvel, correspondendo ao marcador no meio aquoso, distante da vesícula, e outro mais imóvel relativo ao marcador próximo à superfície do DMPG. Esta decomposição está claramente mostrada na Fig. IV.5.3, para o lipídio a 30 °C, onde o espectro mais móvel, correspondendo ao marcador livre, foi obtido com dCAT1 em Hepes ou água,

⁵ Entretanto, os dados mostrados na Fig. IV.5.1 não se alteram na presença de 0,1 mM de dCAT1.

na ausência de lipídio. A quantidade de sinal livre a ser subtraída é encontrada de tal maneira que o espectro resultante possa ser um sinal único de RPE, isto é, as três linhas (correspondentes a $m_l = +1, 0$ e -1) possam ser ajustadas com linhas Voigt, com o programa desenvolvido por Halpern e col. (1993). Além disso, as linhas devem ter a mesma área (2^a integral), e a mesma largura de linha Gaussiana.

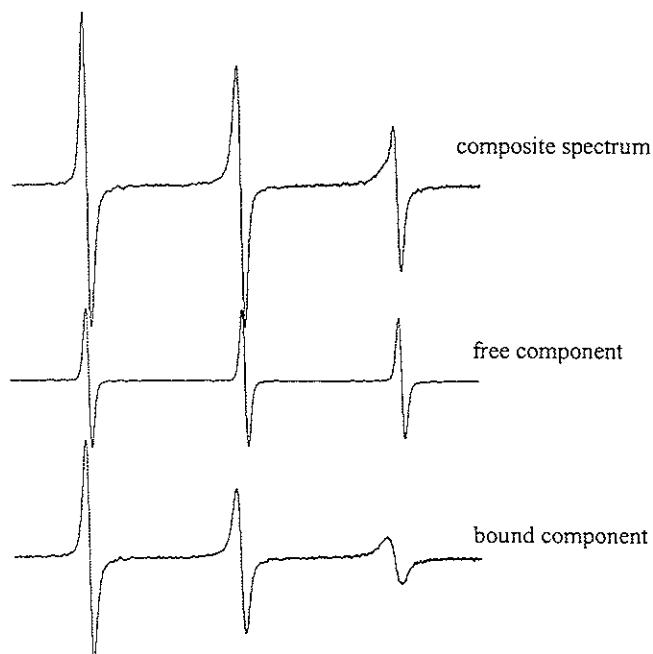


Fig. IV.5.3. Uma típica subtração de espectros: espectro superior foi obtido com 0,1 mM dCAT1 em 10 mM DMPG em Hepes, 30 °C; espectro do meio com 0,1 mM dCAT1 em Hepes, 30 °C; e espectro inferior corresponde ao superior menos o do meio. Os espectros estão mostrados nas intensidades relativas reais. Largura total dos espectros 50 G.

Na Fig. IV.5.4 mostramos a partição do marcador entre o meio aquososo e a membrana lipídica ($P = (\text{moles de marcador na superfície da membrana}) / (\text{moles de marcador livre em solução})$) calculada através da 2^a integral dos espectros composto e subtraído. Os valores da partição de dCAT1 em DMPG estão comparados com os obtidos com um sistema que não apresenta transições de fase no intervalo de temperatura estudado, micelas aniônicas de dodecil sulfato de sódio (SDS)⁶. Para as temperaturas mais baixas a quantidade de espectro livre a ser subtraída não é muito óbvia, devido à semelhança entre os espectros do marcador livre e na superfície da membrana. Portanto, os valores de partição encontrados para temperaturas abaixo de 17 °C devem ser vistos como valores mínimos possíveis. Apesar desta incerteza, existe uma nítida tendência do marcador de spin migrar

⁶ SDS foi usado na concentração de 12,1 mM, na qual se sabe que 8 mM de anfifílico estão livres e 4,1 mM em micelas (Quina e col., 1995). Com concentrações abaixo da CMC do SDS (CMC ~ 8 mM), vimos que o dCAT1 não se liga a monômeros ou agregados pré-micelares do anfifílico (seu espectro de RPE é idêntico ao sinal livre). A partição para o SDS foi calculada de maneira semelhante à calculada para o DMPG, através da decomposição do espectro em dois sinais, um correspondendo ao marcador livre, e outro ao marcador na superfície da micela.

para a superfície do agregado de DMPG na temperatura de transição gel-líquido cristal, sendo isto uma forte indicação de aumento do potencial de superfície em T_m . Além disso, também é evidente a diminuição de dCAT1 próximo à superfície da membrana com o aumento da força iônica do meio.

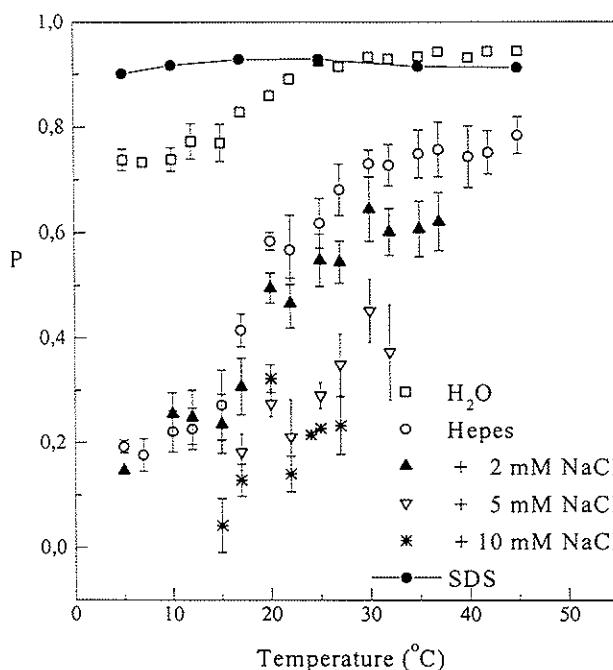


Fig. IV.5.4. Variação com a temperatura dos valores de partição [$P = (\text{moles de dCAT1 na superfície da membrana}) / (\text{moles de dCAT1 livre em solução})$] obtidos através do cálculo da 2^a integral dos espectros composto e subtraído, para 10 mM DMPG em diferentes meios.

Pode-se notar na Fig. IV.5.4 que os valores de partição para as amostras com NaCl estão somente mostrados até uma certa temperatura: 35, 30 e 25 °C, para as amostras de 2, 5 e 10 mM de sal, respectivamente. Isto porque, a partir destas temperaturas os espectros compostos de dCAT1 não podem mais ser simplesmente decompostos em dois sinais. Na Fig. IV.5.5 mostramos subtrações (espectro composto - espectro livre) feitas para as várias amostras, em duas temperaturas, 35 e 40 °C. Fica claro que a 35 °C os espectros de RPE de dCAT1 em DMPG - água, DMPG - Hepes e DMPG - Hepes + 2 mM NaCl podem ser decompostos em dois sinais, enquanto que para o DMPG em concentrações maiores de sal a subtração do espectro livre não dá origem a um sinal de RPE que possa ser atribuído ao marcador de spin em um único sítio. A 40 °C, a decomposição do espectro de dCAT1 em dois sinais já não é também possível para DMPG - Hepes + 2 mM NaCl. É interessante observar que, para as várias amostras, a temperatura a partir da qual não é possível interpretar o espectro de RPE do marcador de spin dCAT1 como proveniente de dois sítios, um livre e o outro mais imóvel, é muito semelhante à temperatura de pós-transição destas amostras. Voltaremos a falar sobre isto mais adiante.

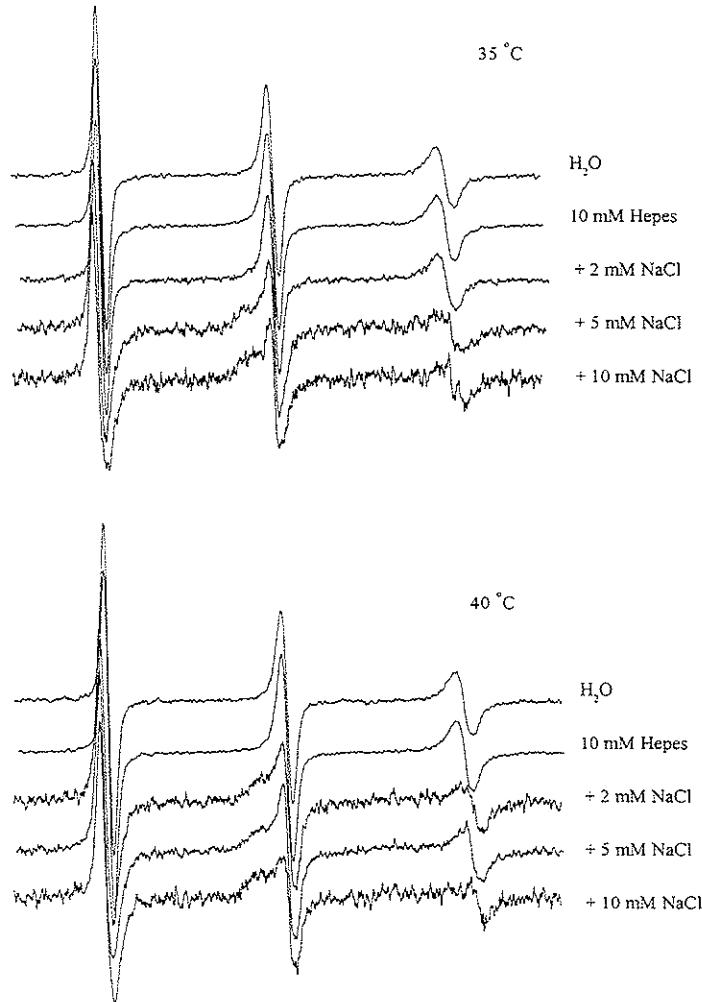


Fig. IV.5.5. Espectros de RPE obtidos a partir de subtrações de espectros (ver texto), relativos à componente ligada do marcador de spin dCAT1, a 35 e 40 °C, em 10 mM DMPG em diferentes meios. Largura total dos espectros 50 G.

Características do sítio onde dCAT1 se localiza

Sempre que foi possível decompor o espectro do dCAT1 em dois sinais, o sinal do marcador próximo à membrana foi analisado segundo a metodologia desenvolvida por Bales (1989), sendo calculado o desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) e os tempos de correlação, paralelo ($\tau_{//}$) e perpendicular (τ_{\perp}) ao eixo de simetria da molécula (ver Apêndice 1, e referências lá citadas). O desdobramento hiperfino a_0 , e o tempo de correlação τ_{\perp} , calculados para as várias amostras de DMPG, estão mostrados nas Fig. IV.5.6, onde estão comparados com os valores obtidos com o marcador livre em solução e na superfície da micela de SDS (calculado dos espectros subtraídos). Não mostramos os valores de $\tau_{//}$ por serem muito baixos para todas as amostras, e semelhantes aos obtidos com o marcador livre.

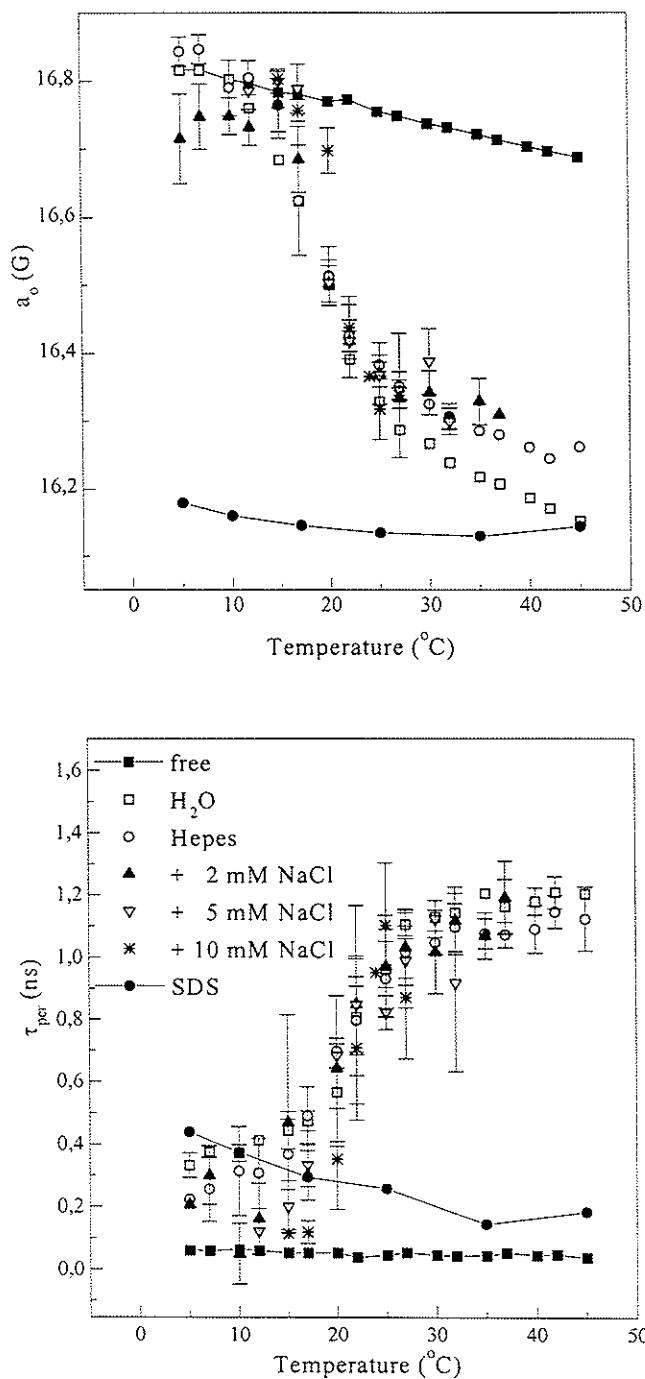


Fig. IV.5.6. Variação com a temperatura do desdobramento hiperfino isotrópico (a_o) e do tempo de correlação rotacional perpendicular (τ_1) do marcador de spin dCAT1 livre em solução, em micelas de SDS e em dispersões de 10 mM DMPG em diferentes meios.

Devido a sua carga positiva sabemos que é muito provável que o marcador de spin dCAT1 fique na superfície do agregado de DMPG, e não penetre na região mais hidrofóbica das cadeias hidrocarbonadas. De fato, os valores de a_o (ver Apêndice 1) a todas as temperaturas, indicam que o marcador está localizado em região altamente hidrofilica (ver discussão mais abaixo). Abaixo da T_m , como já mencionado, o sinal é muito semelhante ao do marcador livre, sendo que somente um pequeno aumento de τ_1 mostra que o dCAT1 está ligeiramente imobilizado por estar próximo da

membrana lipídica. Com a transição gel - líquido cristal, o marcador penetra mais profundamente na bicamada, o que fica evidente pela diminuição de a_0 , e aumento de τ_1 (desloca-se para uma região de maior hidrofobicidade e viscosidade). É interessante comparar o microambiente do dCAT1 em DMPG e em micelas de SDS. Nestas micelas o marcador encontra-se, em média, em região mais hidrofóbica (menor a_0) e mais fluida (menor τ_1) do que em agregados de DMPG.

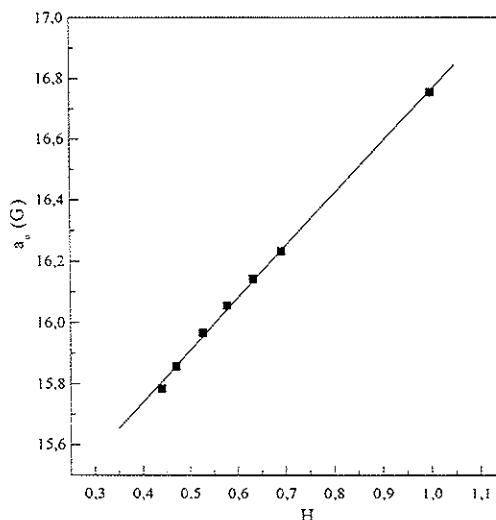


Fig. IV.5.7. Variação do desdobramento hiperfino isotrópico (a_0) com o índice de hidrofobicidade do meio H (veja texto), para diferentes misturas metanol/água.

Pode-se fazer uma boa estimativa da polaridade do microambiente onde se localiza o marcador de spin, através da comparação do valor obtido de a_0 , com os valores de a_0 calculados dos espectros de dCAT1 em meios de diferentes misturas de metanol/água. Na Fig. IV.5.7 está mostrada a variação de a_0 do dCAT com o índice de polaridade do meio H (Mukerjee e col., 1982), sendo este definido como a razão entre a concentração volumétrica de grupos OH no meio e na água ($[OH] = 55,4\text{ M}$). Para diferentes misturas de metanol/água H foi calculado através da equação linear resultante do ajuste pelo método dos mínimos quadrados de dados experimentais (Tabela 1 em Mukerjee e col., 1982):

$$H(25\text{ }^{\circ}\text{C}) = 0,987 - 0,542 \text{ XMeOH}$$

onde XMeOH é a fração em peso de metanol presente na amostra. Foi mostrado que existe uma excelente correlação entre H e a constante dielétrica do meio (Mukerjee e col., 1982). Na Tabela IV.5.1 estão listados os valores de a_0 , calculados dos espectros de RPE do dCAT1, de H, obtidos da Fig. IV.5.7 (a partir dos valores de a_0), e da constante dielétrica ϵ do microambiente onde se encontra o marcador de spin em cada sistema (livre em água ou Hepes, na superfície de agregados de DMPG ou

em micelas de SDS), obtida do trabalho de Mukerjee e col. (1982), a partir dos valores de H.

Tabela IV.5.1. Valores do desdobramento hiperfino ao, do índice de polaridade H e da constante dieletrica ϵ do micro ambiente onde se encontra o dCAT1 em solução, e na superfície de agregados de DMPG e SDS.

dCAT1 em	a_o (G)	H ^a	ϵ^a
H ₂ O ou Hepes	16,76	1,00	80
DMPG	16,37	0,77	60
SDS	16,13	0,63	49

^aH e ϵ foram obtidos da Fig. IV.5.9, baseado em Mukerjee e col. (1982).

Estimativa do potencial eletrostático de superfície de vesículas de DMPG através da partição do dCAT1

O valor do potencial eletrostático na superfície de vesículas de DMPG pode ser estimado através dos valores da partição P (Fig. IV.5.4), assumindo-se o modelo simples de dois sítios para o marcador de spin (baseado em Castle e Hubbell, 1976). Na aproximação de gás ideal podemos escrever os potenciais químicos do marcador nos dois meios, solução e superfície do agregado:

$$\mu_{sol} = \mu^o_{sol} + kN_A T \ln(X_{sol}) \quad e \quad \mu_{sup} = \mu^o_{sup} + kN_A T \ln(X_{sup}) + ZeN_A \Psi_{sup}$$

sendo μ^o o potencial químico intrínseco, Z a carga elétrica do marcador de spin (Z = 1), e X_{sol} e X_{sup} as frações molares do dCAT1 em solução e na superfície do agregado, respectivamente. Neste modelo simples de dois sítios, consideramos o potencial eletrostático na superfície $\Psi_{sup} = \Psi_o$, e zero em toda a solução, e assumimos que a interação entre dCAT1 e a superfície da vesícula é de caráter unicamente eletrostático, assim $\mu^o_{sol} = \mu^o_{sup}$. No equilíbrio termodinâmico, $\mu_{sol} = \mu_{sup}$, portanto:

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln\left(\frac{X_{sup}}{X_{sol}}\right)$$

Considerando que a fração X_{sup}/X_{sol} pode ser aproximada por

$$\frac{X_{sup}}{X_{sol}} \approx \frac{n_{sup}}{V_{sup}} \frac{V_{sol}}{n_{sol}}$$

onde n_{sup} e n_{sol} são os números de moles de dCAT1 ligados à superfície e em solução, que podem ser calculados a partir dos valores de P obtidos experimentalmente. Para o cálculo dos volumes fazemos $V_{sol} \approx V_{total}$ e $V_{sup} = (A.N.h)$, onde A é a área por lipídio na superfície da vesícula, N o número total de lipídios, e h a espessura da camada na superfície das vesículas de DMPG onde o marcador de spin pode localizar-se. Desta maneira,

$$\frac{X_{sup}}{X_{sol}} \approx \frac{P}{(1-P)} \frac{V_{sol}}{V_{sup}} \quad e \quad \Psi_o \approx -\frac{kT}{e} \ln\left(\frac{P}{(1-P)} \frac{V_{sol}}{V_{sup}}\right) \quad (IV.5.1)$$

Baseado no modelo descrito acima foram feitos os cálculos de potencial de superfície das amostras com diferentes forças iônicas (Tabela IV.5.2), para temperaturas acima de T_m , onde foi assumido $T = 303$ K, $A = 60 \text{ \AA}^2$, $h = 5 \text{ \AA}$ e N calculado para um certo V_{total} de uma amostra 10 mM de DMPG. Para o SDS foi considerado que somente 4,1 mM de anfifílico estão formando micelas, com número de agregação 50,6 e diâmetro 44 \AA^2 (Quina e col., 1995), o que resulta em $A = 120 \text{ \AA}^2$. Também foi assumido $h = 5 \text{ \AA}$ (Cabane e col., 1985).

Tabela IV.5.2. Cálculo do potencial de superfície (Ψ_o) de agregados de SDS e DMPG em diferentes forças iônicas (n_i), a partir dos valores da partição (P) do marcador de spin dCAT1 entre o meio aquoso e a superfície do agregado, baseado no modelo de dois sítios descrito no texto.

Sistema	n_i (mM)	P	Ψ_o (mV)
DMPG em			
água	0,1	0,95	-242
Hepes	4,0	0,75	-194
+ 2 mM NaCl	6,0	0,60	-176
+ 5 mM NaCl	9,0	0,40	-154
+ 10 mM NaCl	14,0	0,25	-136
SDS em água		0,90	-225

Como esperado, existe uma diminuição do módulo do potencial de superfície com a concentração de sal. É importante notar que só é possível medir valores para a partição P no intervalo 0,10 - 0,95, o que limita o intervalo possível de medida de potencial de superfície, com o método aqui usado, para $108 \text{ mV} < |\Psi_o| < 242 \text{ mV}$ (para 10 mM DMPG). Isto fica claro no caso de 100 mM de NaCl, quando observamos que $P \approx 0$, o que poderia corresponder a $|\Psi_o| = 100 \text{ mV}$, como sugerido anteriormente (Cevc e col., 1980; Riske e col., 1997).

Comparação com os potenciais eletrostáticos calculados pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern

Na Fig. IV.5.8 estão mostrados os valores de $|\Psi_o|$ listados na Tabela IV.5.2, em função da concentração de sal. As linhas tracejadas correspondem a duas tentativas de ajustar estes valores com a equação de Gouy-Chapman-Stern (Eq. IV.4.2): para $K_{\text{Na}} = 0,13 \text{ e } 0,62 \text{ M}^{-1}$, correspondendo a $\alpha = 0,55 \text{ e } 0,37$, respectivamente⁷. Como já discutimos, Ψ_o^{GCS} é bastante dependente da constante de associação $\text{PG}^- - \text{Na}^+$, sendo que fica claro na Fig. IV.5.8 que não existe um valor único de K_{Na} que ajuste bem este potencial com os valores obtidos das medidas de

partição. Apesar dos valores dos potenciais obtidos com as duas metodologias serem semelhantes, a variação do potencial de superfície com n_i , obtida através das medidas de participação do dCAT1, é muito maior do que aquela obtida com o modelo de Gouy-Chapman-Stern. Esta discrepância talvez possa ser atribuída às várias aproximações usadas no modelo de Gouy-Chapman-Stern, como a distribuição uniforme de cargas, o caráter pontual das cargas elétricas, a variação brusca de constante dielétrica na superfície do agregado (usamos $\epsilon = 80$ em todo meio, apesar de sabermos, por exemplo, que o dCAT1 está localizado em região de $\epsilon \approx 60$). Além disso, é importante ressaltar que estamos trabalhando em forças iônicas relativamente baixas, onde podem existir interações eletrostáticas entre as vesículas, não sendo mais correto o modelo que considera o potencial zero no infinito. Por outro lado, também não se pode descartar imprecisões no cálculo de Ψ_0 baseado nas medidas da participação do marcador de spin, e no modelo de dois sítios aqui usado.

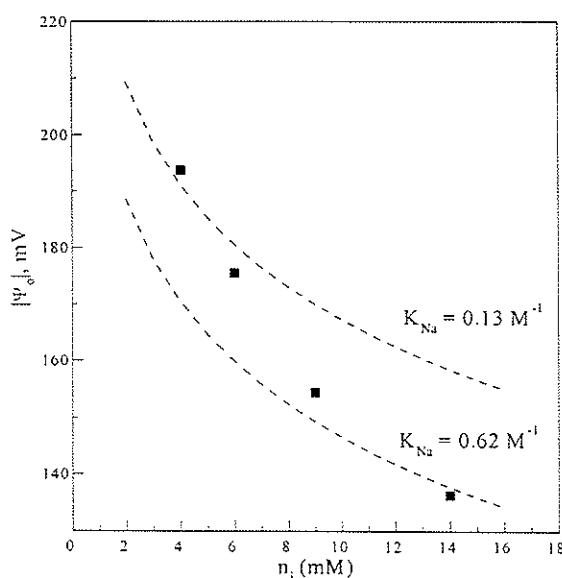


Fig. IV.5.8. Variação do potencial eletrostático de superfície com a força iônica do meio: (■) valores calculados a partir da participação P (ver Fig. IV.5.4), com o modelo de dois sítios; (----) curvas teóricas baseadas modelo de Gouy-Chapman-Stern, para dois diferentes valores da constante de associação $PG^- - Na^+$.

Para DMPG em água o valor de Ψ_0 que encontramos com dCAT1 (- 242 mV) deve ser comparado com o potencial de Gouy-Chapman-Stern calculado para $n_i = 0,1\text{ mM}$ ($\Psi_0^{GCS} = -276$, $\alpha = 0,39$), devido à presença de 0,1 mM de dCAT1, e não o valor encontrado anteriormente, em água pura ($n_i = 0,0025$, $\Psi_0^{GCS} = -313\text{ mV}$, $\alpha =$

⁷ Apesar de α ser função da força iônica do meio (Eq. IV.4.3) para os valores de pH e n_i aqui usados, $[H^+]_x \ll n_i$, e $[Na^+]_x \approx n_i$, portanto α fica efetivamente independente de n_i .

0,12). Apesar do menor potencial de superfície em presença do marcador catiônico, a repulsão intervesícula ainda parece ser suficientemente grande, dando origem a baixo espalhamento de luz (Fig. IV.5.1).

Nenhuma evidência de fusão entre as vesículas

É importante notar que a única informação que obtivemos com dCAT1 sobre as modificações que acontecem nas dispersões de DMPG em T_{post} , foi a indicação da presença do marcador de spin em mais de dois sítios, não sendo possível o cálculo de uma partição⁸, potencial de superfície, ou análise da superfície dos agregados, como fizemos para temperaturas abaixo de T_{post} . Principalmente na tentativa de entender melhor as alterações na pós-transição, fizemos um experimento para testar se havia fusão das vesículas de DMPG na pós-transição, ou em qualquer outra temperatura. Para isso usamos o marcador de spin fosfolipídico 16-PCSL, que praticamente não particiona em meio aquoso, incorporado em vesículas de DMPG em concentração alta o suficiente para apresentar um espectro de RPE alargado por interação de troca spin-spin (3 % da concentração lipídica, em moles). Um certo volume desta amostra foi dissolvido em um volume três vezes maior de uma amostra de DMPG (mesma concentração) sem o marcador de spin. Portanto, no caso de fusão entre as vesículas, a largura das linhas do espectro do marcador de spin deveria diminuir, acusando a diminuição da concentração de marcador por vesícula, portanto de troca entre os spins. Não observamos qualquer mudança significativa no espectro de RPE do 16-PCSL, durante a seguinte variação de temperatura: 1h a 25 °C, 1h a 40 °C, 1h a 17 °C e novamente a 25 °C. Isto indica que nenhuma das duas transições de fase, transição principal ou a pós-transição, fazem com que os marcadores de spin redistribuam-se em todas as vesículas presentes, o que seria esperado caso ocorresse fusão entre as vesículas.

6. Alguns resultados preliminares com dCAT1 monitorando interação peptídeo-lipídio

(Também relacionado ao trabalho de doutorado da estudante Rozane de Fátima Turchiello)

Resolvemos usar a metodologia apresentada acima, com o marcador aquosolúvel dCAT1, para estudar as possíveis alterações na superfície da membrana de DMPG causadas pela presença de peptídeos que interagem com a bicamada lipídica. Usamos a bradicinina, um peptídeo de nove aminoácidos, que no valor de pH que

⁸ Temos indicação de que a partição do dCAT1 na superfície da vesícula de DMPG não muda para temperaturas acima de T_{post} . Isto porque, apesar do espectro resultante da subtração não corresponder a um só sinal de RPE (ver Fig. IV.5.5), a quantidade de marcador subtraída (2^a integral) é muito semelhante àquela usada para temperaturas logo abaixo de T_{post} .

trabalhamos, 7,4, apresenta duas cargas positivas nas extremidades devido à presença de argininas (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Com marcadores de spin anfifílicos já mostramos que este peptídeo interage com a membrana lipídica, alterando a estrutura da bicamada, para temperaturas entre 0 e 45 °C (manuscrito em preparação).

O experimento com bradicinina é feito de maneira semelhante ao experimento com DMPG puro: dispersões de 10 mM DMPG são formadas a partir de filmes secos de DMPG agitados em presença de 0,1 mM dCAT1 e 1 mM bradicinina em tampão 10 mM Hepes + 2 mM de NaCl, pH 7,4. Os espectros de RPE do dCAT1 também pareceram ser compostos por pelo menos dois sinais, e, como discutido no item anterior, subtrações foram feitas na tentativa de analisá-los como uma soma de duas componentes, uma correspondente ao marcador livre em solução e outra devido ao marcador na superfície da vesícula de DMPG.

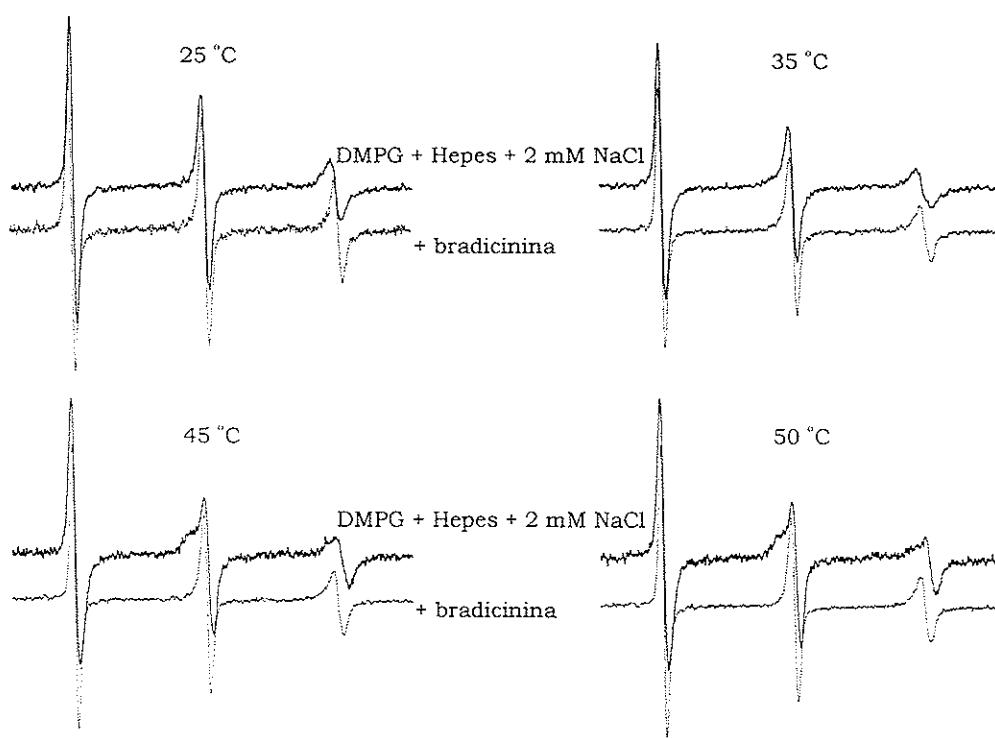


Fig. IV.6.1. Espectros de dCAT1 (0,1 mM) resultantes das subtrações do sinal do marcador livre em Hepes dos espectros do marcador em presença de suspensões de 10 mM DMPG + 2 mM NaCl e 10 mM DMPG + 2 mM NaCl + 1 mM bradicinina.

O primeiro resultado interessante que surgiu deste trabalho foi que, diferentemente do DMPG + 2 mM de NaCl, ou com maiores concentrações de íons (Fig. IV.5.5), com a bradicinina é possível decompor os espectros como uma soma de duas componentes, a todas as temperaturas, incluindo acima da pós-transição do

DMPG. Na Fig. IV.6.1 mostramos os espectros obtidos das subtrações, para as várias temperaturas, correspondendo, portanto, ao marcador próximo à bicamada lipídica, para DMPG + 2 mM NaCl, na ausência e presença de bradicinina. Fica evidente que na presença do peptídeo, para todas as temperaturas, o sinal resultante da subtração [espectro composto - espectro livre] pode corresponder ao marcador de spin em um só sítio [superfície da membrana], o que não é verdade para a amostra de DMPG + 2 mM NaCl a 45 e 50 °C, como já tínhamos mostrado (Fig. IV.5.5). Além da constatação da mudança provocada pelo peptídeo nas dispersões de DMPG, não temos explicações para o resultado mostrado acima. É necessário, por exemplo, verificar se a pós-transição continua presente no DMPG com bradicinina.

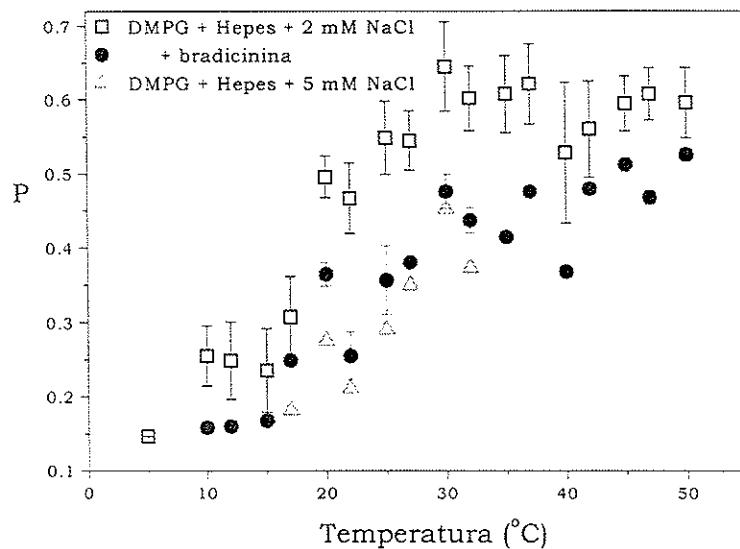


Fig. IV.6.2. Variação com a temperatura dos valores de partição [$P = (\text{moles de dCAT1 na superfície da membrana}) / (\text{moles de dCAT1 livre em solução})$] obtidos através do cálculo da 2^a integral dos espectros composto e subtraído, para três amostras: 10 mM DMPG + 2 e +5 mM de NaCl e 10 mM DMPG + 2 mM NaCl + 1 mM bradicinina.

Cálculos de partição do dCAT1, semelhantes aos já mostrados (Fig. IV.5.4), foram feitos em presença de DMPG + 2 mM NaCl + 1 mM bradicinina. Na Fig. IV.6.2 está mostrado que os valores de P obtidos na presença do peptídeo estão entre os valores obtidos com DMPG + 2 e 5 mM NaCl (reproduzidos da Fig. IV.5.4). A partir do valor de partição do dCAT1 obtido em presença de bradicinina, e usando o mesmo modelo de dois sítios discutido no item anterior, calcula-se o potencial eletrostático da superfície da vesícula de DMPG. Observamos que este valor corresponde ao Ψ_0 que obteríamos com DMPG + 8 mM de NaCl (Fig. IV.6.3), como se a presença da bradicinina fosse equivalente ao acréscimo de 2 mM de NaCl ao meio (que já contém 6 mM devido ao tampão usado, 10 mM Hepes + 2 mM NaCl). Uma

interpretação preliminar pode basear-se na hipótese de que as duas cargas da bradicinina, as duas argininas das extremidades, apresentam comportamento semelhante a dois íons de Na^+ , inclusive com constante de associação semelhante à do sódio. Este também é um trabalho a ser mais desenvolvido.

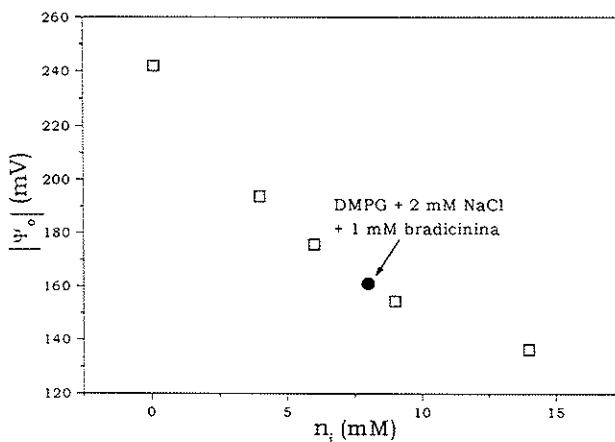


Fig. IV.6.3. Variação com a força iônica do meio do potencial eletrostático de superfície de vesículas de DMPG, calculado a partir dos valores da partição P , com o modelo de dois sítios descrito no texto, para amostras de 10 mM DMPG em diferentes meios (água, 10 mM Hepes + 0, 2, 5 e 10 mM NaCl, correspondendo a valores de força iônica $n_i = 0,1; 4; 6; 9$ e 14 mM, respectivamente) e 10 mM DMPG em 10 mM Hepes + 2mM NaCl + 1 mM bradicinina (assumindo $n_i = 8$ mM).

Com relação às características da região da superfície da bicamada de DMPG monitorada pelo dCAT1 em presença de bradicinina, vemos na Fig. IV.6.4 que o microambiente onde se encontra o marcador apresenta polaridade bastante maior (maior valor de a_o) e viscosidade um pouco menor (τ_1 menor) do que aquele visto pelo marcador em DMPG para as várias forças iônicas. Para comparação, reproduzimos na Fig. IV.6.4 somente os valores obtidos em DMPG + 2 mM de NaCl pois os valores em maiores forças iônicas são muito semelhantes (ver Fig. IV.5.6). Ainda para comparação, incluímos os valores de a_o e τ_1 do dCAT1 livre em solução. Em presença do peptídeo o valor de a_o (16,6 G a 25 °C) corresponde a uma região de índice de polaridade $H \approx 0,9$ (ver Fig. IV.5.7), muito próximo de 1,0 obtido para água pura.

É interessante notar que o efeito de aumento de a_o é significativamente maior do que o de diminuição de τ_1 , indicando que, na presença do peptídeo, o dCAT1 monitora uma região um pouco menos empacotada, mas muito mais polar. Este resultado deve ser correlacionado com as informações que temos para os peptídeos melanotrópicos, que mostram que a presença destas moléculas na superfície da bicamada empacota esta região como um todo (Fig. II.4.2). Portanto, o fato do dCAT1 próximo à superfície de vesículas de DMPG estar mais livre na presença da

bradicinina, deve estar informando que ele está, em média, em uma região um pouco mais externa do que aquela em que ele se encontra na ausência do peptídeo. O grande aumento de α_0 traz uma informação importante para a discussão mais geral do perfil de polaridade na superfície de membranas. Ou a polaridade da superfície varia muito com pequenas variações de profundidade, ou o peptídeo é o responsável por esta grande variação, pois traria consigo muitas moléculas de água.

O interesse em discutir aqui estes resultados preliminares está na apresentação de um exemplo onde a utilização do método desenvolvido com o marcador de spin dCAT1, catiônico, aquo-solúvel, pode ser muito informativa.

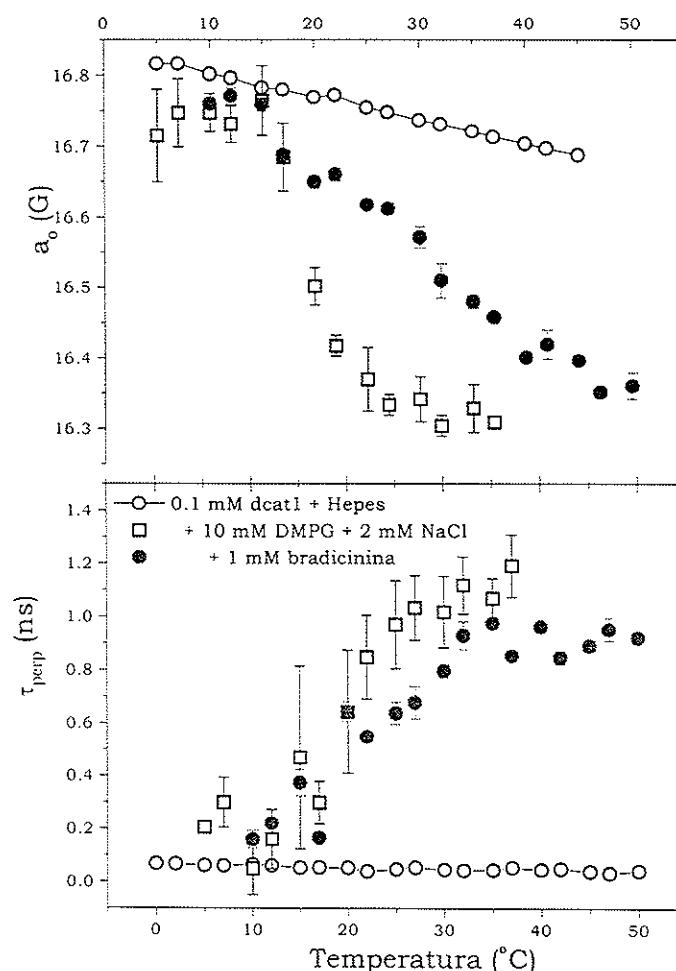


Fig. IV.6.4. Variação com a temperatura do desdobramento hiperfino isotrópico (α_0) e do tempo de correlação perpendicular (τ_{\perp}) dos espectros de RPE do dCAT1 (0,1 mM) livre em solução, em 10 mM DMPG + 2 mM NaCl sem e com 1 mM bradicinina.

7. Resultados preliminares com 16-PCSL em dispersões de DMPG

(Em colaboração com Barney Bales e Otaciro R. Nascimento, e também parte dos trabalhos dos estudantes Roberto M. Fernandez e Rozane F. Turchiello)

Na seqüência de apresentação de dados preliminares, ainda não muito bem compreendidos, mas interessantes, estão mostrados aqui alguns resultados obtidos

com o derivado de fosfolipídio, marcado no carbono 16 da cadeia acila, 16-PCSL, incorporado em dispersões de DMPG. Semelhante ao obtido para os outros marcadores de spin, a variação dos espectros de RPE deste marcador com a temperatura, mostra a transição de fase gel-líquido cristal do lipídio. Como esperado, os espectros são mais móveis do que aqueles obtidos com o 12-PCSL, por monitorarem uma região mais central da bicamada lipídica, portanto mais fluida, e também devido à maior amplitude de movimento da extremidade da cadeia hidrocarbonada. O que nos surpreendeu foi a forma de linha observada para algumas amostras, em um certo intervalo de temperatura. Na Fig. IV.7.1 estão mostrados os espectros de 16-PCSL incorporado em dispersões de 10 mM de DMPG em diferentes forças iônicas, a 25 °C. Observamos a presença de dois picos na região de campo alto para as amostras que estão na região de baixo espalhamento, ou seja DMPG em H₂O, Hepes, e Hepes + 2 e +5 mM da NaCl (ver Fig. IV.5.1). Para Hepes + 10 mM de NaCl, 25 °C é uma temperatura limite entre as regiões de baixo e alto espalhamento de luz. Para as amostras que espalham muita luz, como DMPG em Hepes + 100 mM de NaCl ou DMPC em Hepes, o espectro é típico de marcador no regime de movimento rápido, com três linhas diferentemente alargadas pelo movimento (Apêndice 1).

Observamos que os dois picos em campo alto também estão presentes em espectros de 16-SASL incorporado nas mesmas amostras, mas praticamente não são vistos com 16-MESL (Fig. IV.7.2). Este resultado é interessante, pois confirma outros dados que temos (não apresentados) que mostram que os marcadores MESL penetram mais profundamente na bicamada lipídica do que os PCSL e SASL. Portanto, talvez devido à região da membrana onde eles se situam, o 16-PCSL e o 16-SASL estão dando uma informação extremamente particular sobre as dispersões de DMPG.

A grande motivação que tivemos na utilização dos programas de simulação de espectros de RPE, para região de movimento lento, e/ou com alinhamento preferencial das cadeias acilas, desenvolvidos pelo grupo de Cornell, liderados por Freed (ver Apêndice 1), foi o interesse na análise dos espectros mostrados na Fig. IV.7.1. A questão que tínhamos, e ainda persiste, diz respeito à possibilidade, ou não, do sinal gerado por 16-PCSL em DMPG, na região de baixo espalhamento, poder ser atribuído ao marcador em somente um microambiente. Ou seja: os dois picos que vemos na região de campo alto correspondem, necessariamente, a dois sinais, ou podem ter sido gerados pelo 16-PCSL em um único sítio, mas com certa anisotropia no movimento?

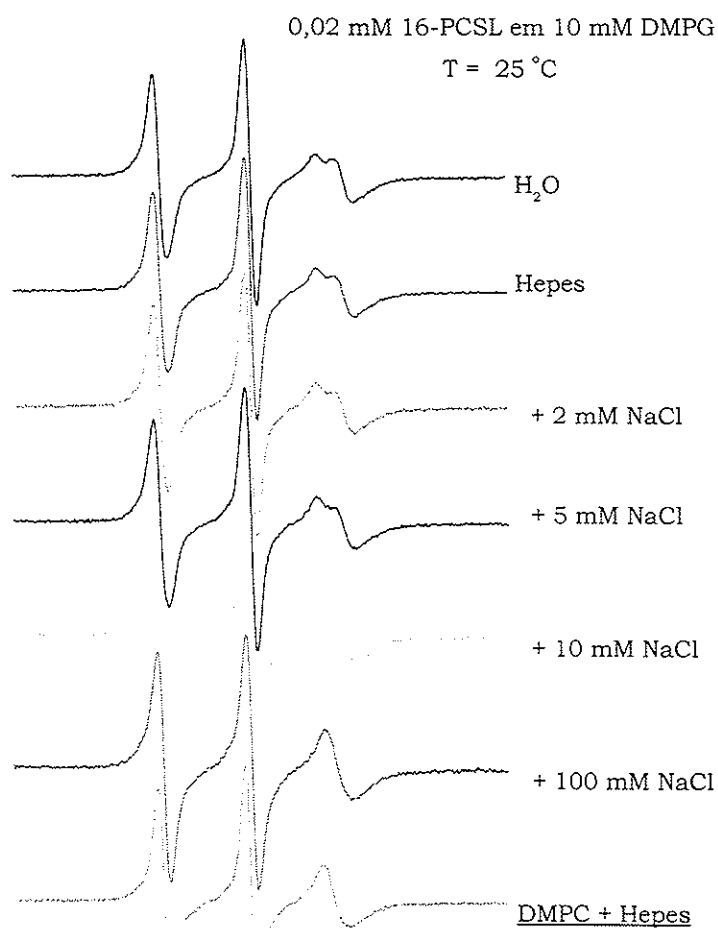


Fig. IV.7.1. Espectros de RPE de 16-PCSL incorporado em vesículas de DMPG em diferentes meios. Para comparação está mostrado o sinal de RPE obtido com o mesmo marcador em DMPC. Varredura total 80 G.

Enquanto fazíamos várias tentativas de simulação (a melhor delas está mostrada na Fig. IV.7.3a, em tracejado), observamos que a forma do sinal de RPE do 16-PCSL em DMPG a 25 °C é drasticamente modificada em presença de peptídeos que interagem com a membrana lipídica, por exemplo α-MSH (ou bradicinina), fazendo com que desapareça um dos dois picos antes observados em campo alto (Fig. IV.7.3b). Tanto o espectro de DMPG em alta concentração iônica (Fig. IV.7.1), como o espectro aqui mostrado para DMPG + peptídeo (Fig. IV.7.3b), são semelhantes a espectros obtidos em presença de 16-PCSL incorporado em outras membranas (Dehlinger e col., 1974; Ge e Freed, 1993).

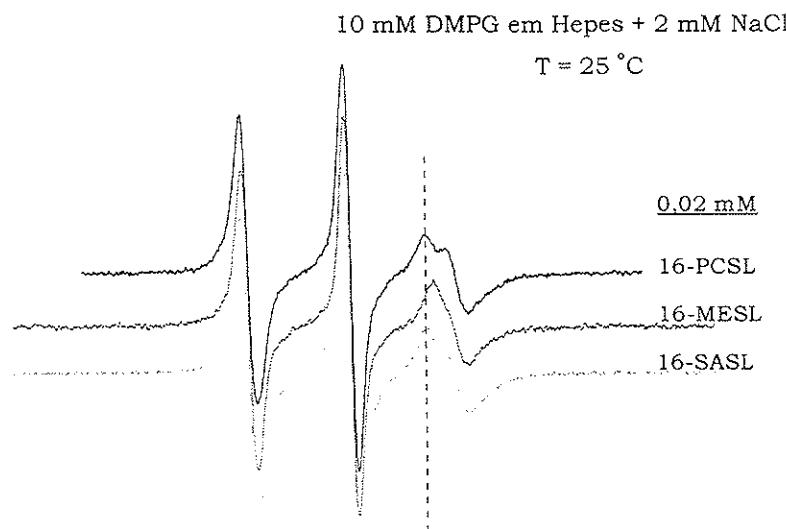


Fig. IV.7.2. Espectros de RPE de três marcadores de spin anfifílicos, marcados no carbono 16 da cadeia acila, incorporados em vesículas de DMPG.

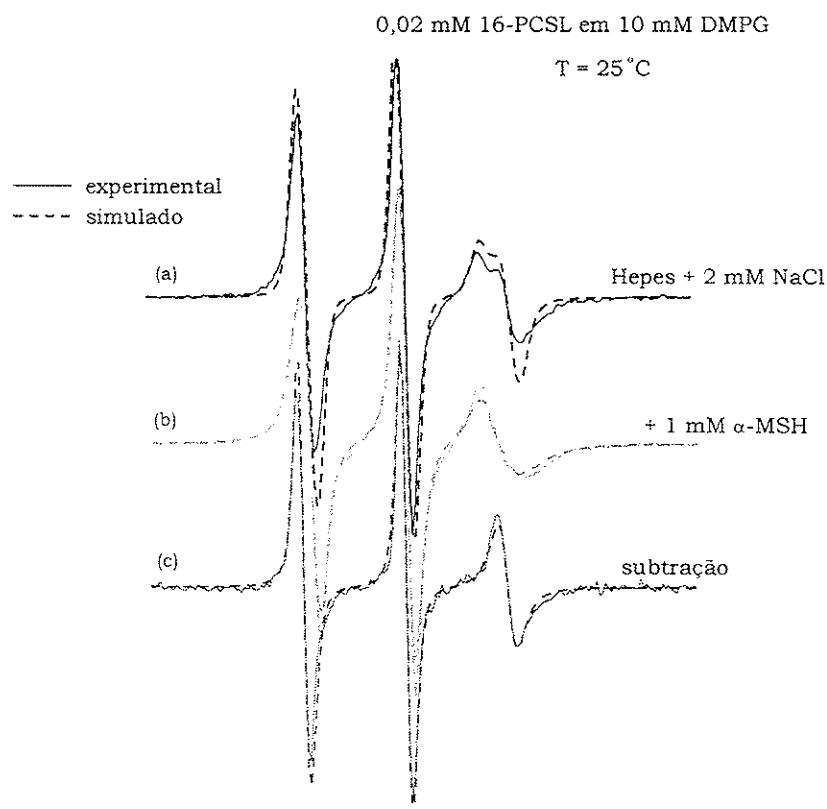


Fig. IV.7.3. Espectros de RPE de 16-PCSL incorporado em vesículas de (a) DMPG; (b) DMPG + peptideo. (c) subtração, (a) - 0,79(b), caso as áreas estivessem normalizadas. Varredura total 80 G.

Dada a forma do sinal de RPE obtido na presença de peptídeo, pensamos na possibilidade do espectro do 16-PCSL em DMPG na região de baixo espalhamento, poder ser decomposto em um sinal semelhante àquele obtido na presença do peptídeo e algum outro sinal. Na Fig. IV.7.3c mostramos o espectro resultante da subtração (a) -0,79(b), isto é, DMPG em Hepes + 2 mM NaCl menos DMPG em Hepes + 2 mM NaCl + 1 mM α -MSH. (O fator 0,79 foi calculado através da 2^a integral dos espectros antes e depois da subtração). Este espectro resultante é um sinal de RPE típico de movimento rápido (na região de *motional narrowing*) e com baixa anisotropia. Suas três linhas podem ser muito bem reproduzidas por linhas Voigt (Halpern e col., 1993), e a análise do espectro, segundo Bales (1989) e Marsh (1989), resulta nos parâmetros: $ao = 15,02$ G; $\tau_B = 0,68$ ns e $\tau_C = 0,79$ ns (Eq. A1.11), indicando que o movimento é aproximadamente isotrópico.

Estão mostradas na Fig. IV.7.3, em tracejado, as melhores simulações que conseguimos até o momento, usando a metodologia desenvolvida por Freed e colaboradores (ver referências no Apêndice 1). De fato, as ótimas simulações que conseguimos para o lipídio em presença do peptídeo (Fig. IV.7.3b tracejado) e para o espectro subtraído⁹ (Fig. IV.7.3c tracejado), quando comparadas à obtida somente com o lipídio (Fig. IV.7.3a tracejado), sugere que o espectro obtido com 16-PCSL em DMPG é um espectro composto, não podendo ser simulado com o modelo do marcador em um só sítio.

Os parâmetros usados para as simulações estão mostrados na tabela IV.7.1, onde, como de costume, os valores principais do tensor hiperfino estão dados por A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} (baseados em Ge e Freed, 1993), α_D , β_D e γ_D são os ângulos de Euler que levam os eixos magnéticos nos eixos principais de difusão (Apêndice 1), $\tau_{//}$ e τ_{\perp} foram calculados dos coeficientes de difusão $D_{//}$ e D_{\perp} ($\tau = 1/6D$), e c_{20} é o primeiro coeficiente que aparece na expressão do potencial restaurador (Apêndice 1), a partir do qual é possível calcular o parâmetro de ordem S (ver Fig. 8 em Schneider e Freed, 1989). A Fig. IV.7.3b mostra que o espectro do 16-PCSL em DMPG + peptídeo pode ser razoavelmente bem simulado assumindo-se um baixo parâmetro de ordem ($S = 0,13$), um movimento anisotrópico em torno do eixo **z** do nitróxido, com $\tau_{//} \approx \tau_{\perp}/8,5$, com os eixos magnéticos paralelos aos eixos de difusão. O espectro resultante da subtração mostra uma grande isotropia de movimento, com um pequeno grau de ordem.

⁹ Os parâmetros obtidos nos ajustes das três linhas do espectro subtraído por linhas Voigt, ao e τ , foram usados na simulação mostrada na Fig. IV.7.3c.

Tabela IV.7.1. Parâmetros usados na simulação^a dos espectros (a), (b) e (c) da Fig. IV.7.3

Sistema	A _{xx} (G)	A _{yy} (G)	A _{zz} (G)	α _D	β _D	γ _D	τ (ns)	τ _⊥ (ns)	c ₂₀	S
DMPG em Hepes										
+ 2 mM NaCl (a)	5,0	5,1	33,0	0°	68°	40°	0,24	0,27	2,00	0,44
+ 1 mM α-MSH (b)	5,3	5,3	32,5	0°	0°	0°	1,03	1,21	0,60	0,13
subtração (c)	5,3	5,3	34,4	0°	0°	0°	0,79	0,67	0,12	0,05

^aSimulados de acordo com Schneider e Freed (1989). Para o significado dos parâmetros ver texto e Apêndice 1.

Apesar da simulação do espectro do 16-PCSL em DMPG + 2 mM NaCl (Fig. IV.7.3a tracejado) não ser muito boa, é impossível afirmar, com certeza, que este espectro é composto pelos dois sinais mostrados na Fig. IV.7.3b e c. Entretanto, baseado na subtração mostrada na Fig. IV.7.3, e nas simulações, esta nos parece a melhor hipótese no momento. Sua interpretação é complicada: quais seriam estes dois microambientes vistos pelo 16-PCSL? Para tentar responder esta questão vamos obter o sinal de RPE com outra freqüência de microondas, banda Q ($v = 35$ GHz). As principais vantagens que vemos na utilização de uma maior freqüência são a possível separação de sinais de diferentes valores de g , e a simulação dos espectros nas duas faixas de freqüência, o que reforçaria a confiança nos parâmetros usados nas mesmas. Por outro lado, para melhor compreensão das dispersões de DMPG, foram iniciadas medidas de espalhamento de raio X a baixo ângulo e RMN, em colaboração com as professoras Lia Queiroz do Amaral do IFUSP e Shirley Schreier do IQUSP, respectivamente.

V. Conclusões

Apresentamos e discutimos aqui algumas propriedades estruturais e dinâmicas de moléculas biologicamente relevantes, de agregados lipídicos, e de suas interações. Mostramos que várias técnicas espectroscópicas, RPE, espalhamento elástico de luz, dicroísmo circular e fluorescência, complementam-se, "enxergando" diferentes aspectos em um mesmo sistema. Foi dado ênfase ao estudo da RPE de radicais livres, estes últimos usados como sondas paramagnéticas. Essas moléculas repórter, usadas em muito baixa concentração, a fim de causarem a menor perturbação possível ao sistema em estudo, foram tanto incorporadas às vesículas lipídicas (marcadores de spin anfifílicos, do tipo CSL, SASL, MESL e PCSL), como usadas em solução (dCAT1), monitorando a superfície das bicamadas.

Com marcadores de spin em bicamadas lipídicas, mostramos que tanto o hormônio α -MSH, como o análogo biologicamente mais ativo MSH-I, interagem com vesículas de DMPG, modificando a fluidez da bicamada lipídica. Para que seja observado o efeito causado pelos peptídeos é fundamental que a membrana seja negativamente carregada, certamente para aumentar a concentração local de peptídeo em sua superfície, facilitando a interação peptídeo-lipídio. Concluímos que ambos os peptídeos penetram, em parte, na bicamada lipídica, sendo as alterações por eles causadas diferentes daquelas relacionadas simplesmente a aumento de força iônica do meio. O efeito do análogo mais ativo, MSH-I, é nitidamente maior do que o efeito observado com o hormônio α -MSH. Apesar das discrepâncias observadas nos valores das constantes de partição peptídeo-membrana, calculados com marcadores de spin incorporados na bicamada, ou através da variação da intensidade de fluorescência do peptídeo, podemos afirmar que o análogo apresenta maior partição na fase lipídica. Além disso, estando os dois peptídeos em uma mesma concentração na membrana, o efeito do análogo é mais evidente (Fig. II.5.6). Considerando as alterações que os peptídeos provocam nas bicamadas lipídicas, pode-se supor que, talvez, a interação peptídeo-lipídio seja relevante na ação biológica destas moléculas. Por exemplo, a maior atividade biológica do MSH-I poderia estar relacionada tanto com sua maior partição na membrana, como com a diminuição marcante que ele provoca na fluidez da bicamada lipídica. Esta última induziria uma modificação conformacional apropriada na proteína receptora de membrana, que, juntamente com a maior concentração de MSH-I em sua vizinhança, e a estrutura ligeiramente modificada do peptídeo pela membrana (visto por dicroísmo circular), proporcionaria a ambos, peptídeo e receptor, condições ideais de interação.

Com relação à melatonina, nosso trabalho mostrou que este hormônio é bastante solúvel em meio aquoso, apesar de apresentar uma partição relativamente alta na membrana lipídica. Medidas de diálise, e de supressão de fluorescência da melatonina por marcadores de spin no interior da membrana, concluíram que esta molécula atravessa a bicamada lipídica, podendo, portanto, atuar no citoplasma e no núcleo de células, como sugerido por ensaios biológicos (Reiter e col., 1993; Tan e col., 1993), sem a necessidade de um transporte ativo para o interior da célula. Na presença de vesículas lipídicas, tanto a variação do espectro de fluorescência da melatonina, como marcadores de spin incorporados às vesículas, mostraram que este hormônio localiza-se, em média, na interface membrana/água. Estes resultados são importantes para a compreensão dos múltiplos papéis desempenhados pela melatonina no organismo, atuando fora e dentro das células, e como supressor de radicais livres no meio aquoso e lipídico (Garcia e col., 1997).

Espalhamento de luz mostrou-se uma técnica extremamente sensível na detecção tanto da transição de fase principal, gel-liquido cristal, como da pós-transição de vesículas de DMPG. Enquanto a transição principal foi muito estudada, estando relacionada à variação do empacotamento das cadeias hidrocarbonadas dos lipídios, e podendo ser monitorada por marcadores de spin incorporados à bicamada lipídica, muito pouco se sabe sobre a pós-transição de fase do DMPG. Nossa pesquisa tanto contribuiu para a melhor compreensão das alterações nas vesículas de DMPG na transição gel-liquido cristal, como trouxe algumas informações sobre a pós-transição. Sugerimos, baseado em nossos resultados de espalhamento de luz a vários ângulos, e medidas de potencial eletrostático de superfície com o marcador áquo-solúvel dCAT1, que a brusca diminuição de espalhamento de luz em T_m esteja relacionada com um aumento do potencial eletrostático de superfície das vesículas de DMPG. Para que exista este aumento, é necessário que cresça o grau de ionização dos lipídios, o que só é possível se postulamos uma diminuição da constante de ligação $\text{Na}^+ \text{-PG}^-$ na passagem da bicamada da fase gel para a líquido cristal. Com relação à pós-transição, além do brusco aumento de espalhamento de luz observado em T_{post} , e da diminuição da quantidade de ions em solução, temos indicações preliminares, ainda de difícil interpretação, de modificações estruturais nas dispersões de DMPG com o marcador áquo-solúvel dCAT1, e com os marcadores 16-PCSL e 16-SASL.

O trabalho apresentado retrata as principais linhas de pesquisa que temos desenvolvido nos últimos anos. Ele é o resultado da colaboração entre vários pesquisadores das áreas de física e de ciências biológicas, sendo fruto do nosso grupo de Biofísica e Física Médica do IFUSP. Professores e alunos, formados em

física, e encantados com as áreas biológicas, temos nos dedicado a aplicar métodos e modelos físicos no entendimento de diferentes sistemas de interesse biológico. A experiência que temos adquirido, com as críticas e conseqüentes aperfeiçoamentos a estes métodos e modelos, transcende os sistemas específicos apresentados. Mostramos aqui a fotografia de um processo em movimento, o "estado da arte" em agosto de 1998. Como discutido ao longo de texto, várias contribuições foram dadas ao melhor conhecimento das vesículas lipídicas, e suas interações com diferentes moléculas. Alguns resultados mencionados necessitam melhor compreensão, e vários outros, que aqui não aparecem, estão em desenvolvimento ou gestação. Assim é o trabalho em ciência, sendo, talvez, principalmente complexo, e portanto desafiante, o trabalho nesta área interdisciplinar, onde coexistem física, química e biologia.

Apêndice 1 - RPE de marcadores de spin

(Principalmente baseado em Atherton, 1993; Marsh, 1981; Marsh, 1989 e Slichter, 1989)

Vamos resumir abaixo os modelos e métodos usados neste trabalho, na análise do sinal de RPE de marcadores de spin. Apesar de marcador de spin ser um nome genérico, podendo ser aplicado a qualquer sonda paramagnética, já há muitos anos este nome está principalmente relacionado a radicais nitróxido. Os vários marcadores de spin com o grupo nitróxido apresentam em comum a estrutura mostrada na Fig. A1.1, onde está desenhado o sistema de eixos moleculares geralmente utilizado. Estes eixos são, aproximadamente, os eixos principais dos tensores de 2^a ordem **g** e **A**, relacionados às interações Zeeman e hiperfina, segundo a Hamiltoniana de spin para um elétron desemparelhado:

$$\mathcal{H}_s = \beta \mathbf{H} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S}$$

onde β é o magneton de Bohr, **H** é o campo magnético estático aplicado, **S** e **I** são os operadores momento angular de spin do elétron desemparelhado e do núcleo (no caso do nitróxido, $I = 1$ para o ¹⁴N), respectivamente. A anisotropia espacial da molécula está colocada nos tensores **g** e **A**.

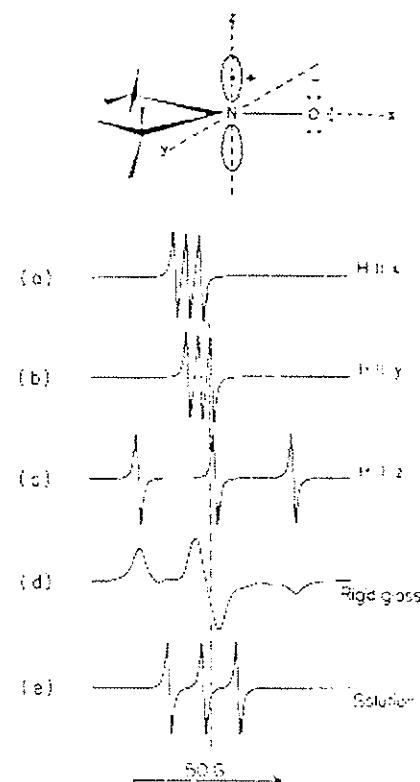


Fig. A1.1. Esquema do radical nitróxido usado como marcador de spin, e seus espectros de RPE em diferentes condições: (a), (b) e (c) como impureza em cristal diamagnético com $H_0 //$ aos eixos x, y e z, respectivamente; (d) em solução congelada, espectro de pó; (e) em solução de baixa viscosidade, espectro isotrópico. (Fig. 3 em Marsh, 1981).

Na Fig. A1.1(a), (b) e (c) estão também mostrados os espectros de RPE (banda X) que podem ser obtidos com cristais diamagnéticos tendo o nitróxido como impureza diluída (para evitar interações spin-spin intermoleculares), com o campo magnético externo paralelo a cada um dos eixos moleculares. As três linhas correspondem a $m_l = +1, 0$ e -1 , no sentido crescente de H (esquerda para direita). Principalmente na interação hiperfina, fica evidente a grande assimetria existente entre os eixos x e y e o eixo z, este último paralelo ao orbital 2p- π do nitrogênio. Os valores principais dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} , medidos para dois tipos diferentes de marcadores de spin estão dados na Tabela A1.1

Tabela A1.1. Valores principais dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} (G).

	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
Doxil - cadeia alifática ^a (SASL e PCSL)	5,9	5,4	32,9	2,0088	2,0058	2,0022
Doxil - colesterol ^b (CSL)	5,8	5,8	30,8	2,0089	2,0058	2,0021

(^aHubbell e McConnell, 1971; ^bJost et al., 1971)

Na Fig. A1.1(d) e (e) estão mostrados os espectros de RPE obtidos nos dois limites: movimento lento, espectro de pó; e movimento rápido, solução de baixa viscosidade. Neste último caso, as flutuações térmicas promediam a anisotropia dos termos da Hamiltoniana de spin. Os tempos para comparação são relativos ao inverso das anisotropias de \mathbf{A} e \mathbf{g} [$(A_{zz} - A_{xx}) \approx 70$ MHz, sendo ΔA (em Hz) = ΔA (em G) $g\beta/h$; $(g_{xx} - g_{zz})\beta H/h \approx 30$ MHz para $H = 3300$ G]. No espectro da Fig A1.1(e) os valores de g e A são as médias dos valores nas três direções: $g_o \equiv (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3 \approx 2,0056$ e $a_o \equiv (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3 \approx 15$ G. A interação hiperfina tem uma componente anisotrópica, referente à interação dipolo-dipolo (equivalente à interação clássica), e uma parte isotrópica, puramente quântica, a interação de contato de Fermi, relacionada à probabilidade de encontrar o elétron desemparelhado no núcleo do ^{14}N . Como dito anteriormente, para movimentos rápidos a interação dipolar é promediada, e o que se observa é o desdobramento hiperfino a_o , referente à interação isotrópica de contato¹.

O grande sucesso na utilização do nitróxido como sonda reside em sua grande estabilidade química, e também na sua anisotropia espectral. Esta última característica é fundamental para a análise tanto da velocidade como da amplitude do movimento dos marcadores de spin: a primeira relacionada com os tempos de

correlação, e a segunda com o parâmetro de ordem da molécula, como será discutido abaixo.

Equações de Bloch

Antes de discutir o movimento das moléculas, vamos lembrar alguns conceitos básicos sobre a forma de linha do sinal de RPE, definindo os tempos de relaxação T_1 e T_2 a partir das equações fenomenológicas clássicas de Bloch:

$$\begin{aligned}\frac{dM_Z}{dt} &= \gamma(\mathbf{H} \times \mathbf{M})_Z + \frac{(M_0 - M_Z)}{T_1} \\ \frac{dM_X}{dt} &= \gamma(\mathbf{H} \times \mathbf{M})_X - \frac{M_X}{T_2} \\ \frac{dM_Y}{dt} &= \gamma(\mathbf{H} \times \mathbf{M})_Y - \frac{M_Y}{T_2}\end{aligned}\quad (\text{A1.1})$$

sendo X, Y e Z eixos fixos no laboratório. Estas são equações de movimento para a magnetização total \mathbf{M} do sistema. O campo magnético \mathbf{H} é a soma de um campo estático na direção Z, H_0 , e um campo oscilante no tempo (microonda), aplicado no plano XY. Os primeiros termos à direita, nas três equações, estão relacionados com a precessão do vetor \mathbf{M} em torno do campo \mathbf{H} ($\gamma = g\beta$ = fator giromagnético do elétron). Os outros termos das equações definem os tempos de relaxação longitudinal e transversal, T_1 e T_2 , que caracterizam a volta da magnetização para a situação de equilíbrio térmico, após o desligamento da microonda, quando $M_Z = M_0$ e $M_X = M_Y = 0$.

Em geral, a resposta de um sistema magnético sujeito a uma perturbação senoidal (microonda),

$$H_x(t) = 2 H_1 \cos \omega t$$

pode ser avaliada em termos da magnetização induzida,

$$M_X = 2 H_1 \chi' \cos \omega t + 2 H_1 \chi'' \sin \omega t \quad (\text{A1.2})$$

proporcional a H_1 , onde χ' e χ'' são as componentes em fase e fora de fase, respectivamente, da susceptibilidade magnética do sistema. (Este é um resultado geral de resposta linear, ver, p. ex., Marshall, 1978, cap. 13→17):

Pode ser mostrado que a potência média absorvida pelo sistema $P(\omega)$, relacionada com o sinal de RPE observado $f(\omega)$, é dada por:

$$\overline{P(\omega)} \propto f(\omega) \propto \omega (2H_1)^2 \chi'' \quad (\text{A1.3})$$

¹ $A_{ii} = A_{ii}^d + A_{ii}^{iso}$, para $i = x, y$ ou z , e os índices d e iso significam dipolar e isotrópica, respectivamente. Mostra-se que $\sum_i A_{ii}^d = 0 \therefore \sum_i A_{ii} = \sum_i A_{ii}^{iso} = 3a_0$.

Muitas vezes é conveniente olhar tanto $M_x(t)$ como $H_x(t)$ como a parte real das respectivas funções complexas, $M_x^C(t)$ e $H_x^C(t)$, e definir uma susceptibilidade magnética complexa $\chi = \chi' - i\chi''$, de tal maneira que:

$$\begin{aligned} H_x^C(t) &= 2H_1 e^{i\omega t} \\ M_x^C(t) &= \chi H_x^C(t) \end{aligned} \quad (\text{A1.4})$$

$$\text{e, portanto, } M_x = \operatorname{Re}\{\chi(2H_1)e^{i\omega t}\} \equiv \text{Eq. A1.2}$$

Resolvendo-se as equações de Bloch (Eq. A1.1) para variações lentas de ω e valores baixos de H_1 comparados com H_0 (estado estacionário), pode-se calcular χ'' , e, portanto a forma da linha do sinal de RPE:

$$f(\omega) \propto \frac{\gamma M_0 (1/T_2)}{(1/T_2)^2 + (\omega_0 - \omega)^2}$$

que é uma função Lorentziana centrada em $\omega_0 = \gamma H_0$, com largura de linha dada por $(1/T_2)$.

Velocidade do movimento - Tempos de correlação

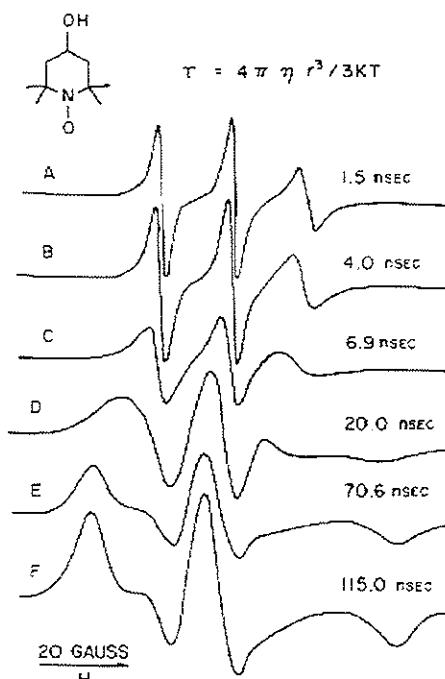


Fig. A1.2. Sinais de RPE da molécula mostrada acima (Tempol), em soluções de viscosidades crescentes de A a F: 0,116 poise, 273 K; 0,367 poise, 293 K; 0,523 poise, 293 K; 1,58 poise, 283 K; 5,77 poise, 273 K; 9,4 poise, 273 K. (Fig. 11.2 em Smith, 1972).

A Fig. A1.2 reproduz uma figura clássica, onde aparecem os sinais de RPE de um nitróxido aquo-solúvel, em meios de diferentes viscosidades (η). Neste caso foi utilizada a equação de Stokes-Einstein para o cálculo dos tempos de correlação

rotacional ($\tau = (4\pi\eta r^3)/(3kT)$ onde r é o raio hidrodinâmico da partícula que difunde, k a constante de Boltzman e T a temperatura em Kelvin). A variação da forma do espectro de RPE com o tempo de correlação² é evidente.

Com relação à análise do sinal de RPE em banda X ($\nu \approx 9 \times 10^9$ Hz), podemos dividir os tempos de correlação em quatro regiões:

$\tau \leq 10^{-11}$ s - A espectroscopia de RPE é insensível a flutuações mais rápidas do que 10^{-11} s. Em caso de movimento isotrópico (discutiremos mais abaixo o caso de movimento anisotrópico), o sinal de RPE do nitróxido apresenta três linhas de igual intensidade, do qual só é possível a obtenção dos valores médios a_0 e g_0 ;

$10^{-11} \leq \tau \leq 3 \times 10^{-9}$ - É a chamada região de movimento rápido, ou de *motional narrowing*, onde o alargamento diferencial das três linhas de RPE dá informação sobre a velocidade de movimento da molécula – corresponde ao espectro A na Fig. A1.2, e, no limite, ao espectro B. Vamos discutir essa região com mais detalhes abaixo, esquematizando a teoria de Redfield.

$3 \times 10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7}$ - Nesta região as linhas de RPE, além de alargarem, mudam de posição (corresponde aos espectros C → E na Fig. A1.2), sendo necessário um modelo mais complexo de simulação dos espectros, desenvolvido pelo grupo da Cornell University, liderado J. H. Freed. Mais adiante faremos um esboço deste modelo.

$10^{-7} \leq \tau$ - Nesta região o espectro é um típico espectro de pó (corresponde ao espectro F na Fig. A1.2), soma dos sinais correspondentes à molécula em todas as direções relativas ao campo magnético externo. A RPE convencional não é mais sensível, podendo, entretanto, ser utilizado outras técnicas, como transferência de saturação, ELDOR ou RPE pulsada.

i. Região de movimento rápido - $10^{-11} \leq \tau \leq 3 \times 10^{-9}$

A pergunta que sempre tentamos responder é: como, a partir da forma das linhas do sinal de RPE do nitróxido, inferir o movimento da molécula? Faremos abaixo um resumo da teoria desenvolvida por Redfield para movimento rápido, com a utilização da matriz densidade, principalmente baseado em Atherton (1993) e Slichter (1989). Vamos esquematizar como a utilização da matriz densidade permite

² O tempo de correlação caracteriza a velocidade de "tombamento" (rotação aleatória) da molécula. Ele é definido na expressão da função de correlação (de modo que $\mathcal{R}(t) \approx \mathcal{R}(t - \tau)$, Eq. A1.6). Qualitativamente, é o tempo τ em que a orientação espacial da molécula varia muito pouco.

obter as equações de Bloch, e expressões para T_2 , com base em modelos microscópicos que procuram descrever processos de relaxação no sistema devido ao movimento das moléculas.

Considere um partícula descrita por uma função de onda $\Psi(t) = \sum_n c_n(t)u_n$,

onde u_n é um conjunto completo de funções ortogonais, independentes do tempo. A média no ensemble (sistema de muitos spins) do valor esperado de um certo operador, p. ex. a componente da magnetização na direção X, pode ser escrita como:

$$\langle \overline{M_X} \rangle = \sum_{n,m} \overline{c_n c_m^*} \langle m | M_X | n \rangle$$

Define-se uma matriz densidade ρ tal que seus elementos são dados por:

$$\rho_{nm} = \langle n | \rho | m \rangle = \overline{c_n c_m^*}$$

de modo que $\langle \overline{M_X} \rangle = \text{Tr}\{\rho M_X\}$. Pode-se mostrar que a equação de movimento da matriz densidade, para um sistema descrito por uma Hamiltoniana \mathcal{H} é

$$\frac{d\rho}{dt} = \frac{i}{\hbar} [\rho, \mathcal{H}]$$

que corresponde à equação de Liouville para sistemas quânticos.

Queremos calcular $\langle \overline{M_X} \rangle = -g\beta \langle \overline{S_X} \rangle$, para chegarmos a uma expressão para χ'' , portanto para a forma da linha de absorção da microonda. Para tanto é necessário o cálculo de ρ . Isto é feito com a utilização da teoria de perturbação dependente do tempo.

A Hamiltoniana de um elétron é considerada $\mathcal{H}(t) = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_1(t) + \mathcal{H}_2(t)$, sendo:
 \mathcal{H}_0 a parte das interações Zeeman e hiperfina não dependentes do tempo (isotrópicas);

$\mathcal{H}_1(t) \ll \mathcal{H}_0$ flutuações aleatórias das componentes anisotrópicas das duas interações, causadas pelo movimento da molécula;

$\mathcal{H}_2(t) \ll \mathcal{H}_0$ campo senoidal da microonda

E chega-se a uma expressão para a variação de um elemento da matriz densidade com o tempo:

$$\frac{d\rho_{\alpha\alpha'}(t)}{dt} = \frac{1}{\hbar} [\rho(t), \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_2(t)]_{\alpha\alpha'} + \sum_{\beta\beta'} R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} (\rho_{\beta\beta'}(t) - \rho_{\beta\beta'}^0) \quad (\text{A1.5})$$

(8.7.4, Atherton)

onde $|\alpha\rangle$, $|\alpha'\rangle$, $|\beta\rangle$, $|\beta'\rangle$, são autofunções de \mathcal{H}_0 , $\rho_{\beta\beta}^0$ são os elementos da matriz densidade no equilíbrio térmico, e os coeficientes $R_{\alpha\alpha'\beta\beta'}$ formam a chamada matriz relaxação, dada por:

$$R_{\alpha\alpha'\beta\beta'} = \frac{1}{\hbar^2} \left\{ j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) + j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\beta'\alpha'}) - \delta_{\alpha\beta} \sum_{\gamma} j_{\beta'\gamma\alpha'\gamma}(\omega_{\beta'\gamma}) - \delta_{\alpha'\beta'} \sum_{\gamma} j_{\alpha\gamma\beta\gamma}(\omega_{\gamma\beta}) \right\}$$

(8.5.32, Atherton)

Sendo $\omega_{\alpha\alpha'} = (E_{\alpha} - E_{\alpha'}) / \hbar$, e j a função densidade espectral, dada por:

$$j_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\omega_{\alpha\beta}) = \int_0^{\infty} G_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\tau) e^{-i\omega_{\alpha\beta}\tau} d\tau$$

sendo, portanto, a transformada de Fourier da função de correlação, $G_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\tau)$, que caracteriza as flutuações aleatórias,

$$G_{\alpha\beta\alpha'\beta'}(\tau) = \overline{\langle \alpha | \mathcal{H}, (t - \tau) | \beta \rangle \langle \beta' | \mathcal{H}, (t) | \alpha' \rangle} \quad (\text{A1.6})$$

A expressão de $G(\tau)$ depende do modelo físico escolhido para as flutuações aleatórias, mas em geral tem a forma exponencial, $\sim e^{-\tau/\tau_c}$, onde τ_c é o tempo de correlação rotacional do movimento.

Considerando como exemplo o sistema de dois níveis, $S = 1/2$ e $I = 0$, e, portanto, a matriz densidade composta por quatro termos, ρ_{11} , ρ_{12} , ρ_{21} , ρ_{22} , a Eq. A1.5 pode ser escrita:

$$\frac{d\rho_{21}}{dt} = \frac{1}{2} i\omega_1 (\rho_{22} - \rho_{11}) + i\rho_{21}(\omega_0 - \omega) + R_{2121}\rho_{21}$$

(8.7.5, Atherton)

Com as mesmas aproximações usadas para a solução das equações de Bloch, ou seja, campo da microonda pouco intenso, comparado com H_0 , e variação lenta de ω , pode-se resolver a equação acima (estado estacionário, $d\rho_{21}/dt \approx 0$). Através do cálculo de $\overline{\langle M_X \rangle} = -g\beta\langle S_X \rangle = -g\beta\text{Tr}\{\rho S_X\}$, e usando as equações A1.2 → A1.4, chega-se a um resultado equivalente ao obtido com as equações fenomenológicas de Bloch, mostrando que:

$$f(\omega) \propto \rho_{21}^i \propto \frac{-\omega_1(\rho_{22}^0 - \rho_{11}^0)R_{2121}^r}{(R_{2121}^r)^2 + (\omega_0 - \omega + R_{2121}^i)^2}$$

onde $(\rho_{22}^0 - \rho_{11}^0)$ é a diferença de população dos dois estados no equilíbrio térmico ($\propto M_0$), e identifica-se $(-R_{2121}^r)$ com $1/T_2$ (r e i significam as partes real e imaginária dos valores). De maneira geral mostra-se que a largura de linha Lorentziana de uma transição $\alpha\alpha'$ é dada por:

$$\left(\frac{1}{T_2} \right)_{\alpha\alpha'} = -R_{\alpha\alpha'\alpha\alpha'}^r \quad (A1.7)$$

A teoria de Redfield, esquematizada acima, além de assumir que \mathcal{H}_e e \mathcal{H}_o são pequenas perturbações em \mathcal{H}_o , assume que o tempo de correlação τ é muito menor do que os tempos de relaxação T_1 e T_2 , sendo por isso válida somente na região de movimentos rápidos.

Para o nitróxido ($S = 1/2$ e $I = 1$), usando como autofunções de \mathcal{H}_o o produto das autofunções de S_z e I_z , $\alpha = |-1/2, m_I\rangle$ e $\alpha' = |1/2, m_I\rangle$, a Eq. A1.7, e uma função de correlação do tipo e^{-t/τ_c} , é possível mostrar que

$$\left(\frac{1}{T_2} \right)_{m_I} = a + b m_I + c m_I^2 \quad (A1.8)$$

Sendo a , b e c dependentes do campo magnético externo, das anisotropias dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , A_{xx} , A_{yy} e A_{zz}), e do tempo de correlação das moléculas:

$$a = \left(\frac{\beta B_o}{\hbar} \right)^2 (g^0 : g^0) \left\{ \frac{2}{15} \tau_c + \frac{1}{10} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\} + I(I+1) (A^0 : A^0) \left\{ \frac{1}{20} \tau_c + \frac{7}{60} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\}$$

$$b = \left(\frac{\beta B_o}{\hbar} \right)^2 (g^0 : A^0) \left\{ \frac{4}{15} \tau_c + \frac{1}{5} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\}$$

$$c = \left(\frac{1}{\hbar} \right)^2 (A^0 : A^0) \left\{ \frac{1}{12} \tau_c - \frac{1}{60} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \right) \right\}$$

(9.2.48 → 9.2.51, Atherton)

Considerando $T^0 = A^0$ ou g^0 , a parte anisotrópica dos tensores \mathbf{A} e \mathbf{g} , $(T^0 : T^0)$ significa a soma dos produtos dos valores principais dos tensores A^0 e g^0 . B_o é o campo externo e ω a freqüência angular de ressonância do elétron ($2\pi\nu$)

Nas equações acima fica explícito a dependência da largura da linha com o número quântico de spin, observada nos espectros de RPE de nitróxidos (Fig. A1.2). Além disso, fica claro que, se τ_c diminui, a largura de linha diminui, o que caracteriza a região de *motional narrowing*.

Para o cálculo de tempos de correlação pode-se assumir o modelo de difusão rotacional Browniana com simetria axial. Neste modelo a densidade de probabilidade $p(\phi, \theta, \psi, t)$ de encontrar a molécula em uma posição definida pelos ângulos de Euler ϕ , θ e ψ (caracterizam a orientação da molécula com relação ao laboratório) em um tempo t , é dada pela solução da equação de difusão (ver Marsh, 1989, e as referências lá citadas):

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D_{R\perp} \left\{ \frac{1}{\sin\theta} \frac{\partial}{\partial\theta} \left(\sin\theta \frac{\partial}{\partial\theta} \right) + \frac{1}{\sin^2\theta} \frac{\partial^2}{\partial\phi^2} - \frac{2\cos\theta}{\sin^2\theta} \frac{\partial^2}{\partial\phi\partial\psi} + \left(\cot^2\theta + \frac{D_{R//}}{D_{R\perp}} \right) \frac{\partial^2}{\partial\psi^2} \right\} p \quad (\text{A1.9})$$

sendo $D_{R//}$ e $D_{R\perp}$ os coeficientes de difusão rotacional em torno do eixo de simetria do movimento e perpendicular a este. Neste modelo, escreve-se a função de correlação:

$$G_L(\tau) \propto \sum_{K=-L}^{+L} g_{LK} e^{-\tau/\tau_{L,K}}$$

onde o índice L diz respeito a ordem do tensor esférico, sendo os tempos de correlação rotacional $\tau_{L,K}$ as soluções da equação de difusão:

$$1/\tau_{L,K} = D_{R\perp} L(L+1) + (D_{R//} - D_{R\perp}) K^2.$$

Para a modulação das interações Zeeman e hiperfina (que podem ser expressas por harmônicos esféricos de 2ª ordem) é somente necessário que consideremos os termos com $L = 2$.

Pode-se reescrever a Eq. A1.8 em termos da largura de linha Lorentziana, medida pico a pico no espectro de RPE (1ª derivada), ΔH_{pp}^L , em função da varredura do campo magnético:

$$\Delta H_{pp}^L(m_1) = A + Bm_1 + Cm_1^2 \quad (\text{A1.10})$$

Para movimento isotrópico, $D_{R//} = D_{R\perp} = D_R$ e o tempo de correlação isotrópico $\tau_B^{\text{iso}} = \tau_C^{\text{iso}} = 1/6D_R$. B e C foram calculados usando-se os parâmetros dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} para marcadores de spin de cadeia alifática (Tabela A1), e $H_0 = 3300$ G, resultando em duas expressões para o cálculo do tempo de correlação (Schreier e col., 1978):

$$\begin{aligned} \tau_B^{\text{iso}}(\text{s}) &= -1,22 \times 10^{-9} B(\text{G}) \\ \tau_C^{\text{iso}}(\text{s}) &= 1,19 \times 10^{-9} C(\text{G}) \end{aligned} \quad (\text{A1.11})$$

sendo que τ_B^{iso} e τ_C^{iso} devem ser idênticos para movimento isotrópico. Diferenças entre esses dois valores são muitas vezes usadas na literatura como indicação de anisotropia no movimento. Os valores dos tempos de correlação são calculados com o auxílio da Eq. A1.10, diretamente através de medidas no espectro de RPE:

$$\begin{aligned} \Delta H_{pp}^L(0) &= A \\ \Delta H_{pp}^L(+1) &= A + B + C \\ \Delta H_{pp}^L(-1) &= A - B + C \end{aligned}$$

Considerando que o produto $(\Delta H_{pp}^L)^2 \times h$ é o mesmo para as três linhas (área sob a linha de absorção), sendo h a altura pico a pico da 1ª derivada da linha Lorentziana (medida com maior precisão do que a largura), podemos escrever:

$$\begin{aligned} B &= \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left(\sqrt{h_o/h_{+1}} - \sqrt{h_o/h_{-1}} \right) \\ C &= \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left(\sqrt{h_o/h_{+1}} + \sqrt{h_o/h_{-1}} \right) - 2 \end{aligned} \quad (\text{A1.12})$$

Para movimento anisotrópico, com simetria axial (Eq. A1.9), dois tempos de correlação são calculados, $\tau_{//}$ e τ_{\perp} , correspondendo a movimentos paralelo e perpendicular ao eixo de simetria da molécula. Pode ser mostrado que (ver Marsh, 1989, e as referências lá citadas):

$$\begin{aligned} \tau_{\perp} &= 1 / 6D_{R\perp} = \tau_{2,0} \\ \tau_{//} &= 1 / 6D_{R//} = 2\tau_{2,0}\tau_{2,2} / (3\tau_{2,0} - \tau_{2,2}) \end{aligned} \quad (\text{A1.13})$$

sendo $\tau_{2,0}$ e $\tau_{2,2}$ dados pelas expressões:

$$\tau_{2,0} = c_1(C + c_2B) \text{ e } \tau_{2,2} = b_1(B + b_2C) \quad (\text{A1.14})$$

onde c_1 , c_2 , b_1 e b_2 foram calculadas para rotações em torno dos três eixos principais do nitróxido, e estão tabeladas (ver Tabela 2 em Marsh, 1989). Novamente, através do sinal de RPE, usando as equações (A1.12), é possível calcular $\tau_{//}$ e τ_{\perp} .

Alargamento de linha não-homogêneo

É importante observar que os valores de A e B e C que aparecem na Eq. A1.10, e que podem ser medidos diretamente no espectro de RPE (Eq. A1.12), resultando no cálculo dos tempos de correlação da molécula, estão relacionados com os processos de relaxação da molécula através das interações Zeeman e hiperfina. São os chamados alargamentos de linha homogêneos, que dão origem a linhas Lorentzianas. Entretanto, em geral, as linhas de RPE de nitróxidos são também alargadas por interações hiperfinas não resolvidas, o chamado alargamento não-homogêneo. Este tem sido um problema sempre presente na literatura, pois dificulta as medidas de tempos de relaxação e correlação, sendo necessário a separação das contribuições Gaussiana e Lorentziana para a linha de RPE. Para exemplificar a contribuição Gaussiana, comparamos na Fig. A1.3 os espectros de RPE obtidos com o marcador de spin CAT1 e seu análogo deutério, dCAT1, utilizado em IV. Apesar do deutério ter spin nuclear $I = 1$, comparado com $I = 1/2$ para o hidrogênio, seu fator giromagnético (γ_D) é, aproximadamente, seis vezes menor do que o do hidrogênio (γ_H). Isto resulta em uma largura de linha Gaussiana para o deutério, Δ_{pp}^G (deuterado) $\approx \frac{\gamma_D}{\gamma_H} \sqrt{8/3} \Delta_{pp}^G = 0,251 \Delta_{pp}^G$ (Bales, 1989).

$$\Delta_{pp}^G(\text{deuterado}) \approx \frac{\gamma_D}{\gamma_H} \sqrt{8/3} \Delta_{pp}^G = 0,251 \Delta_{pp}^G \quad (\text{Bales, 1989}).$$

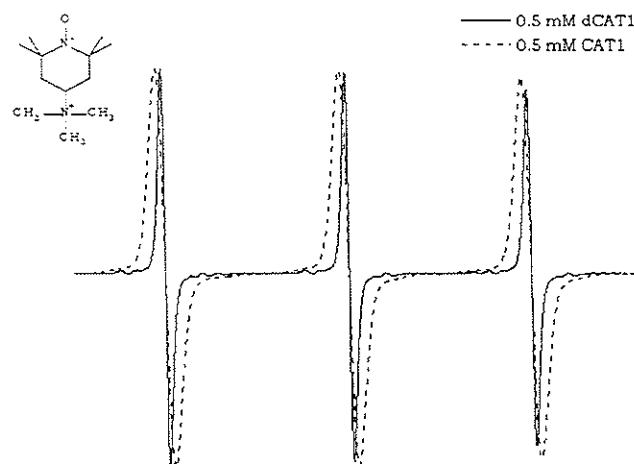


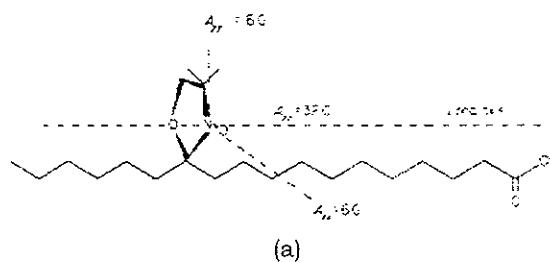
Fig. A1.3. Comparação do espectro de RPE do marcador de spin mostrado acima (CAT1) com o espectro de seu análogo deuteriado (dCAT1). Em dCAT1 todos os hidrogênios que não aparecem na figura foram trocados por deutério (17 deutérios).

Para movimento rápido, é sabido que a linha de RPE onde estão presentes interações hiperfinas não muito fortes, com muitos prótons (seguindo, aproximadamente, uma distribuição binomial para as intensidades de linha), pode ser descrita como uma distribuição Gaussiana de linhas Lorentzianas, ou uma convolução de Lorentziana e Gaussiana (Dobryakov e Lebedev, 1969), a chamada função de Voigt. Dada a dificuldade de se extrair a contribuição Lorentziana desta linha complexa, Bales (1989) desenvolveu uma método empírico para separar as contribuições Gaussiana e Lorentziana da largura de linha total. (Ele mostrou que a função Voigt é equivalente a uma soma de Lorentziana e Gaussiana, sem nenhuma justificativa teórica). No nosso trabalho usamos essa metodologia, para corrigir os valores de A, B e C, medidos diretamente nos espectros de RPE, através do ajuste dos espectros segundo o programa desenvolvido por Bales e seus colaboradores (Halpern e col., 1993). É importante lembrar que essa correção só é válida para a região de movimento rápido discutida até agora.

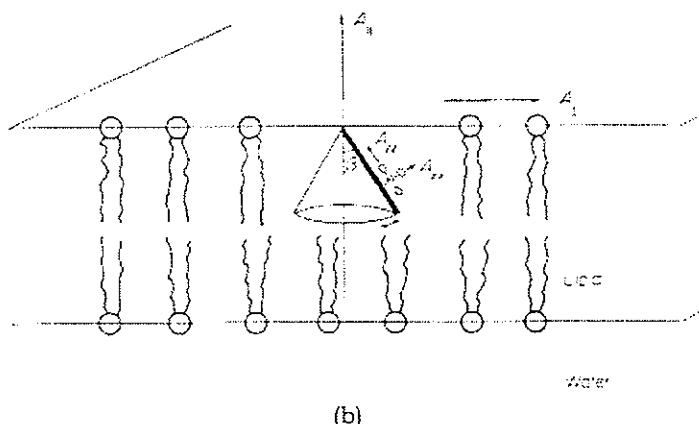
Parâmetro de ordem efetivo

Na região de movimento rápido ($\tau \leq 3 \times 10^{-9}$ s) as larguras das linhas estão relacionadas com a velocidade de movimento, e suas posições com a orientação da molécula em relação ao campo magnético externo H_0 (ver Fig. A1.1). A anisotropia do tensor **A** pode ser usada para o cálculo do chamado parâmetro de ordem (S) da membrana, relacionado à amplitude do movimento das cadeias hidrocarbonícas. Este parâmetro mede a distribuição angular média de um certo eixo fixo na molécula com relação a um eixo fixo na membrana (eixo diretor). Muitas vezes

escolhe-se a normal à bicamada como eixo diretor (ou uma direção que faça um certo ângulo com a normal).



(a)



(b)

Fig. A1.4. (a) Orientação dos eixos moleculares do nitróxido em marcador de spin de cadeia acila; (b) marcador de spin inserido na bicamada lipídica, com cadeia acila fazendo um ângulo β com a normal à bicamada (Fig. 6.20 e 6.21 em Knowles, Marsh e Rattle, 1976).

Para exemplificar o cálculo do parâmetro de ordem vamos considerar um marcador de spin derivado de ácido esteárico, onde o radical nitróxido, em média, está orientado de tal maneira que seu orbital 2p- π encontra-se paralelo ao eixo longo da cadeia acila (Fig. A1.4a). Se a cadeia estiver paralela à normal à bicamada, caso apliquemos $H_0 \parallel$ à normal, o valor do parâmetro hiperfino será $A_{\parallel\parallel} = A_{zz}$. De maneira semelhante, se $H_0 \perp$ à normal, $A_{\perp\perp} = (A_{xx} + A_{yy})/2$ (assume-se movimento rápido em torno do eixo z do nitróxido). Caso a cadeia acila esteja formando, em média, um ângulo β com a normal à bicamada (Fig. A1.4b), para movimentos rápidos tanto em torno do eixo como do próprio eixo, $A_{\parallel\parallel}$ será menor do que A_{zz} pois terá contribuições de A_{xx} e A_{yy} , e $A_{\perp\perp}$ será maior do que $(A_{xx} + A_{yy})/2$ pois terá contribuições de A_{zz} . Chama-se parâmetro de ordem efetivo a razão entre a anisotropia observada e a anisotropia real do tensor \mathbf{A}^3 .

³ Apesar de termos chegado à Eq. (A1.15) com argumentos qualitativos, ela pode ser deduzida a partir da definição de "matriz de ordem", pelos seus elementos diagonais $S_{ii} = (3<\cos^2 \theta_i> - 1)/2$, para $i = 1, 2$ e 3, sendo θ_i os ângulos entre os eixos moleculares do nitróxido, x , y e z , e o eixo z' de simetria do movimento (em geral a normal à bicamada). Faz-se a transformação do tensor \mathbf{A} do referencial da molécula (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz}), para o referencial da membrana ($A_{\perp\perp}$, $A_{\parallel\parallel}$, $A_{\parallel\perp}$), utilizando-se a matriz de rotação formada pelos cosenos diretores entre os dois sistemas de eixos. Desta maneira mostra-se que S_{33} é idêntico a S_{eff} definido acima (ver, por exemplo, Seelig, 1970, Seelig, 1976 ou Griffith e Jost, 1976).

$$S_{\text{eff}} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy})/2} \quad (\text{A1.15})$$

Como esperado, $S_{\text{eff}} = 1$, implica em $\beta = 0$, $A_{//} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = (A_{xx} + A_{yy})/2$, e $S = 0$, $\beta = 90^\circ$, $A_{//} = A_{\perp}$, portanto movimento isotrópico. Observe que está implícito no cálculo de parâmetro de ordem que a molécula tem movimento rápido. Chamamos de parâmetro de ordem "efetivo" pois foi mostrado que, mesmo para temperaturas altas, com marcadores de spin fosfolipídicos em membranas, a anisotropia de \mathbf{A} não está totalmente promediada para as várias orientações relativas de H_0 (Lange e col., 1985).

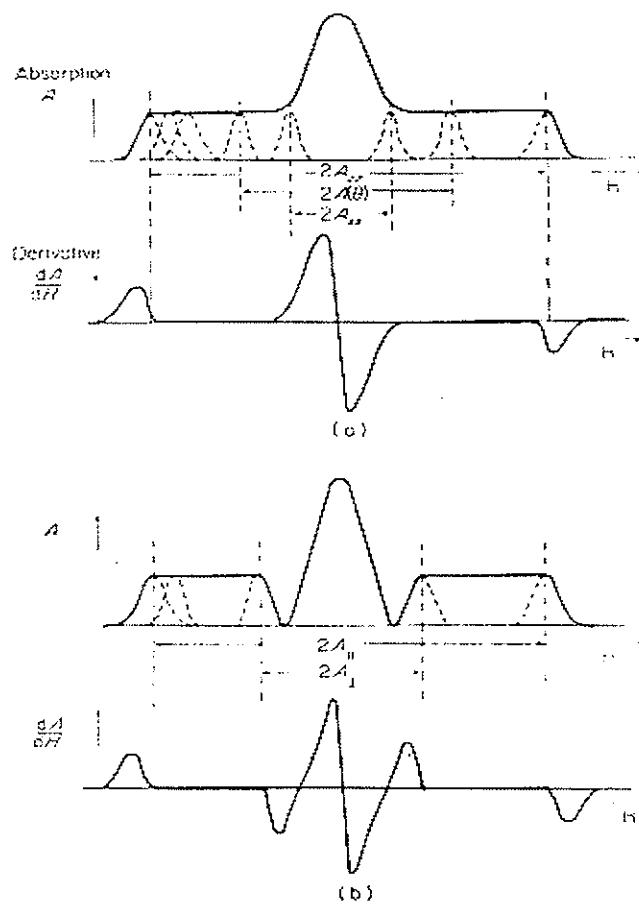


Fig. A1.5. Esquema dos espectros de RPE (absorção e 1^a derivada) de marcador de spin em (a) solução congelada e (b) vesículas. As linhas tracejadas mostram as absorções relativas a algumas direções do campo H_0 (referentes ao eixo z molecular), sendo a linha contínua a soma das componentes em todas as direções (Fig. 6.14 em Knowles, Marsh e Rattle, 1976).

Em membranas orientadas, pode-se medir diretamente os valores de $A_{//}$ e A_{\perp} (ver por ex., Biaggi e col., 1993). Em lipossomos, amostras macroscopicamente isotrópicas, mas microscopicamente anisotrópicas, muitas vezes é possível a medida dos dois valores do tensor \mathbf{A} , como ilustrado na Fig. A1.5. Diferentemente da amostra cristalina (a), em lipossomos (b), o aumento do desdobramento hiperfino mínimo devido à contribuição de A_{zz} , pode possibilitar a medida de A_{\perp} diretamente do espectro de RPE. Na Fig. A1.6 reproduzimos a também clássica figura publicada

por Griffith e Jost (1976), onde aparecem espectros simulados para movimento rápido e vários valores de parâmetro de ordem. Vemos que a medida de $A_{||}$ é relativamente simples, mas A_{\perp} nem sempre pode ser extraído do espectro de marcadores incorporados a vesículas (mais confiável na região $0,3 \leq S \leq 0,7$). Foi proposto por Gaffney (1976) uma correção empírica ao valor medido diretamente no espectro de RPE, A_{\min} :

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1,4 \frac{A_{||} - A_{\min}}{A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2} \quad (\text{A1.16})$$

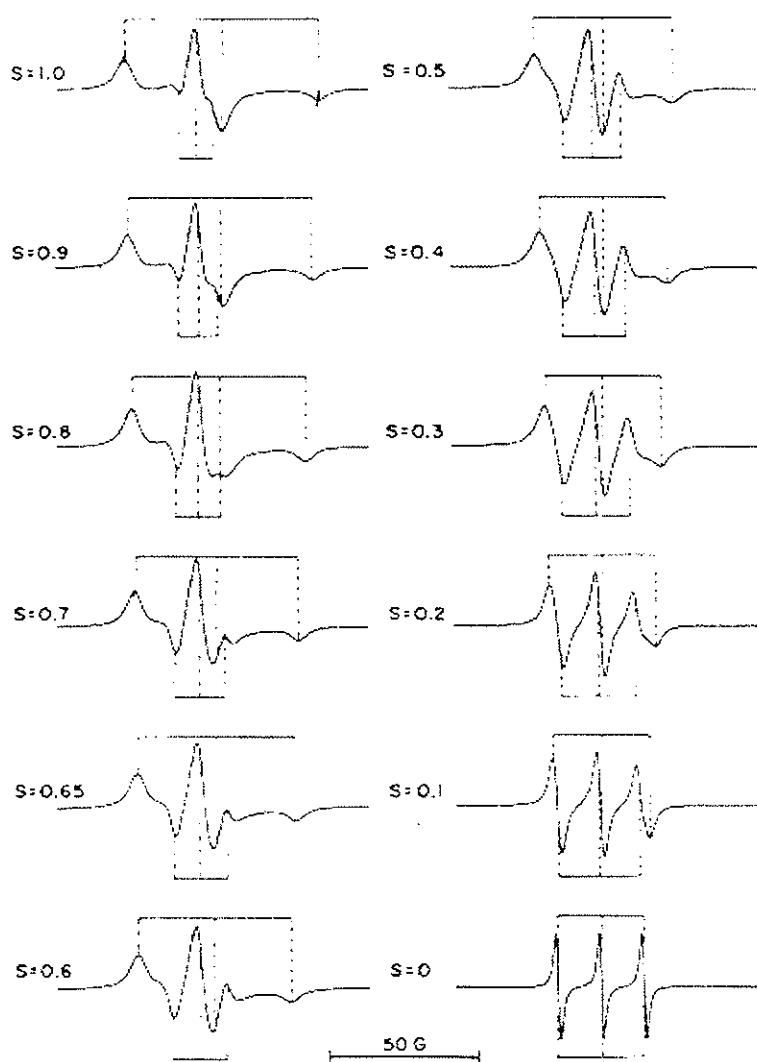


Fig. A1.6. Espectros simulados de RPE de marcadores de spin incorporados a vesículas lipídicas, para movimento rápido e diferentes parâmetros de ordem. As posições exatas de $A_{||}$, A_{\perp} , $g_{||}$ e g_{\perp} estão mostradas nas linhas tracejadas (Fig. 16 em Griffith e Jost, 1976).

ii. Região de movimento lento - $3 \times 10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7}$

Na região de movimento lento a teoria de Redfield não mais se aplica, a posição das linhas é dependente tanto da anisotropia do movimento como dos

tempos de correlação, e a forma das linhas não é mais Lorentziana. Neste caso, os sinais de RPE são analisados simplesmente através da medida de alguns parâmetros diretamente nos espectros, obtendo-se informações aproximadas sobre a mobilidade e a ordem do sítio onde se encontra o marcador de spin, ou é necessário a simulação dos espectros com um modelo mais abrangente. O grupo de Freed desenvolveu um método de análise de espectros de nitróxidos, em meios isotrópicos ou anisotrópicos (membranas lipídicas), utilizando a equação estocástica da Liouville para descrever a evolução no tempo da matriz densidade (Freed, 1976; Schneider e Freed, 1989). Esse método é bastante complexo, e apesar de Schneider e Freed (1989) terem tornado público os programas por eles desenvolvidos, foi somente este ano que tivemos acesso aos programas do grupo de Cornell, que permitem a simulação de espectros de marcadores de spin em vesículas lipídicas. Esta é a situação por eles chamada de MOMD (*microscopically ordered but macroscopically disordered*). Também é relativamente recente o desenvolvimento de programas que fazem o ajuste das simulações teóricas com os espectros experimentais de RPE usando métodos não lineares de mínimos quadrados (Budil e col., 1996).

No modelo acima citado são muitos os parâmetros que entram na simulação dos espectros, exigindo do pesquisador um certo conhecimento da estrutura do sistema a ser estudado, caso contrário é muito difícil a escolha adequada dos parâmetros. São considerados quatro sistemas de eixos:

- $\mathbf{x}_L, \mathbf{y}_L, \mathbf{z}_L$ → fixos no laboratório, com $\mathbf{z}_L // \mathbf{H}_0$.
- $\mathbf{x}_d, \mathbf{y}_d, \mathbf{z}_d$ → eixos diretores, fixos na bicamada lipídica, sendo $\mathbf{z}_d //$ eixo de simetria do potencial restaurador, relacionado ao parâmetro de ordem.
- $\mathbf{x}_m, \mathbf{y}_m, \mathbf{z}_m$ → eixos principais dos tensores magnéticos, fixos na molécula.
- $\mathbf{x}_R, \mathbf{y}_R, \mathbf{z}_R$ → eixos principais do tensor de difusão rotacional, $\mathbf{z}_R //$ eixo de simetria do tensor.

Entre os muitos parâmetros que entram no programa (Budil e col., 1996), estão destacados abaixo aqueles que aparecem nas simulações descritas neste trabalho (IV).

Parâmetros magnéticos e estruturais - os valores principais dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} ($g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}, A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}$); $\alpha_D, \beta_D, \gamma_D$, são os ângulos de Euler que levam os eixos magnéticos ($\mathbf{x}_m, \mathbf{y}_m, \mathbf{z}_m$) nos eixos principais de difusão ($\mathbf{x}_D, \mathbf{y}_D, \mathbf{z}_D$); $\Delta^{(0)}, \Delta^{(2)}$ (gib0, gib2), definem o alargamento de linha não homogêneo (Gaussiano); c_K^L ($c_{20}, c_{22}, c_{40}, c_{44}$), são os coeficientes que aparecem na expressão do potencial restaurador, escrito em relação aos eixos diretores, como uma expansão nos harmônicos

esféricos. Este potencial é colocado para modelar a tendência das moléculas em uma bicamada lipídica de se alinharem segundo uma certa direção.

Parâmetros dinâmicos - D_{xx} , D_{yy} , D_{zz} , valores principais do tensor de difusão rotacional, a partir dos quais são calculados os tempos de correlação.

Parâmetros do modelo computacional - são vários os parâmetros que devem ser escolhidos de tal maneira a minimizar o tempo de computação (muitas vezes possibilitar que a simulação seja feita), sem deformação do espectro simulado.

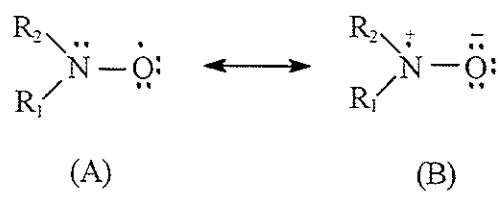
Influência da Polaridade do meio

A dependência dos parâmetros de RPE com a polaridade do meio tem sido bastante estudada. Na Tabela A1.2 estão mostrados os parâmetros isotrópicos a_o e g_o , para um marcador de spin em três meios de polaridades diferentes.

Tabela A1.2. Valores dos parâmetros de RPE isotrópicos de di-t-butil-nitróxido (DTBN), a 23 °C (Griffith e col., 1974).

	a_o (G)	g_o
Hexano	15,10	2,0061
Etanol	16,06	2,0059
Água	17,16	2,0056

O aumento de a_o com a polaridade do meio, também presente nos valores principais do tensor **A** (A_{zz} pode ser medido no espectro de soluções congeladas), tem sido atribuído à variação das contribuições relativas das estruturas (A) e (B) do nitróxido mostradas abaixo (Griffith e col., 1974):



Solventes polares tenderiam a estabilizar a estrutura (B), que apresenta maior densidade de spin no átomo de ^{14}N , em consequência, maior valor de a_o . Portanto, o valor do desdobramento hiperfino (a_o ou A_{zz}) dá informação sobre a polaridade do micro ambiente onde se encontra o nitróxido⁴.

Além disso, nas medidas de parâmetro de ordem é necessário que se corrija os valores principais de tensor **A**, A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} , medidos em um meio de polaridade

⁴ É importante ter em mente que outros fatores também contribuem para a variação do parâmetro hiperfino, como formação de pontes de hidrogênio ou de complexos de transferência de carga (Griffith e col., 1974), e a orientação do nitróxido em campos elétricos (Schwartz e col., 1997).

caracterizado por $a_o' = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$, pelo fator a_o/a_o' , onde $a_o = (A_{//} + 2A_{\perp})/3$ (Hubbell e McConnell, 1971), resultando na equação (A1.15) modificada:

$$S_{\text{eff}} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_o'}{a_o} \quad (\text{A1.17})$$

Por outro lado, na utilização dos programas de simulação de espectros de RPE, é recomendado que se meça A_{zz} com a amostra congelada, para que se faça a correção necessária nos valores dos tensores \mathbf{g} e \mathbf{A} medidos em cristal.

Apêndice 2. Partição (associação) de moléculas em (com) agregados anfifílicos

(Em colaboração com Carla Goldman, Amando S. Ito e Vera B. Henriques)

Nos estudos de coeficiente de partição ou constantes de equilíbrio, usando medidas de fluorescência, estaremos sempre assumindo que o ligante (peptídeo, melatonina, etc.) está particionado em dois meios: meio aquoso, intensidade de fluorescência mínima (I_{\min}), correspondendo ao ligante livre (L_f); e meio mais hidrofóbico (interior de membrana, micela, etc., formado por moléculas anfifílicas), intensidade de fluorescência máxima (I_{\max}), correspondendo ao ligante ligado (L_b). Portanto, a intensidade de fluorescência medida¹ será dependente das concentrações de ligante livre e ligado, $[L_f]$ e $[L_b]$, respectivamente:

$$I = \frac{[L_b]}{[L_t]} I_{\max} + \frac{[L_f]}{[L_t]} I_{\min} \quad (\text{A2.1})$$

sendo $[L_t]$ a concentração total de ligante. A notação $[]$ significa concentração em mols por litro (volume total da amostra $\equiv V_t$).

A seguir, faremos várias colocações a respeito de constante de associação e coeficiente de partição, muitas delas já conhecidas na literatura mas, a nosso ver, nunca discutidas comparativamente de maneira clara. Tentamos unir os enfoques que aparecem em revistas de biologia e bioquímica com aqueles da literatura mais relacionada às áreas de físico-química e biofísica.

Modelo A - Partição do ligante em dois meios

Vamos tratar aqui o problema da partição do ligante entre o meio aquoso e o agregado anfifílico, no ensemble canônico.

Para o ligante livre, na água, consideraremos o limite de gás ideal, portanto, podemos escrever seu potencial químico como:

$$\mu_{H_2O} = \mu_{H_2O}^0 + kT \ln X_{H_2O} \quad (\text{A2.2})$$

onde X_{H_2O} é a fração, em moléculas, de ligante na água, k a constante de Boltzman, T a temperatura em Kelvin, e $\mu_{H_2O}^0$ chamaremos de potencial químico intrínseco do ligante na água, correspondendo a energia livre de uma molécula do ligante no meio (inclui energia cinética e interação com o solvente).

Para os ligantes particionados nos agregados, vamos considerar limitado o número de sítios disponíveis. Neste enfoque, existem M sítios disponíveis (em todos

¹ I , I_{\max} e I_{\min} são as intensidades de emissão fluorescente em um mesmo comprimento de onda (λ), ou podem ser as áreas dos espectros de emissão. Muitas vezes na literatura, no ajuste de curvas de titulação (eq. A2.7 e A2.15), usa-se, erroneamente, os valores medidos nos máximos de emissão em cada um dos meios, ou ainda, o deslocamento do máximo de emissão ($\Delta\lambda$).

os agregados do meio), onde estão ligados N ligantes. Consideramos que cada ligante ocupa um sítio de ligação, e que os ligantes não interagem entre si. O sistema pode ser descrito pela função de partição:

$$Z(T, M, N) = \sum_{\text{conf}} e^{-\beta E_{\text{conf}}} = \frac{M!}{N!(M-N)!} e^{-N\beta\varepsilon}$$

sendo $\beta = 1/kT$, e definindo ε como o potencial químico intrínseco do ligante na membrana (inclui energia de interação e graus de liberdade intrínsecos do ligante na membrana). Como a energia livre de Helmholtz é descrita por $F = -kT \ln Z$, e o potencial químico $\mu = \partial F / \partial N$, e usando a aproximação $\ln(x!) \approx (x \ln x - x)$ para valores grandes de x , sendo $x = M, N$ ou $(M - N)$, encontramos,

$$\mu_M = \varepsilon + kT \ln\left(\frac{N}{M-N}\right) \quad \text{ou} \quad \mu_M = \varepsilon + kT \ln\left(\frac{\Phi}{1-\Phi}\right) \quad (\text{A2.3})$$

sendo $\Phi = N/M$, a fração de sítios ocupados. Chamamos μ_M o potencial químico por molécula associado ao ligante nos agregados (o índice _M faz referência à membrana).

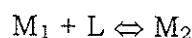
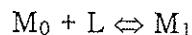
No equilíbrio termodinâmico, os potenciais químicos do ligante nos dois meios são iguais, portanto, de (A2.2) e (A2.3),

$$\frac{\Phi/X_{H_2O}}{1-\Phi} = e^{\frac{\mu_{H_2O}^\circ - \varepsilon}{kT}} = K \quad (\text{A2.4})$$

sendo K uma constante que depende somente dos potenciais químicos intrínsecos do ligante na água e no agregado, e da temperatura. A expressão (A2.4) é também conhecida como isoterma de Langmuir.

Modelo B - Associação ligante - agregado

Podemos olhar o mesmo problema descrito acima, mas com outro enfoque, como aparece em alguns livros básicos de bioquímica e biofísica (p.ex. Cantor e Schimmel, 1980): associação de ligante L com macromolécula M com n' sítios independentes de ligação. São definidas constantes de dissociação "macroscópicas" $K_1, K_2, K_3, \dots, K_n$ etc. que descrevem o equilíbrio químico entre as várias espécies:

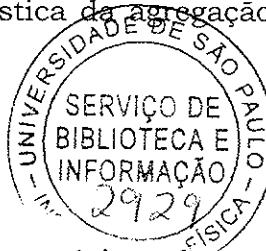


...

sendo $M_0, M_1, M_2, \dots, M_n$ a macromolécula com 0, 1, 2...i...n' ligantes ligados. Define-se, então, uma constante de dissociação "microscópica", k, que independe do

número de sítios ocupados, e mostra-se, fazendo uma estatística da agregação de ligantes em n' sítios disponíveis, que:

$$K_i = \frac{C_{i-1}^{n'}}{C_i^{n'}} k$$



sendo $C_i^{n'} = \frac{n'!}{i!(n'-i)!}$. Tomando-se a contribuição de todas as espécies, chega-se à equação:

$$\nu = \frac{n'[L_f]/k}{1+[L_f]/k}, \text{ ou, como é usada no Plot de Scatchard, } \frac{\nu}{[L_f]} = \frac{n'}{k} - \frac{\nu}{k} \quad (\text{A2.5})$$

onde $\nu \equiv [L_b]/[M_t]$, sendo $[L_b]$ e $[M_t]$ as concentrações molares (mol/litro) de ligante ligado e de macromolécula, respectivamente, e, como já definido, $[L_f]$ é a concentração de ligante em solução².

Podemos fazer uma adaptação desta descrição, ou seja, passar de ligante-macromolécula, para o sistema com o qual trabalhamos, ligante-agregado anfifílico: $[M_t] \Rightarrow [Ag_t]$ (concentração total de agregados - vesículas ou micelas) e $n' \Rightarrow m$ (número de sítios no agregado).

Em muitos experimentos, o parâmetro relevante é o número total de sítios disponíveis considerando todos os agregados do meio, e o que se quer estimar é o número de anfifílicos por ligante, n , (ou número de anfifílicos por sítio de ligação), portanto, reescrevemos a expressão (A2.5) em função destas variáveis. Vamos ainda considerar o número médio de agregação do anfifílico, N_o , tal que $N_o = m.n$. Vemos também que $\nu \equiv [L_b]/[M_t] = [L_b]/[Ag_t] = [L_b]/([Anf_t]/N_o) = \nu_o N_o$, onde $[Anf_t]$ é a concentração total de anfifílicos e definindo $\nu_o \equiv [L_b]/[Anf_t]$. Portanto,

$$\frac{\nu_o N_o}{[L_f]} = \frac{m}{k} - \frac{\nu_o N_o}{k} \quad \text{ou} \quad \frac{\nu_o}{[L_f]} = \frac{1}{nk} - \frac{\nu_o}{k} \quad \text{ou} \quad \frac{[L_b]}{[Anf_t][L_f]} = \frac{1}{nk} - \frac{[L_b]}{[Anf_t]k} \quad (\text{A2.6})$$

Como esperado, a expressão acima não depende do número médio de agregação N_o do anfifílico.

A equação (A2.6) é muito usada, pois ν_o pode ser calculado a partir de medidas de fluorescência (A2.1), e, variando-se a concentração de anfifílico, o gráfico de $\nu_o/[L_f]$ versus ν_o deve poder ser ajustado por uma reta, de onde se obtém os valores de n e k .

Entretanto, essa linearização pode ser muito problemática, introduzindo erros espúrios, já que se trabalha com o inverso de variáveis experimentais. A

² Hill (1986), no capítulo 7 de seu livro, faz um tratamento equivalente ao mencionado acima, mas descrevendo rigorosamente o equilíbrio químico de várias espécies no limite de gás ideal.

melhor maneira de tratar os dados é, certamente, o acoplamento das equações (A2.1) e (A2.6) na expressão:

$$\frac{I}{I_{\min}} = \frac{((I_{\max}/I_{\min}) - 1)}{2[L_t]n} \left[b \pm (b^2 - 4[L_t][Anf_t]n)^{1/2} \right] + 1 \quad (\text{A2.7})$$

$$\text{sendo } b = [Anf_t] + [L_t]n + nk$$

O ajuste da equação acima com os dados experimentais da variação de I/I_{\min} versus $[Anf_t]$, levará aos melhores valores para os parâmetros I_{\max} , n e k .

Equivalência dos dois modelos

Mostraremos aqui a equivalência dos dois modelos descritos acima (modelos A e B), e a relação entre as duas constantes, K e k , que neles aparecem. Para compararmos as equações (A2.4) e (A2.6), vamos lembrar que no modelo A:

$$\Phi = N/M = (\text{número de partículas ligadas})/(\text{número de sítios de ligação}).$$

Podemos reescrever essa expressão:

$\Phi = ((\text{número de partículas ligadas})/V_t.N_a).(V_t.N_a.n/(\text{número de sítios de ligação}).n)$, sendo N_a o número de Avogadro, e n , como definido anteriormente, o número de anfifílicos por ligante (ou por sítio de ligação). Lembrando que $((\text{número de sítios de ligação}).n) = (\text{número de anfifílicos})$,

$$\Phi = [L_b].n/[Anf_t] \quad \text{ou} \quad \Phi = v_o n \quad (\text{A2.8})$$

Vamos, também, reescrever:

$$[L_t] = (\text{moles de ligante livre} / \text{moles de solvente}) / (\text{moles de solvente} / V_t).$$

E se assumimos que o número de moles de (ligante livre + solvente) \approx número de moles de solvente, podemos escrever:

$$[L_t] \approx X_{H_2O} \cdot [H_2O] \quad (\text{A2.9})$$

sendo $[H_2O] \approx 55$ M. Substituindo v_o e $[L_t]$ de acordo com as expressões (A2.8) e (A2.9), na equação de Scatchard (A2.6), temos

$$\frac{\Phi/n}{X_{H_2O}[H_2O]} = \frac{1}{nk} - \frac{\Phi}{nk} \quad \text{que leva à equação de Langmuir} \quad \frac{\Phi/X_{H_2O}}{1-\Phi} = \frac{[H_2O]}{k} = K,$$

mostrando a equivalência dos dois modelos.

Podemos, então, identificar a constante k que aparece na equação de Scatchard, com

$$\frac{1}{k} = \frac{K}{[H_2O]} = \frac{1}{[H_2O]} e^{\frac{\mu_{H_2O}^0 - \varepsilon}{kT}} \quad (\text{A2.10})$$

e dar a essa "constante de dissociação microscópica" o significado físico do inverso de uma constante de partição água/agregado, função da diferença dos potenciais químicos intrínsecos do ligante nos dois meios.

Límite para número infinito de sítios de ligação

Em ambos os modelos acima podemos calcular o limite para número muito pequeno de ligantes particionados nos agregados. Como estes limites são muito usados na análise de dados experimentais, muitas vezes de maneira incorreta, ou sem a ressalva de serem situações limites, vamos discuti-los abaixo mostrando, novamente, a equivalência dos dois modelos, e discutindo porque, conceitualmente, preferimos o modelo da partição.

i. *Modelo A - Partição do ligante em dois meios:* Na equação (A2.4), fazendo com que seja muito pequena a fração de sítios ocupados, $N \ll M$ ou $\Phi \ll 1$:

$$\frac{\Phi}{X_{H_2O}} \approx K$$

Podemos reescrever essa equação de uma forma mais conhecida na literatura de bioquímica, em função de um coeficiente de partição, K_p , definido como:

$$K_p = \frac{n_M / V_M}{n_{H_2O} / V_{H_2O}} = \frac{C_M}{C_{H_2O}} \quad (A2.11)$$

onde n_M e n_{H_2O} correspondem ao número de moles de ligante na membrana e na água, respectivamente, e V_M e V_{H_2O} são os volumes de membrana e de solução. Lembrando que $\Phi \equiv (N/M) \propto (n_M/V_M) \equiv C_M$ e $X_{H_2O} \propto (n_{H_2O}/V_{H_2O}) \equiv C_{H_2O}$, temos:

$$\frac{\Phi}{X_{H_2O}} \propto \frac{C_M}{C_{H_2O}} \equiv K_p$$

Portanto, o coeficiente de partição K_p é uma constante somente no limite para baixa partição do ligante nos agregados.

Note que este limite é equivalente a tratarmos o problema da partição modelando o ligante como um gás ideal nos dois meios, como vemos abaixo. Podemos escrever para os potenciais químicos do ligante na água e no meio hidrofóbico (agregado):

$$\mu_{H_2O} = \mu_{H_2O}^0 + kT \ln X_{H_2O} \quad \text{e} \quad \mu_M = \mu_M^0 + kT \ln X_M$$

sendo as frações do ligante no meio aquoso e no agregado, X_{H_2O} e X_M , respectivamente proporcionais a $C_{H_2O} = n_{H_2O} / V_{H_2O}$ e $C_M = n_M / V_M$. No equilíbrio termodinâmico, $\mu_{H_2O} = \mu_M$, vemos, novamente que K_p é uma constante:

$$\frac{X_M}{X_{H_2O}} = e^{\frac{\mu_{H_2O}^\circ - \mu_M^\circ}{kT}} = e^{\frac{-\Delta u^\circ}{kT}} \propto \frac{C_M}{C_{H_2O}} = K_p \quad (A2.12)$$

A equação (A2.11) é muitas vezes usada no ajuste de dados experimentais, sendo que é usada corretamente quando o número de sítios de ligação no agregado não é restritivo. Fazendo o volume de meio aquoso igual ao volume total da amostra, $V_t = V_{H_2O}$.

$$K_p = \frac{n_M}{V_t} \frac{V_t}{n_{H_2O}} \frac{V_t}{V_M} = \frac{[L_b]}{[L_f]} \frac{V_t}{V_M}$$

chegando à seguinte expressão para a concentração de ligante no agregado:

$$[L_b] = \frac{K_p [L_f] V_M}{(K_p V_M + V_t)} \quad (A2.13)$$

A equação acima, juntamente com (A2.1), resultam na expressão abaixo

$$\frac{I}{I_{min}} = \frac{K_p \frac{V_M}{V_t}}{(K_p \frac{V_M}{V_t} + 1)} \left(\frac{I_{max}}{I_{min}} - 1 \right) + 1 \quad (A2.14)$$

Para esta expressão ser usada no ajuste de curvas de variação da intensidade de fluorescência com a concentração de anfifílico, observamos que

$$\frac{V_M}{V_t} = [Anf_t] \frac{M_w}{\rho}$$

sendo $[Anf_t]$, M_w , e ρ , respectivamente, a concentração total, a massa molecular e a densidade em massa de anfifílico. Chegamos, então, à expressão

$$\frac{I}{I_{min}} = \frac{K_p [Anf_t] M_w / \rho}{1 + (K_p [Anf_t] M_w / \rho)} \left(\frac{I_{max}}{I_{min}} - 1 \right) + 1 \quad (A2.15)$$

usada para fazer o ajuste dos dados obtidos de medidas de fluorescência.

ii. Modelo B - Associação ligante-agregado: Podemos, de maneira equivalente, fazer na equação (A2.6) o limite para a concentração de ligantes no agregado ser muito menor do que a concentração de sítios disponíveis, $[L_b] \ll [Anf_t]/n$ ou $[L_b]/[Anf_t] \ll 1/n$

$$\frac{[L_b]}{[Anf_t][L_f]} \approx \frac{1}{nk} \quad (A2.16)$$

É interessante notar que este limite é equivalente a considerarmos o equilíbrio químico entre três espécies: ligante (L), anfifílico (Anf) e complexo ligante-anfifílico ($LANf$)



e calcularmos uma constante de associação $K_a = [LANf]/([L_f][Anf_t])$, sendo $[L_f]$ e $[Anf_t]$ as concentrações de ligante e anfifílico livres³. Deve-se, também, assumir que exista excesso de anfifílico (equivalente a "número infinito de sítios de ligação"), portanto para $[Anf_t] \approx [Anf]$, comparando com (A2.16), lembrando que $[LANf] \equiv [L_b]$,

$$K_a \approx \frac{[L_b]}{[L_f][Anf_t]} \approx \frac{1}{nk} \quad (A2.18)$$

A equação acima é muito interessante, pois mostra que toda tentativa de ajustar dados experimentais com a equação (A2.7) em sistemas onde $[L_b] \ll [Anf_t]$ levam, necessariamente, a infinitos valores de k e n , de tal maneira que o produto nk fique sempre constante. Portanto, como esperado, somente é possível o cálculo do número de anfifílicos por ligante na situação em que este número é restritivo.

iii. equivalência dos modelos no limite de baixa partição do ligante nos agregados: A partir da equação (A2.18), pode-se rescrever K_a em função de K_p :

$$K_a = \frac{[L_b]}{[L_f][Anf_t]} = \frac{n_M}{V_t} \frac{V_t}{n_{H_2O}} \frac{V_t}{n_{Anf}} = \frac{n_M}{n_{H_2O}} \frac{V_t}{n_{Anf}} = \frac{n_M}{n_{H_2O}} \frac{M_w \cdot V_t}{V_M \cdot \rho} = K_p \frac{M_w}{\rho}$$

onde usamos que o número de moles de anfifílico é $n_{Anf} = V_M \cdot \rho / M_w$. A equação (A2.15) pode ser reescrita como

$$\frac{I}{I_{min}} = \frac{K_a[Anf_t]}{1 + K_a[Anf_t]} \left(\frac{I_{max}}{I_{min}} - 1 \right) + 1$$

Apesar da equivalência formal dos dois métodos, e de ser muito comum na literatura o cálculo da constante de associação K_a de ligante com anfifílico, nós preferimos o tratamento onde definimos um coeficiente de partição do ligante entre

³ É importante ter em mente que quando dizemos "anfifílico livre" nos referimos à molécula de anfifílico no agregado, mas não interagindo com o ligante. No tratamento aqui apresentado todo anfifílico está agregado. Se este não for o caso, deve-se considerar somente a concentração agregada.

dois meios pelas razões conceituais discutidas abaixo. Para isso vamos lembrar alguns conceitos básicos de equilíbrio químico entre espécies.

iii. Algumas noções básicas sobre equilíbrio químico: Como queremos comparar K_a com K_p , vamos lembrar que se escrevemos o equilíbrio entre três espécies:



e consideramos A, B e C como partículas de um gás ideal, podemos escrever o potencial químico μ_i de cada componente, sendo $i = A, B$ e C :

$$\mu_i = \mu_i^0 + kT \ln \frac{N_i}{N}$$

sendo N_i o número de moléculas do componente i , e N o número total de moléculas no meio, $N = \sum_i N_i$, e μ_i^0 o potencial químico intrínseco da molécula (inclui a energia cinética da molécula).

Para $G(T, P, N_A, N_B, N_C)$, no equilíbrio termodinâmico, $\Delta G = 0$, e sendo $\Delta N_A = \Delta N_B = -\Delta N_C$ portanto, para temperatura e pressão constantes temos

$$0 = \frac{\partial G}{\partial N_A} \Delta N_A + \frac{\partial G}{\partial N_B} \Delta N_B + \frac{\partial G}{\partial N_C} \Delta N_C = \mu_A (-\Delta N_C) + \mu_B (-\Delta N_C) + \mu_C (\Delta N_C)$$

E chegamos à conhecida expressão, $\mu_A + \mu_B = \mu_C$

Fazendo $\Delta\mu^0 = \mu_C^0 - (\mu_A^0 + \mu_B^0)$, e definindo as frações molares $X_A = N_A/N$, $X_B = N_B/N$ e $X_C = N_C/N$, chegamos, finalmente, a:

$$\Delta\mu^0 = kT \ln \left(\frac{X_A \cdot X_B}{X_C} \right) = kT \ln K_d' \quad \text{ou} \quad K_d \propto K_d' = e^{\frac{\Delta\mu^0}{kT}}$$

onde chamamos a atenção para o fato da constante de dissociação K_d ser usualmente definida em função das concentrações molares (mol/litro) das espécies em equilíbrio, e K_d' em função das frações molares (mol/mol).

Portanto, as constantes de dissociação K_d , ou de associação $K_a = 1/K_d$, de um equilíbrio químico entre várias espécies, estão relacionadas com os potenciais químicos intrínsecos de todas as espécies presentes, ou seja A, B e C. No caso da reação (A2.17), K_a estaria relacionada com os potenciais químicos intrínsecos do ligante e do anfílico livres, e do complexo LAnf. Entretanto, K_p (A2.12) depende dos potenciais químicos intrínsecos do ligante nos dois meios. Não entra o potencial químico intrínseco do anfílico, como acontece no equilíbrio de uma reação. Por isso insistimos que, apesar de termos a transformação numérica simples entre K_a e K_p ($K_a = K_p(M_w/\rho)$), conceitualmente são duas variáveis diferentes. Essa diferença

conceptual é importante na discussão dos fenômenos físicos envolvidos na partição de uma molécula em dois meios.

Apêndice 3. Medidas de emissão de fluorescência por amostras que espalham luz

(Parte do trabalho de Mestrado de Ernane J.X. Costa, em colaboração com Amando S. Ito)

Vamos fazer aqui uma recordação de alguns conceitos básicos de fluorescência, e depois discutiremos as correções, por nós desenvolvidas, para medidas de fluorescência em amostras que espalham luz.

Correções na intensidade da luz emitida

Quando fazemos uma medida da intensidade da luz emitida por um fluoróforo (I_{em}), estamos querendo informações sobre o seu rendimento quântico, Φ . Sendo I_{abs} a intensidade de luz absorvida,

$$\Phi = \frac{I_{em}}{I_{abs}} \quad \text{ou} \quad I_{em} = \Phi \cdot I_{abs}$$

O rendimento quântico do fluoróforo dará informações sobre o microambiente onde ele se encontra (Lakowicz, 1983), permitindo, por exemplo, uma estimativa de sua profundidade de penetração em uma bicamada lipídica, ou o cálculo da constante de partição da molécula em meios de polaridades diferentes, por exemplo, água/agregado anfifílico (vesículas ou micelas). Como o que medimos é I_{em} , se queremos comparar os valores de Φ de várias amostras, é necessário que I_{abs} seja a mesma para todas elas, ou então, que sejam feitas as correções devidas.

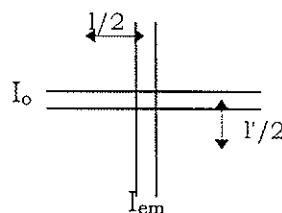


Fig. A3.1. Diagrama mostrando a trajetória dos feixes de luz em uma cela padrão de fluorescência.

No esquema acima mostramos, de maneira simplificada, que em um fluorímetro, I_{em} e I_{abs} são referentes às moléculas contidas no pequeno volume ΔV ($\approx (\Delta x)^3$) no centro da cela, onde I_o é a intensidade de luz que chega à parede da cela, e as dimensões de ΔV dependem do espectrômetro usado. (Certamente existem outros arranjos, com outras geometrias, que mencionaremos mais adiante).

Lembrando que a absorbância de um cromóforo em cela de caminho ótico x , sendo I_o e I_{trans} as intensidades de luz incidente e transmitida, é dada por:

$$A(x) = \log \frac{I_o}{I_{trans}} \quad \text{portanto} \quad I_{trans} = I_o e^{-2,3 \cdot A(x)} \quad \text{e} \quad I_{abs} = I_o (1 - e^{-2,3 \cdot A(x)})$$

Podemos, então, escrever: $I_{em} = \Phi \cdot I_{abs} = \Phi \cdot I_o (1 - e^{-2,3 \cdot A(\Delta x)})$, onde I_o é a intensidade que chega no centro da cela.

Como, em geral, usamos o fluoróforo em concentrações que absorvem pouca luz, $A(\Delta x) \ll 1$, então

$$I_{em} \approx \Phi \cdot I_o (2,3 \cdot \epsilon \cdot \Delta x \cdot c) \quad (A3.1)$$

onde usamos a lei de Lambert-Beer, sendo ϵ o coeficiente de extinção do fluoróforo e c sua concentração. Portanto, para compararmos o rendimento quântico de duas amostras, é necessário que tenham o mesmo ϵ e c (ou que se façam as correções necessárias), que se use o mesmo arranjo ótico no fluorímetro, portanto mesmo Δx , e que chegue no centro delas o mesmo I_o , ou, também, que sejam feitas correções. São estas últimas que vamos discutir abaixo.

Caso a amostra espalhe luz (p. ex. dispersões lipídicas), a intensidade que chega ao centro da cela é dada por:

$$I_o' = I_{trans} = I_o e^{-2,3 \cdot A_{esp}(1/2)} \quad (A3.2)$$

onde $A_{esp}(1/2)$ é a absorbância medida no espectrofotômetro, no comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}), devido à luz espalhada no caminho ótico 1/2 (ver Fig. A3.1), relativa, portanto, à turbidez da amostra.

Com as equações (A3.1) e (A3.2) temos:

$$I_{em} = \Phi \cdot I_o e^{-2,3 \cdot A_{esp}(1/2)} (2,3 \cdot \epsilon \cdot \Delta x \cdot c) \quad (A3.3)$$

Além disso, a luz emitida que chegará ao detetor também será espalhada, e portanto a intensidade que chegará será:

$$I_{em}' = \Phi \cdot I_o e^{-2,3 \cdot A_{esp}^{ex}(1/2)} e^{-2,3 \cdot A_{esp}^{em}(1/2)} (2,3 \cdot \epsilon \cdot \Delta x \cdot c)$$

onde A_{esp}^{ex} e A_{esp}^{em} são as absorbâncias medidas nos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e emissão (λ_{em}).

Para que se possa comparar os rendimentos quânticos de amostras que espalham luz diferentemente, por exemplo, um fluoróforo em meio aquoso e em dispersão lipídica, é necessário fazer a correção:

$$I_{em}^{\text{cor}} = I_{em}' \cdot e^{2,3[A_{esp}^{ex}(1/2) + A_{esp}^{em}(1/2)]} \quad (A3.4)$$

Esta correção aparece nos livros texto de fluorescência (p. ex., Lakowicz, 1983), relacionada ao chamado efeito filtro, quando a amostra absorve a luz incidente e/ou emite pelo fluoróforo. Entretanto, em vários trabalhos na literatura, ela é esquecida para amostras que espalham luz.

É interessante notar que quanto menores forem os comprimentos de onda de excitação e emissão, maiores serão as correções devidas, pois o espalhamento diminui, aproximadamente, com uma potência de λ^{-4} para o espalhamento de pequenas partículas, espalhamento Rayleigh). Como λ_{ex} é sempre menor do que λ_{em} é recomendável que se utilize uma cela com menor caminho ótico para o feixe incidente. Muitas vezes, para que seja menor o efeito do espalhamento de luz, são utilizadas as chamadas celas de face frontal, esquematizadas na Fig. A3.2, onde tanto o feixe incidente como o emitido, não atravessam a amostra.



Fig. A3.2. Diagrama mostrando a trajetória dos feixes incidente, refletido e emitido, nas celas de face frontal de 45° (a) e 36° (b).

Límite de validade da correção

Quando se trabalha com amostras que espalham muita luz, como dispersões lipídicas, a correção discutida acima pode deixar de ser verdadeira, como mostraremos a seguir. Vários são os motivos para que isto ocorra, sendo, provavelmente, o mais importante, os espalhamentos múltiplos dentro da cela para amostras relativamente turvas.

Para testarmos se a correção de I_{em} pela equação (A3.4) era válida, precisávamos de um fluoróforo que não interagisse com vesículas lipídicas, portanto seu rendimento quântico não variasse na presença destas. Isto porque, queríamos medir sua intensidade de fluorescência, em presença de concentrações crescentes de lipídio, portanto valores de absorbância crescentes, e, após a correção, verificar qual o valor limite (e se existia) de absorbância para o qual a correção pela Eq. A3.4 ainda levava ao valor de I_{em} na ausência de lipídios. Esta escolha não é muito simples, pois a maioria dos fluoróforos, mesmo os muito aquo-solúveis, apresentam uma pequena partição na fase lipídica, o que altera seu rendimento quântico. A nossa opção foi a utilização de uma molécula com carga elétrica (-3), 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfonato (piranina), em dispersões lipídicas de DMPG, aniônico¹. A repulsão eletrostática entre o fluoróforo e o lipídio garante que o primeiro esteja sempre em solução (Clement e Gould, 1981), não variando, portanto, seu rendimento quântico.

¹ Essa sugestão foi dada pelo Prof. Mário Politi, do Instituto de Química da USP.

Na Fig. A3.3 mostramos a variação observada de I_{em} , em função da absorbância da amostra, e a intensidade corrigida pela eq. A3.4. Foram usadas amostras de diferentes concentrações lipídicas, dando origem aos vários valores de absorbância mostrados nas figuras. No experimento de fluorescência da Fig. A3.3 foi utilizada uma cela de parede grossa, sendo $l = 0,4\text{ cm}$ e $l' = 1\text{ cm}$ (ver Fig. A3.1). Como o rendimento quântico da piranina não deve variar com a concentração lipídica, I_{em}^{cor} deveria ser constante. Vemos, portanto, que a correção só é válida até $A(\lambda = 290; l = 1\text{ cm}) \approx 0,5$. Neste caso corrigimos somente para o espalhamento em $\lambda_{ex} = 290\text{ nm}$, pois o espalhamento em $\lambda_{em} = 514\text{ nm}$ é desprezível.

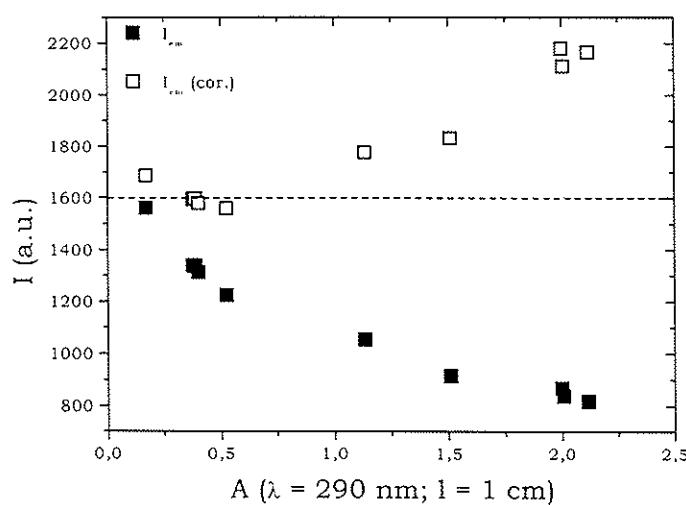


Fig. A3.3. Variação da intensidade de emissão fluorescente da piranina (cela de $l = 0,4\text{ cm}$ e $l' = 1\text{ cm}$, como definidos na Fig. A3.1), antes (■) e após (□) a correção devida a espalhamento de luz, em função da absorbância da amostra em $\lambda = 290\text{ nm}$ (cela $l = 1\text{ cm}$). $\lambda_{ex} = 290\text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 514\text{ nm}$.

É importante notar que na Fig. A3.3 mostramos a variação da intensidade de fluorescência com a absorbância no comprimento de onda de excitação, isto pois o limite de validade da correção é dependente deste valor, para o qual o espalhamento é máximo. Mesmo não sendo o máximo de absorção da piranina em 290 nm, usamos este comprimento de onda para excitar a molécula pois estávamos interessados na avaliação da correção para espalhamento da fluorescência do triptofano e da melatonina, onde este é o λ_{ex} usado. Como já mencionado, no λ_{em} usado para a piranina, 514 nm, o espalhamento é desprezível, o que pode não acontecer para o triptofano e melatonina, onde um pequeno espalhamento ainda deve ser observado em seus comprimentos de onda de emissão, em torno de 350 nm, e deve ser também usado para a correção.

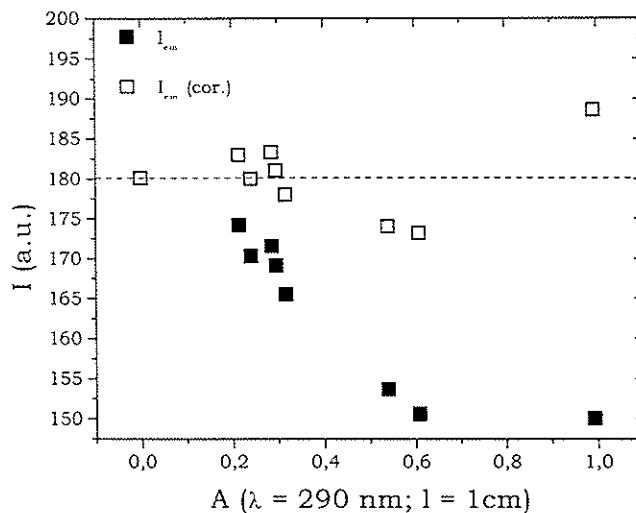


Fig. A3.4. Variação da intensidade de emissão fluorescente da piranina (cela face frontal 45°), antes (■) e após (□) a correção devida a espalhamento de luz, em função da absorbância da amostra em $\lambda = 290 \text{ nm}$ (cela $l = 1 \text{ cm}$). $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$.

Portanto, para amostras que espalham muita luz, deve-se utilizar as celas de face frontal (Fig. A3.2). Na Fig. A3.4 vemos que, mesmo para a cela de 45° , é necessário fazer correções para o espalhamento. Como nesta cela não sabemos os valores de l e l' , o que fizemos foi utilizar um caminho ótico médio para a correção de todas as medidas, média dos valores encontrados para as correções de I_{em} para as diferentes absorbâncias, assumindo que $I_{\text{em}}^{\text{cor.}}$ não variasse. A média encontrada por nós para três diferentes experimentos foi $l_{\text{médio}} = 1,0 \text{ mm}$. O problema que encontramos com essa cela foi a superposição do espectro de fluorescência com as franjas de interferência, resultantes da luz refletida nas paredes interna e externa da cela. Isto porque, como pode ser visto na Fig. A3.2 as radiações emitida e refletida saem na mesma direção. Essa superposição causa imprecisão nas medidas de fluorescência. Este problema é especialmente relevante para amostras com baixa intensidade de fluorescência.

Isto nos levou a desenvolver no laboratório um arranjo onde a luz incidente faz um ângulo de 36° com a parede da cela, evitando a superposição das radiações emitida e refletida (Fig. A3.2). Na Fig. A3.5 mostramos a intensidade de luz emitida pela piranina em dispersões de DMPG. Vemos que até $A \approx 0,4$ (para $l = 1 \text{ mm}$) não são necessárias correções na I_{em} medida. Para maiores valores de espalhamento, as correções foram feitas utilizando-se um caminho ótico médio, como discutido acima ($l_{\text{médio}} = 0,2 \text{ mm}$).

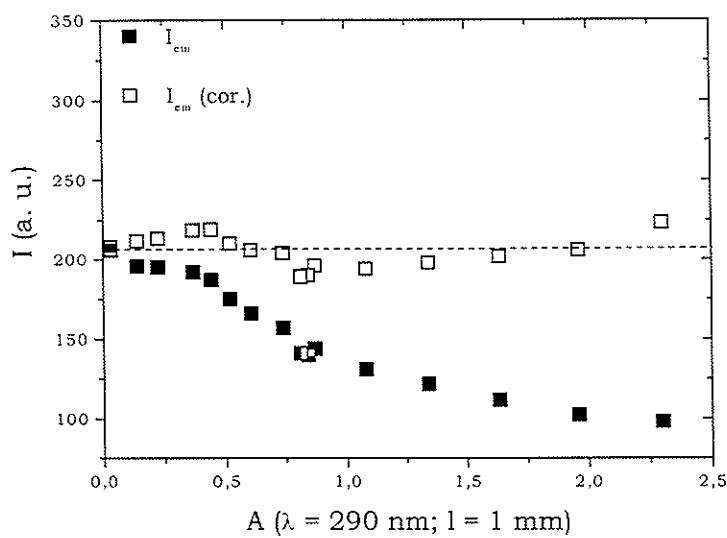


Fig. A3.5. Variação da intensidade de emissão fluorescente da piranina (cela face frontal 36°), antes (■) e após (□) a correção devida a espalhamento de luz, em função da absorbância da amostra em $\lambda = 290$ nm (cela $l = 1$ mm). $\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 514$ nm.

As correções discutidas acima foram fundamentais para nosso trabalho com vesículas de DMPG e DMPC, com diâmetros da ordem de 1000 Å, preparadas pelo método de extrusão, para concentrações lipídicas a partir de 0,1 mM.

VI. Bibliografia

- Abel-Malek, Z., Swope, V.B., Suzuki, I., Akcali, C., Harringers, M.D., Boyce, S.T., Urabe, K. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1789-1793.
- Atherton, N.M. (1993). Principles of Electron Magnetic Resonance, Ellis Horwood, PTR Prentice Hall.
- Augusto, O. e Carmona-Ribeiro, A.M. (1989). Biochem. Educat. 17, 209-210.
- Bales, B.L. (1989) em Biological Magnetic Resonance, vol. 8, Berliner, L.J. e Reuben, J.(Eds.), 77-130, Plenum Publishing Corporation.
- Biaggi, M.H., Schreier, S., Castrucci, A.M.L. e Lamy-Freund, M.T. (1993). Ann. N. Y. Acad. Sci. 680, 459-461.
- Biaggi, M.H., Pinheiro, T.J.T., Watts, A. e Lamy-Freund, M.T. (1996). Eur. Biophys. J. 24, 251-259.
- Biaggi, M.H., Riske, K.A. e Lamy-Freund, M.T. (1997). Biophys. Chem. 67, 139-149.
- Brown, M.F., Seelig, J. e Häberlen, U. (1979). J. Chem. Phys. 70, 5045-5053.
- Budil, D.E., Lee, S., Saxena, S. e Freed, J.H. (1996). J. Mag. Res. 120, 155-189.
- Cabane, B., Duplessix, R. e Zemb T. (1985). J. Physique 46, 2161-2178.
- Cantor, C.R. e Schimmel, P.R. (1980). Biophysical Chemistry, vol III, W.H. Freeman e Company, San Francisco.
- Cardinali, D.P., Lynch, H.J. e Wurtman (1972). Endocrinology 91, 1213-1218.
- Castle, J.D., e Hubbell, W.L. (1976). Biochemistry 15, 4818-4831.
- Castrucci, A.M.L., Sawyer, T.K., Al-Obeidi, F., Hruby, V.J. e Hadley, M.E. (1990). Drugs of the Future 15, 41-55.
- Cevc, G., Watts, A. e Marsh, D. (1980). FEBS Letters 120, 267-270.
- Cevc, G. (1991). Biochim. Biophys. Acta 1062, 59-69.
- Chattopadhyay, A e London, E. (1987). Biochemistry 26, 39-45.
- Clement, N.R. e Gould, J.M. (1981). Biochemistry 20, 1534-1438.
- Copeland, B.R. e Andersen, H.C. (1982). Biochemistry 21, 2811-2820.
- Costa E.J.X., Lopes R.H. e Lamy-Freund, M.T. (1995) J. Pineal Res. 19, 123-126.
- Costa E.J.X., Shida, C.S., Biaggi, M.H., Ito, A.S. e Lamy-Freund, M.T. (1997). FEBS Letters 416, 103-106.
- Davis J.H. (1983). Biochim. Biophys. Acta 737, 117-171.
- Dehlinger, P.J., Jost, P. e Griffith, O.H. (1974). Pro. Nac. Acad. Sci. 71, 2280-2284.
- Dobryakov, S.N. e Lebedev, Ya.S. (1969). Sov. Phys. Dokl. 13, 873-875.
- Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T e McLaughlin, S. (1979). Biochemistry 18, 5213-5223.
- Ellena, J.F., Archer, S.J., Dominey, R.N., Hill, B.D. e Cafiso, D.S. (1988). Biochim. Biophys. Acta 940, 63-70.
- Epand, R.M. e Hui, S.W. (1986). FEBS Letters 209(2), 257-260.
- Epand, R.M., Gabel, B., Epand, R.F., Sen, A. e Hui, S.W. (1992). Biophys. J. 63, 327-332.
- Epand, R.F., Kraayenhof, R., Sterk, G.J., Sang, H.W.W.F. e Epand, R.M. (1996). Biochim. Biophys. Acta 1284, 191-195.
- Evans, D.F., e Wennerstöm, H. (1994), em The Colloidal Domain, where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet, 110-114, VCH Publishers.
- Fasman, G.D. (Ed.) (1996). Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, Plenum Press.
- Ferroni, E.N. e Castrucci, A.M.L. (1987). Brazilian J. Med. Biol. Res. 20, 213-220.
- Filadelfi, A.M.C. e Castrucci, A.M.L. (1996). Gen. Comp. Endocrinol. 103, 192-199.
- Franklin, J.C., Cafiso, D.S. Flewelling, R.F. e Hubbell, W.L. (1993). Biophys. J. 64, 642-653.
- Freed, J.H. (1976) em Spin Labeling, Theory and Applications, Berliner, L.J. (Ed.), 53-132, Academic Press.
- Gaffney, B.J. (1976) em Spin Labeling, Theory and Applications, Berliner, L.J. (Ed.), 567-571, Academic Press.

- García J.J., Reiter R.J., Guerrero J.M., Escames G., Yu B.P., Oh C.S. e Muñoz-Hoyos A. (1997). FEBS Lett. 408, 297-300.
- Ge, M.T. e Freed, J.H. (1993). Biophys. J. 65, 2106-2123.
- Gennis, R.B. 1989. Biomembranes. Molecular Structure and Function, Springer-Verlag.
- Gershfeld, N.L., Stevens Jr, W.F. e Nossal, R.J. (1986). Faraday Discuss. Chem. Soc. 81, 19-28.
- Godici, P.E. e Landsberger, F.R. (1974). Biochemistry 13, 362-368.
- Görriksen, H., Marsh, D., Rietveld, A. e Kruijff, B. (1986). Biochemistry 25, 2904-2910.
- Griffith, O.H., Dehlinger, P.J. e Van, S.P. (1974). J. Membrane Biol. 15, 159-192.
- Griffith, O.H. e Jost, P.C. (1976) em Spin Labelling. Theory and Applications, Berliner, L.J.(Ed.), 453-523, Academic Press.
- Hadley, M.E., Mieyr, J.H., Martin, B.E., Castrucci, A.M.L., Hruby, V.J., Sawyer, T.K., Powers, E.A. e Rao, K.R. (1985). Comp. Biochem. Physiol. 81A, 1-6.
- Halpern, H.J., Peric, M., Yu, C. e Bales, B. (1993). J. Magn. Reson. 103, 13-22.
- Hartsel, S.C., e Cafiso, D.S. (1986). Biochemistry 25, 8214-8219.
- Hartshorn L., Harris C.C., Hey J.A., Jones T.I. e Milligan A.G. (1929). Em International Critical Tables of Numerical Data vol VI, pp. 81-107, McGraw-Hill.
- Heimburg, T. e Biltonen, R.L. (1994). Biochemistry 33, 9477-9488.
- Helm, C.A., Laxhuber, L., Lösche, M. e Möhwald, H. (1986). Colloid & Polymer Sci 264, 46-55.
- Hiemenz, P.C. (1984). Polymer Chemistry, Marcel Dekker, Inc.
- Hill, T.L. (1960). An Introduction to Statistical Thermodynamics, Dover Publications, Inc.
- Hruby, V.J., Cody, W.L., Castrucci, A.M.L. e Hadley, M.E. (1988). Collection Czechoslovak Chem. Commun. 53, 2549-2566.
- Hruby, V.J., Sharma, S.D., Toth, K., Jaw, J.Y., Al-Obeidi, F., Sawyer, T.K. e Hadley, M.E. (1993). Ann. N. Y. Acad. Sci. 680, 51-63.
- Hubbell, W.L. e McConnell, H.M. (1971). J. Am. Chem. Soc. 93, 314-326.
- Huetter, G. (1996). Gerontology 42, 87-96.
- Israelachvili, J. (1992) em Intermolecular and Surface Forces, 213-259, Academic Press.
- Ito, A.S., Castrucci, A.M.L., Hruby, V.J., Hadley, M.E., Krajcarski, T. e Szabo, A., (1993). Biochemistry 32, 12264-12272.
- Jacchieri, A.G. e Ito, A. (1995). Int. J. Quant. Chem. 53, 335-341.
- Jähnig, F. (1976). Biophysical Chemistry 4, 309-318.
- Jost, P.C., Libertine, L.J., Herbert, V.C. e Griffith, O.H. (1971). J. Mol. Biol. 59, 77-98.
- Khramstov, V.V., Marsh, Weiner, D. L. e Reznikov, V.A. (1992). Biochim. Biophys. Acta 1104, 317-324.
- Knowles, P.F., Marsh, D. e Rattle, H.W.E. (1976). Magnetic Resonance of Biomolecules, Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons.
- Krasnowska, E.K., Gratton, E. e Parasassi, T. (1998). Biophys. J. 74, 1984-1993.
- Lakhdar-Ghazal, F., Tichiadou, J.L. e Tocanne, J.F. (1983). Eur. J. Biochem. 134, 531-537.
- Lakhdar-Ghazal, F. e Tocanne, J.F. (1988). Biochim. Biophys. Acta 943, 19-27.
- Lakowicz, J.R. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press.
- Lange, A., Marsh, D., Wassmer, K.H., Meier, P. e Kothe, G. (1985). Biochemistry 24, 4383-4392.
- LeNeveu, D.M., Rand, R.P., Parsegian, V.A. e Gingell, D. (1977). Biophys. J. 18, 209-230.
- Lerner, A.B. (1993). Ann. N. Y. Acad. Sci. 31, 1-12.
- Lerner, A.B. e Lee, T.H. (1995). J. Am. Chem. Soc. 77, 1066-1067.
- Li, X. e Reed, W.F. (1991). J. Chem. Physics 94, 4568-4580.

- Lissi, E., Bianconi, M.L., Amaral, A.T., Paula, E., Blanch, L.E.B. e Schreier, S. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 46-50.
- Loosley-Millman, M.E., Rand, R.P. e Parsegian, V.A. (1982). *Biophys. J.* 40, 221-232.
- Louro S.R.W., Tabak M. e Nascimento O.R. (1994). *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 243-246.
- Macêdo, Z.S., Furquim, T.A. e Ito, A.S. (1996). *Biophys. Chem.* 59, 193-202.
- Marassi F.M. e Macdonald, P.M. (1991). *Biochemistry* 30, 10558-10566.
- Marsh, D. (1974). *Biochim Biophys. Acta* 363, 373-386.
- Marsh, D. (1981) em *Membrane Spectroscopy*, Grell, E. (Ed.), 51-142, Springer-Verlag.
- Marsh, D. (1989) em *Biological Magnetic Resonance*, vol. 8, Berliner, L.J. e Reuben, J. (Eds.), 255-303, Plenum Publishing Corporation.
- Marshall, A.G. (1978). *Biophysical Chemistry, Principles, Techniques and Applications*, John Wiley & Sons.
- Marshall K.A., Reiter R.J., Poeggeler B., Aruoma O.I. e Halliwell B. (1996). *Free Rad. Biol. Med.* 21, 307-315.
- Mukerjee, P., Ramachandran, C. e Pyter, R.A. (1982). *J. Phys. Chem.* 86, 3189-3197
- Parsegian, V.A., Rand R.P. e Fuller N.L. (1991). *J. Phys. Chem.* 95, 4777-4782.
- Pascutti, P.G., El-Jaik, L.J., Bish, P.M., Mundim, K.C. e Ito, A.S. (1998). Submetido à publicação.
- Pérez-Gil, J., Casals, C. e Marsh, D. (1995). *Biochemistry* 34, 3964-3971.
- Ptak, M., Egret-Charlier, M., Sanson, A. e Boloussa, O. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* 600, 387-397.
- Quina, F.H., Nassar, P.M. Bonilha, J.B.S. e Bales, B.L. (1995). *J. Phys. Chem.* 99, 17028-17031.
- Reiter, R.J. (1980). *Endocrine Rev.* 1, 109-131.
- Reiter, R.J. (1991). *News Physiol. Sci.* 6, 223-227.
- Reiter, R.J., Poeggeler B., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C. e Guerrero J.M. (1993). *Neuroendocrinol. Lett.* 15, 103-116.
- Riske, K.A., Politi, M.J., Reed, W.F. e Lamy-Freund, M.T. (1997). *Chem. Phys. Lipids* 89, 31-44.
- Riske, K.A. (1997). Tese de Doutorado, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Riske, K.A., Nascimento, O.R., Peric, M., Bales, B.L. e Lamy-Freund, M.T. (1998). Submetido à publicação.
- Sacré, M.M e Tocanne, J.F. (1977). *Chem. Phys. Lipids* 18, 334-354.
- Salonen, I.S., Eklund, K.K., Virtanen, J.A. e Kinnunen, P.K.J. (1989). *Biochim. Biophys. Acta* 982, 205-215.
- Sanioti D.L. e Schreier S. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Com.* 67, 530-537.
- Sankaram, M.B., Brophy, P.J. e Marsh, D. (1989). *Biochemistry* 28, 9685- 9691.
- Sargent, D. e Schwyzer, R. (1986). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 83, 5774-5778.
- Sawyer, T.K., Sanfilippo, P.J., Hruby, V.J., Engel, M.H., Heward, C.B., Burnett, K.B. e Hadley, M.E. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5754-5758.
- Schneider, D.J. e Freed, J.H. (1989) em *Biological Magnetic Resonance*, vol. 8, Berliner, L.J. e Reuben, J. (Eds.), 1-76, Plenum Publishing Corporation
- Schreier, S., Polnaszek, C.F. e Smith, I.C.P. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 515, 375-436.
- Schwartz, R.N., Peric, M., Smith, S.A. e Bales, B. (1997). *J. Phys. Chem.* 101, 8735-
- Schwyzer, R. (1986). *Biochemistry* 25, 6335-6341.
- Seelig, J. (1970). *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3881-3887.
- Seelig, J. (1976) em *Spin Labelling. Theory and Applications*, Berliner, L.J.(Ed.), 373-409, Academic Press.
- Seelig, J., Macdonald, P.M. e Scherer, P.G. (1987). *Biochemistry* 26, 7535-7541.
- Shida, C.S., Castrucci A.M.L. e Lamy-Freund M.T. (1994) *J. Pineal Res.* 16, 198-201.
- Slichter, C.P. (1989). *Principles of Magentic Resonance*, Springer-Verlag.

- Smith, I.C.P. (1972) em Biological Applications of Electron Spin Resonance, Swartz, H.M., Bolton, J.R. e Borg, D.C. (Eds.), 483-539, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc.
- Subczynski, W.K. e Kusumi, A. (1986). *Biochim. Biophys. Acta* 854, 318-320.
- Subczynski, W.K., Markowska, E., Gruszecki, W.I. e Sielewiesiuk, J. (1992). *Biochim. Biophys. Acta* 1105, 97-108.
- Sugden, D. (1989). *Experientia* 45, 922-932.
- Tan, D.X., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Chen, L.D., Chen, S. Manchester, L.C. e Barlow-Walden L.R. (1993). *Cancer Lett.* 70, 65-71.
- Tocanne, J.F., Ververgaert, P.H.J.T., Verkleij, A.J. e van Deenen, L.L.M. (1974). *Chem. Phys. Lipids* 12, 201-219.
- Tocanne, J.F. e Tessié, J. (1990). *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 111-142.
- Toko, K. e Yamafuji, K. (1980). *Chem. Phys. Lipids* 26, 79-99.
- Träuble, H. e Eibl, H. (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 214-219.
- Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P. e Eibl, H. (1976). *Biophys. Chem.* 4, 319-342.
- Van Holde, K.E. (1971). Physical Biochemistry, Prentice-Hall, Inc.
- Voet, D e Voet J.G. (1990). Biochemistry, John Wiley & Sons. Inc.
- Watts, A., Harlos, K. e Marsh, D. (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 645, 91-96.
- Yin J.-J., Feix, J.B. e Hyde, J.S. (1988). *Biophys. J.* 53, 521-531.
- Zhang, Y.P., Lewis, R.N.A.H. e McElhaney, R.N. (1997). *Biophys. J.* 72, 779-793.
- Zimm, B.H. (1948). *J. Chem. Phys.* 16, 1093-1116.

Apêndice 4. Cópias dos artigos nos quais se baseia o presente trabalho

Spin label and ^2H -NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers

Marcia H. Biaggi¹, Teresa J. T. Pinheiro^{2,*}, Anthony Watts², M. Teresa Lamy-Freund¹

¹ Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318, CEP 05389-970, São Paulo, Brasil (Tel.: 0055-11-818-6829; Fax: 0055-11-813-4334, e-mail: MTFREUND @ IF.USP.BR.)

² Department of Biochemistry, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3QU, UK

Received: 21 November 1995 / Accepted: 19 January 1996

Abstract. The interaction of the cationic tridecapeptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) and the biologically more active analog [Nle^4 , DPhe^7]- α -MSH with lipid membranes was investigated by means of ESR of spin probes incorporated in the bilayer, and NMR of deuterated lipids. All spin labels used here, stearic acid and phospholipid derivatives labeled at the 5th and 12th position of the hydrocarbon chain, and the cholestane label, incorporated into anionic vesicles of DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphoglycerol) in the liquid-crystalline phase, indicated that both peptides decrease the motional freedom of the acyl chains. No peptide effect was detected with neutral lipid bilayers. Changes in the α -deuteron quadrupolar splittings and spin lattice relaxation time of DMPG deuterated at the glycerol headgroup paralleled the results obtained with ESR, showing that the peptides cause a better packing both at the headgroup and at the acyl chain bilayer regions. The stronger effect caused by the more potent analog in the membrane structure, when compared to the native hormone, is discussed in terms of its larger lipid association constant and/or its deeper penetration into the bilayer.

Key words: Melanotropic peptide – Peptide-lipid interaction – Spin label – ^2H -NMR

Introduction

α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH; Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂) is secreted by the *pars intermedia* of the pituitary gland, and is derived from the precursor protein pro-opiomelanocortin. It has the same first thirteen amino acids

in the sequence as the largest pituitary hormone adrenocorticotropin (ACTH), with which it shares a number of common hormonal properties (Sawyer et al. 1980; Castrucci et al. 1990). In most vertebrates, α -MSH is the physiologically relevant hormone regulating skin pigmentation (causing darkening), as well as being involved in many other biological functions, such as fetal growth and behavior (Castrucci et al. 1990).

Several modifications made within the primary structure of α -MSH have yielded peptides with superpotent activity (Sawyer et al. 1980). For example, the native hormone derivative [Nle^4 , DPhe^7]- α -MSH (hereafter referred to as MSH-I), which exhibits increased potency and prolonged activity in the frog skin bioassay when compared to the native molecule (Sawyer et al. 1980). It was suggested that the increased potency of MSH-I could be attributed to a reverse turn within the α -MSH₄₋₁₀ sequence which is conformationally-stabilized by the D-Phe⁷ substitution. The conformational structure of the analog could facilitate its direct binding to membrane protein receptors. On the other hand, considering the possible catalytic effect of the lipid phase of the cell membrane on peptide-membrane protein interaction (Sargent and Schwyzer 1986; Schwyzer 1986), this present study focuses on the interaction of the two peptides, α -MSH and MSH-I, with pure lipid bilayers. A comparison between the strength and the nature of the interaction of the two peptides with multilamellar liposomes, used here as *in vitro* models of biological membranes, may help in an understanding of the role played by the lipid phase in the peptide action.

It was reported that both the native hormone α -MSH and the analog MSH-I interact with acidic lipid bilayers and not with neutral ones (Ito et al. 1993). This is in accord with them being cationic at neutral pH, with approximately one net positive charge. Variations in the tryptophan fluorescence properties indicated structural changes on incorporation of the two peptides into DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphoglycerol), DMPS (1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-3-phosphoserine) and POPS (1-palmitoyl, 2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphoserine) bilayers (Ito et al. 1993). Larger association constants were ob-

* Present address: Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK

Correspondence to: M. Teresa Lamy-Freund

tained for the analog when compared to the native hormone. This result parallels the reported biological activities of the peptides. Additionally, ESR studies using the 3-doxyl cholestane spin label (CSL) incorporated in oriented bilayers indicated that the peptides have opposite effects on the order and rate of movement of the label in DMPG membranes (Biaggi et al. 1993). The native hormone induced greater rate of chain motion while the analog increased the chain packing.

The present work studies the interaction of α -MSH and the analog MSH-I with pure acidic DMPG liposomes, using different spin label molecules incorporated in the bilayer, and deuterated headgroup lipids. Spin label ESR and ^2H NMR are particularly suitable methods for the study of membrane structural and/or dynamics changes caused by peptide-lipid interaction (see for example, Sankaran et al. 1989; Watts 1993). The acyl chain spin labels, stearic acid and phospholipid derivatives, report on the gauche-trans isomerization of the acyl chains, whereas the cholestane spin label gives information about the bilayer orientation or the lipid rotational motion as a whole. The spin labels used here give complementary information on the fluidity of the membrane hydrocarbon region. The bilayer surface was monitored via the deuterium quadrupolar interaction of the α , β and γ segments of the glycerol headgroup.

Materials and methods

Materials

The peptides α -MSH and MSH-I, the spin labels 5- and 12-SASL (5- and 12-doxylstearic acid spin label) and the cholestane spin label CSL were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Phospholipids, DMPG (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) and DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), and phospholipid spin labels 5- and 12-PCSL (1-palmitoyl-2-[4- or 12-doxyl stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). The buffer used was 10 mM hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) at pH 7.4. All reagents were used without further purification. DMPC-d₄ and DMPG-d₅ were synthesized as described in Sixl and Watts (1982) and Sixl et al. (1984).

ESR sample preparation

Stock solutions of spin labels were prepared in chloroform and stored at -80 °C. The membranes were multilamellar dispersions of lipids (10 mM) containing 1 mol% of spin label. A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids and spin labels, dried under a stream of N₂ and left under vacuum for a minimum of 5 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the buffer solution, without or with the desired concentration of melanotropic peptides, followed by vortexing.

NMR sample preparation

Pure deuterated lipid samples were prepared as described above, but with a higher concentration of lipids (0.3 M)

ESR spectroscopy

ESR measurements were performed in a Bruker ER 200L-SRC spectrometer interfaced with an IBM-PC like computer for spectrum digitalization. A field modulation amplitude of 0.08 mT and microwave power of 10 mW were used. The temperature was controlled to about 0.5 °C with a Bruker B-ST 100/700 variable temperature device. The temperature was always varied from 40 to 0 °C and monitored with a Fluke 51 K/J thermometer. As the stearic acid spin labels presented a small partition in solution (12-SASL mainly), the ESR spectra shown here are the result of the subtraction of free aqueous label signal from the composite spectrum, using the software EPRANAL⁴ (J. Rowntree, P. Fajer and B. Bennet, University of Oxford, UK). For the measurement of the spectrum parameters the ORIGIN software (MicroCal Software, Inc., MA USA) was used.

Effective order parameters, S_{eff} , were calculated from the expression

$$S_{\text{eff}} = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a'_o}{a_o}$$

where $2A_{||}$ is the maximum hyperfine splitting and

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 \left[1 - \frac{A_{||} - A_{\min}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \right]$$

where $2A_{\min}$ is the measured inner hyperfine splitting (Griffith and Jost 1976; Gaffney 1976). The polarity was normalized from a'_o/a_o where

$$a'_o = (1/3)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

and

$$a_o = (1/3)(A_{||} + 2A_{\perp})$$

A_{xx} , A_{yy} and A_{zz} being the principal values of the hyperfine tensor for doxylpropane (Griffith and Jost 1976). The data shown here are the mean of at least three experiments.

NMR spectroscopy

^2H NMR spectra were recorded on a home built 360 MHz ($H_0 = 8.4$ T) spectrometer (Department of Biochemistry, University of Oxford), equipped with a Nicolet pulse programmer and operating at 55.3 MHz for the ^2H nucleus. Single pulse modes were used with $\pi/2$ pulse widths varying from 7 to 9 μs . Deuterium spin-lattice relaxation times T_1 were measured by the inversion-recovery technique, a 180°- τ -90° pulse sequence being employed. Temperature was controlled to an accuracy of ± 0.5 °C by a nitrogen gas flow temperature unit. The data shown here are the mean of at least three experiments.

Results and discussion

ESR of stearic acid and phospholipid spin labels

Figure 1 shows the ESR spectra of stearic acids labeled at the 5th and 12th position of the hydrocarbon chain incorporated in anionic vesicles of DMPG, in the absence and presence of melanotropic peptides. The spectra were recorded at 40 °C, above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature of DMPG ($T_m \sim 21$ °C). At the two positions of the spin label group the ESR spectrum is sensitive to the presence of the cationic peptides. Both α -MSH and MSH-I increase the spectral anisotropy, giving rise to spectra that are broader and have larger hyperfine splittings than the spectra for the lipid alone. This corresponds to a restriction of the motion of the spin-labeled chains in the presence of the peptides (Griffith and Jost 1976). No change in the ESR spectra was observed when the two peptides were added to bilayers of the zwitterionic lipid DMPC.

The effect of the peptides on the dynamics and structural properties of DMPG bilayers was quantified by measuring the outer hyperfine splitting A_{max} . This is a useful empirical parameter which contains contributions from both the amplitude and the rate of motion of the spin-labeled chains (Marsh 1981 and references therein). The value of A_{max} decreases as the spin label micro-environment becomes less organized and/or more mobile. The temperature dependence of A_{max} is shown in Fig. 2, in the presence and absence of peptides, for stearic acid and phospholipid labels. All labels monitor a phase transition around 21 °C. This T_m value is in accord with that found before (Heimburg and Biltonen, 1994) for 10 mM DMPG at low ionic strength. Above the transition temperature both peptides increase the A_{max} values of labels placed either near the headgroup (5-SASL and 5-PCSL) or deep in the bilayer (12-SASL and 12-PCSL). The analog MSH-I is more efficient in restricting the lipids mobility than the natural hormone. This result could be related to either the larger value of the peptide-lipid association constant found for the analog relative to the native hormone (Ito et al. 1993), or could be attributed to a deeper penetration of the analog into the bilayer, or to both effects.

The bilayer phase transition monitored by the acyl chain spin-labels clearly reflects a broadening of the DMPG main chain melting phase transition caused by the peptide-lipid interaction, with a more pronounced effect with MSH-I. This effect is similar to that observed with other molecules, such as polar carotenoids and cholesterol, which are thought to penetrate the lipid bilayer (Subczynski et al. 1992). For the nitroxide monitoring the 12th position of the hydrocarbon chain (12-SASL and 12-PCSL) the effect of the peptides on the membrane structure below the phase transition is rather complex and subtle, and will not be discussed here.

The slightly different effects obtained with the stearic acid labels when compared to their equivalent phospholipid labels can probably be attributed to their relatively different positions in the lipid bilayer. Owing to the surface negative charge of the DMPG membrane, the stearic acid labels should be mainly protonated at pH 7.4 (pK_a

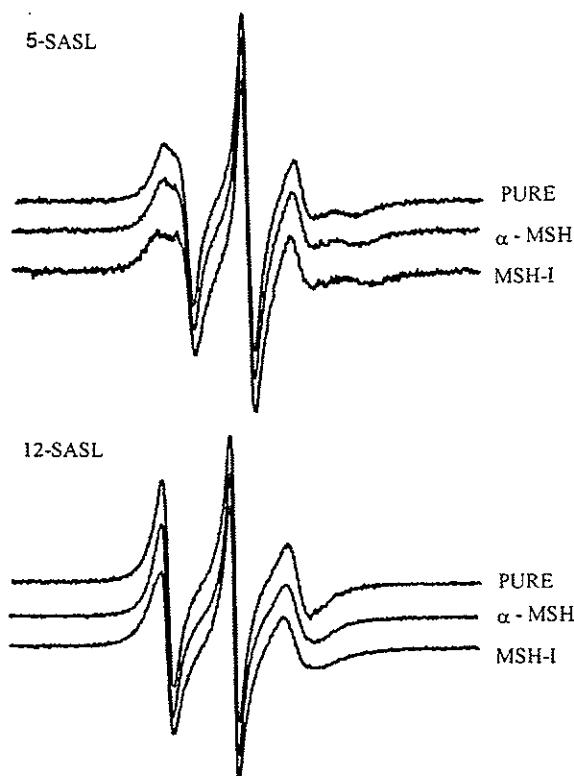


Fig. 1. ESR spectra of 5-SASL and 12-SASL incorporated in DMPG liposomes in the absence and in the presence of 10 mol% peptide. Total spectrum width is 100 G. T = 40 °C

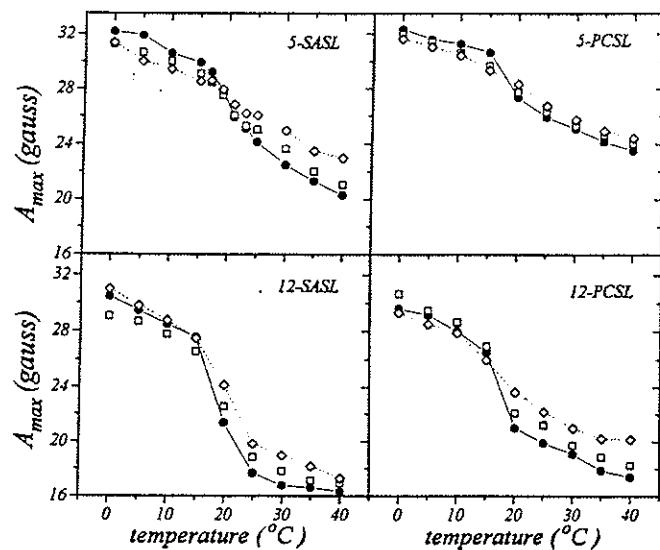


Fig. 2. Temperature profiles of maximum hyperfine splitting (A_{max}) of different acyl chain spin labels incorporated in DMPG liposomes in the presence of 0, (●), and 10 mol% α -MSH (□) and MSH-I (◇)

≥ 8.0 , Ptak et al. 1980), and could penetrate more deeply in the bilayer. This is in agreement with the lower values of A_{max} obtained for 5-SASL and 12-SASL when compared to 5-PCSL and 12-PCSL, respectively (mainly above T_m).

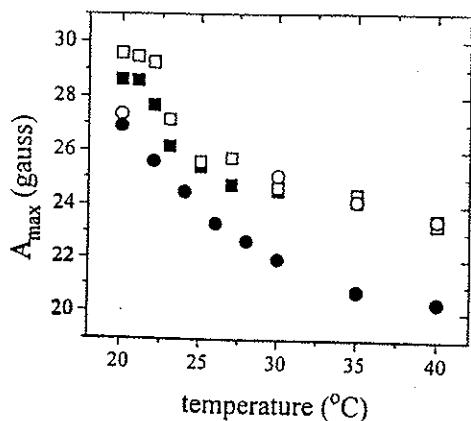


Fig. 3. Temperature dependence of A_{\max} values of 5-SASL (filled symbols) and 5-PCSL (open symbols) in DMPC (■ and □) and DMPG (● and ○) membranes

To further illustrate the dependence of the surface charge on the relative positions of stearic acid and phospholipid labels in bilayers, the same labels were incorporated in DMPC vesicles. In this zwitterionic membrane one would expect that the stearic acid would be mainly deprotonated at pH 7.4 ($pK_a \sim 6.5$, Ptak et al. 1980). Therefore the charged SASL incorporated in DMPC would be located in a position closer to the bilayer surface than when in DMPG vesicles. On the other hand, the depth position of the PCSL should not be a function of the membrane surface charge. Accordingly, Fig. 3 shows that the A_{\max} values of 5-SASL and 5-PCSL in DMPC are very similar and also similar to that of 5-PCSL in DMPG, whereas 5-SASL in DMPG yields smaller A_{\max} values. If we assume similar packing for DMPC and DMPG bilayers¹ this result indicates that 5-PCSL in both DMPG and DMPC and 5-SASL in DMPC are located at similar depths, and the neutral 5-SASL in DMPG is clearly located deeper into the bilayer, presenting a smaller A_{\max} value. The above discussion can be understood with reference to the spin label average position, as it is known that acyl labels placed deep in the membrane undergo large vertical fluctuations (Godici and Landsberger 1974; Ellena et al. 1988; Yin et al. 1988).

To investigate the possible effect of the peptides on the polarity of the phospholipids spin label environment, effective isotropic hyperfine constants (a_o) were calculated (see Materials and methods) in the absence and in the presence of peptides. The values of a_o are known to be dependent on the net unpaired spin density on the N-atom of the nitroxide, which is a function of the nitroxide micro-environment (Seelig et al. 1972). An increase in polarity is accompanied by an increase in the isotropic hyperfine splitting. Above 25 °C a_o values were approximately independent of the temperature and Table 1 displays the averaged values from 25–40 °C. As expected, the nitroxide closer to the polar-apolar interface (5-PCSL) senses a more po-

¹ It is a reasonable assumption as the two lipids have similar transition temperatures, despite the areas per lipid head group being slightly different, according to Pasher et al. 1992.

Table 1. Effect of melanotropic peptides (10 mol%) on the isotropic hyperfine constant a_o (Gauss) of two different acyl chain spin labels

	5-PCSL	12-PCSL
DMPG	14.95	14.21
+ α -MSH	15.05	14.00
+ MSH-I	14.97	13.63

Table 2. Effect of melanotropic peptides (10 mol%) on the effective order parameter S_{eff} of two different acyl chain spin labels. T=35 °C

	5-SASL	12-SASL
DMPG	0.324	0.103
+ α -MSH	0.350	0.125
+ MSH-I	0.434	0.164

lar region than that closer to the terminal methyl ends of the chains (12-PCSL). The polarity of the upper region of the bilayer is not significantly affected by the presence of the peptides, as monitored by the a_o value of 5-PCSL. However, the polarity of the micro-region monitored by the 12-PCSL decreases upon the interaction with the peptides. Again, the analog is more effective in changing the a_o value than α -MSH. The above data are consistent with the binding of the peptides resulting in a decrease in the motional freedom of the acyl chains, therefore causing a decrease on the vertical fluctuations of the labels. The spin label positioned at the 5th carbon would not be much affected, as its vertical fluctuation is not very large (Yin et al. 1988), but the label at the 12th position would be restricted to a region deep in the bilayer, resulting in an average lower polarity for its micro-environment.

Effective order parameters (S_{eff}) were calculated (see Materials and methods) from ESR signals above the gel-fluid phase transition, when the spin-label motion is fast on the ESR time-scale (correlation time $\tau \leq 3 \times 10^{-9}$ s). It has been shown that spectra similar to those shown in Fig. 1 also contain important contributions from slow molecular motions (Lange et al. 1985). Therefore, S_{eff} is a parameter similar to A_{\max} in the sense that it contains contributions from both order and rate of motion, although the principal contribution to S_{eff} is the amplitude of the segmental motion of the alkyl chain (Schindler and Seelig 1973). Unlike A_{\max} , S_{eff} is not influenced by the polarity of the spin label environment, as the proper correction was made (see Materials and methods). Calculated S_{eff} values for 5- and 12-SASL at 35 °C (Table 2) show similar dependences on the presence of α -MSH and MSH-I as the A_{\max} values measured above the lipid transition temperature (Fig. 2).

The S_{eff} dependence on peptide concentration is shown in Fig. 4. When monitored by the 12-SASL, 5 mol% is a membrane saturating concentration for both peptides. Slightly different results were obtained with other spin labels (not shown). It is seen that the effect of MSH-I on the membrane structure is greater than that of the native hormone, at all concentrations studied here.

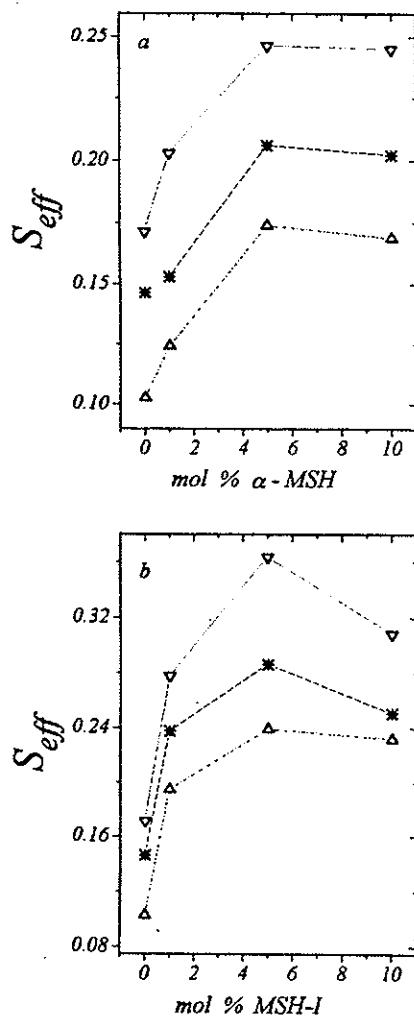


Fig. 4. Dependence of the effective order parameter (S_{eff}) of 12-SASL in DMPG liposomes on the mole fraction of α -MSH a and MSH-I b at 30°C (▽), 35°C (*) and 40°C (△)

ESR of cholestan spin label

For a further understanding of the effects of melanotropic peptides on lipid bilayers, another type of spin probe was used, the cholesterol analog CSL. This label has a fairly rigid structure and gives information on the rate of lipid rotational long axis motion, whereas the acyl chain spin labels monitor mainly the amplitude and rate of segmental motion (*gauche-trans* isomerism) (Schindler and Seelig 1973, 1974). Figure 5 displays typical spectra of CSL incorporated in DMPG bilayers in the absence and presence of peptides, below and above the main phase transition temperature. MSH-I significantly changes the form of the CSL ESR signal at low temperatures, indicating a decrease in the spectral anisotropy caused by the peptide-lipid interaction. In a similar way to the results obtained with the acyl chain labels, the peptides cause no significant alteration in the ESR spectra of CSL incorporated into DMPC liposomes.

The ESR spectra of CSL in DMPG bilayers were analyzed by measuring the outer hyperfine splitting A_{max} (Fig. 6) over a wide range of temperature, though the A_{max}

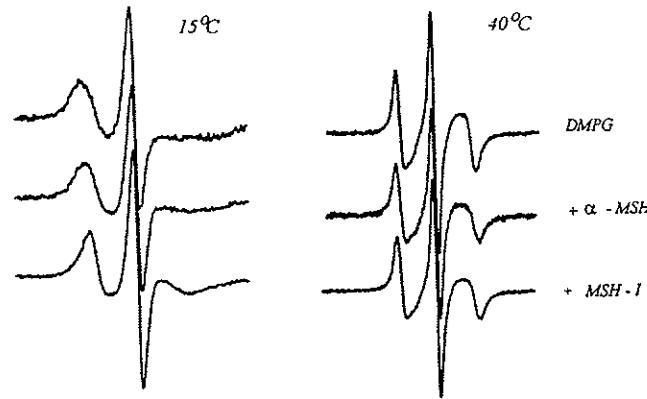


Fig. 5. ESR spectra of CSL incorporated in DMPG liposomes in the absence and in the presence of 10 mol% peptide, below and above the lipid main phase transition. Total spectra width is 100 G

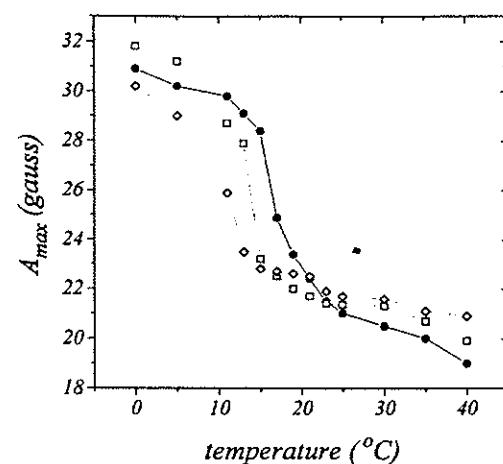


Fig. 6. Temperature profiles of maximum hyperfine splitting (A_{max}) of CSL incorporated in DMPG liposomes in the presence of 0 (●), and 10 mol% α -MSH (□) and MSH-I (◇)

values at low temperatures are rather difficult to measure accurately. In line with the results obtained with the acyl chain labels, both peptides increase the A_{max} values above the main phase transition, having therefore a packing effect on the lipid bilayer. However, in contrast to the other spin labels, CSL monitors a significant shift on the lipid main phase transition temperature caused by the presence of the analog MSH-I. This is consistent with partial penetration of the peptide into the hydrocarbon region of the bilayer preventing crystallization of the chains until a lower temperature is reached.

It is interesting to note that the main DMPG melting temperature, monitored via the cholestan spin label (Fig. 6) is shifted a few degrees to lower values, when compared with that yielded by the acyl chain spin labels (Fig. 2). Different temperature profiles, yielding different T_m values, with sterol and acyl chain labels have been seen before, though not extensively discussed (for instance see Marsh 1980; Subczynski et al. 1992). CSL has also been reported to induce an additional temperature transition at ~20°C in different phospholipid (Presti and Chan 1982), although DMPG was not studied. In DMPC, which has a

transition temperature similar to that of DMPG, around 23 °C (Watts et al. 1978), CSL was found to yield a T_m value a few units lower, around 17 °C (Fig. 2 in Presti and Chan 1982). This result is in accord with that shown here (Fig. 6).

On the other hand, particularly for DMPG, it has been recently shown that the phospholipid bilayer thermotropic behavior is rather complex (Heimburg and Biltonen 1994), depending on many different factors, such as lipid concentration, ionic strength, and rate of heating or cooling. It was suggested that DMPG exists as several slightly different structures, over a broad temperature range. Therefore, the reason why CSL, incorporated in DMPG, monitors a somewhat different T_m than the acyl chain labels needs to be further investigated. For instance, it could be related to an alteration of the equilibrium between the different DMPG structures caused by the sterol label (even at concentrations as low as 1 mol%), or the cholestanol label could be preferentially distributed in a region different to that labeled by the acyl chain probes. The role the melanotropic peptides play in the thermotropic equilibrium of the possible different DMPG structures is also not resolved.

It is important to point out that the data shown here, for the different spin labels incorporated in DMPG liposomes, do not agree with the results obtained with CSL in oriented bilayers (Biaggi et al. 1993). It was reported that while the natural hormone decreased both the order parameter and the rotation correlation time, the analog caused an opposite effect (Biaggi et al. 1993). Although the oriented films contained 10 mol% cholesterol, which was necessary for promoting the orientation of the lipid bilayers, and the spectra were recorded at 40 °C only, the discrepancy between the results obtained with the two lipid systems needs further investigation, including a possible cholesterol dependent effect.

NMR of headgroup deuterated DMPG-d₅ and DMPC-d₄

The ²H NMR spectra at 35 °C of DMPG deuterated at the α , β and γ segments of the glycerol headgroup are shown in Fig. 7. The spectra are typical of random dispersions of liquid-crystalline lipids in a bilayer arrangement (Seelig 1977). Although they are quite noisy and do not present perfect Pake shapes, the separation between the maxima provides an approximate evaluation of the deuterium quadrupolar splitting (Δv_Q), which are related to changes of the headgroup conformation. The addition of the cationic peptides α -MSH or MSH-I to the negative DMPG membrane decreases the α -quadrupolar splitting without affecting significantly the β - and γ -splitting, within the accuracy of the measurement. Increasing the temperature from 25 to 45 °C causes only a slight variation of the α -quadrupolar splitting (Fig. 8), both in the presence and absence of peptides. For temperatures below 23 °C, a broadening of the ²H NMR spectra occurs as expected for lipids in the gel phase. Although the interaction of the two peptides with DMPG membrane causes similar effects on the α -quadrupolar splitting, the maximum splitting decrease is achieved with only 1 mol% MSH-I whereas 5 mol% is necessary for the natural hormone (Fig. 7 and

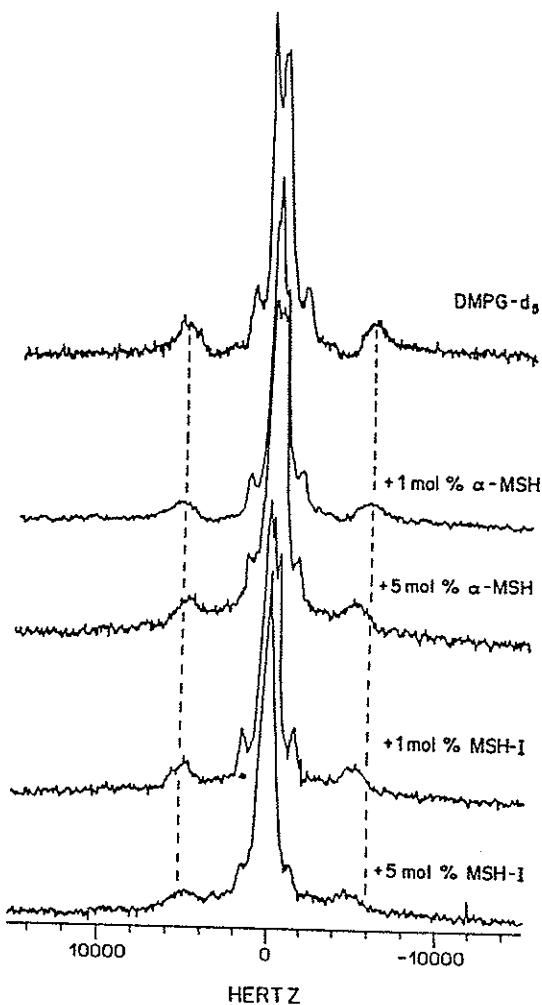


Fig. 7. Deuterium quadrupolar NMR spectra of DMPG-d₅ liposomes in the presence of different concentrations of α -MSH and MSH-I

Fig. 8). This is certainly a strong indication of a higher partition coefficient for MSH-I than for α -MSH in DMPG vesicles. At the concentrations used here, the peptides do not significantly affect the quadrupolar splitting of headgroup deuterated DMPC at the α and β positions. Under no conditions were separated spectra for free lipid and peptide-bound lipid observed. The deuterium spectra thus indicate a single, time-average headgroup conformation at the NMR time scale in all peptide-lipid systems studied.

The spin lattice relaxation times (T_1) for all the deuterated segments of DMPG are displayed in Table 3. They give information about the dynamic behavior of the deuterated segments. Upon peptide addition, the T_1 values of the α -deuterons of DMPG decrease whereas the T_1 values related to the β - and γ -splitting remain unaffected. From the deuterium spin-lattice relaxation times, in the limit of small order parameters, it is possible to estimate an effective correlation time (τ_c) for the CD fast, local, segmental motion (Brown et al. 1979; Davis 1983), according to the equation

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{8} \left(\frac{e^2 q Q}{\hbar} \right)^2 \tau_c$$

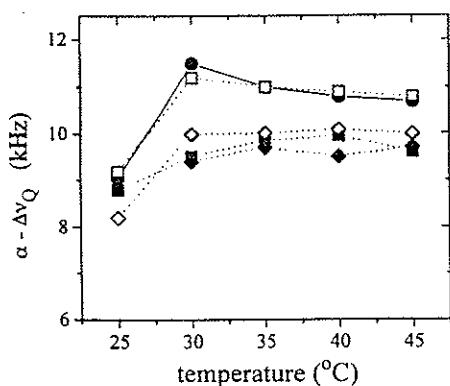


Fig. 8. Temperature dependence of the α -quadrupolar splitting ($\alpha - \Delta V_Q$) of headgroup deuterated DMPG in the presence of 0 (●), 1 (□) and 5 mol% α -MSH (■) and 1 (◇) and 5 mol% of MSH-I (◆).

Table 3. Deuterium NMR spin-lattice relaxation times T_1 (ms) for DMPG-d₅ multilamellar liposomes at 35°C

	α -CD ₂	β -CD	γ -CD ₂
DMPG	17.0 ± 0.4 (5.4) ^a	14.0 ± 0.9	19.2 ± 0.2
+ 1% α -MSH	15.5 ± 0.8 (5.9)	14.0 ± 0.7	18.7 ± 0.1
+ 5% α -MSH	14.8 ± 0.8 (6.2)	14.9 ± 0.4	18.2 ± 0.1
+ 1% MSH-I	15.2 ± 0.5 (6.1)	14.0 ± 0.8	17.8 ± 0.5
+ 5% MSH-I	14.0 ± 1.0 (6.6)	14.0 ± 0.9	18.6 ± 0.6

^a Numbers in parentheses refer to correlation times τ_c (see text)

where $(e^2 q Q / \hbar)$ is the static quadrupolar splitting constant.

Table 3 shows a decrease in the headgroup mobility caused by the peptide-membrane interaction. In agreement with the observed variations in the quadrupolar splitting, the analog MSH-I is more effective in changing the rates of motion than the natural hormone.

The small observed decrease in the DMPG α -CD quadrupolar splitting can be attributed to changes in the headgroup position rather than an increase of the amplitude of angular fluctuations, since the quadrupolar splittings are very sensitive to small variations in torsion angles (Seelig et al. 1987). Considering the change in the deuterium quadrupolar splitting, the effect of the cationic peptides upon DMPG bilayers could be attributed to variations in the surface charge density only (Seelig et al. 1987; Marassi and Macdonald 1991). However, the increase in the α -deuteron spin lattice relaxation time shows that the interaction of the melanotropic peptides with DMPG bilayers not only changes the headgroup dipole moment direction, but also alters the intermolecular interaction between neighboring headgroups. Although the deuterium NMR results do not allow any conclusion about the depth of bilayer penetration by the peptides, they indicate that the melanotropic peptides interact at least at the membrane surface, decreasing the DMPG net charge density and therefore allowing a better packing of the phospholipid head-

groups. Upon interaction with PG membranes, other cationic molecules have been found to decrease the lipid α -CD₂ quadrupolar splitting (Beschiaschvili and Seelig 1990; Marassi and Macdonald 1991) and decrease both the splitting values and the spin-lattice relaxation times (Sixl et al. 1984; Sixl and Watts 1985).

The changes that occur in the ²H NMR quadrupolar spectra of head group deuterated DMPG, due exclusively to surface charge variations, are expected to be much smaller than those for deuterated DMPC since both the orientation and the size of the PC dipole moment facilitates its interaction with the electrical field at the surface (Beschiaschvili and Seelig 1990; Marassi and Macdonald 1991). The size of the PG dipolar moment is around 1.7 times smaller than that of PC. The latter has been extensively used to monitor the interaction of different molecules with PC bilayers (for instance, Brown and Seelig 1977; Roux et al. 1988; Scherer and Seelig 1989; Pinheiro et al. 1994). Like other cationic molecules (Sixl et al. 1984; Sixl and Watts 1985; Marassi and Macdonald 1991), the melanotropic peptides do not alter the DMPC quadrupolar splitting.

General discussion

In line with previous results (Biaggi et al. 1993; Ito et al. 1993) it was found here that an obligatory role is played by electrostatic interactions in the binding of the cationic melanotropic peptides to lipid bilayers. The peptides were not found to interact with the neutral lipid DMPC, in contrast to the acidic lipid DMPG. This result can be attributed to the increase in the concentration of free peptide near the lipid-water interface due to electrostatic attraction between peptides and DMPG headgroups. Using fluorescence spectroscopy it was shown that association constant values for peptide-lipid interaction were approximately three orders of magnitude smaller when calculated accounting for electrostatic effects, through Gouy-Chapman potential functions (Ito et al. 1993). Thus, for monitoring membrane structural alterations caused by melanotropic peptides on the zwitterionic DMPC bilayer a much larger peptide concentration would be necessary.

The peptide-lipid interaction is primarily electrostatic in origin. The increase of the outer hyperfine splitting and the order parameters of the stearic acid and phospholipid spin labels could be attributed to the presence of the cationic peptides on the bilayer surface, which would decrease the membrane surface net charge, leading to a better packing of the hydrocarbon chains. However, several factors must be considered in favor of a partial penetration of the peptides into the hydrocarbon region of the bilayer, as discussed below.

The peptides are relatively small molecules², when compared to proteins, with only approximately one net

² Molecular dynamics simulations yielded an average area of 260 Å² for the peptides, both in aqueous and membrane medium (Pascutti et al., unpublished results). The molecules have not been simulated at the interface yet. Taking the area per lipid molecule of 44.0 Å² (Pasher et al. 1992), yields a stoichiometry of ca. 6 lipids per peptide, at the membrane surface.

charge. Considering their low lipid association constants (Ito et al. 1993), the peptide concentration on the membrane surface will be much lower than the total concentration used here, 10 mol% of the total lipids. Thus, the increase of the A_{max} parameter due to the screening of the lipid headgroups by the charged lipids should not be very relevant. We found a very small difference in A_{max} values for 12-PCSL incorporated in DMPG in the absence and in the presence of 0.3 M NaCl (results not shown). Sankaram et al. (1989) found a slight A_{max} increase of 5-PGSL in DMPG for NaCl concentrations above 1.0 M. Therefore, the alterations on the A_{max} values of the different labels used here, caused mainly by the analog MSH-I, could hardly be due to a rigidifying effect as a result of, exclusively, electrostatic surface interaction.

Furthermore, the broadening of the DMPG gel-to-liquid crystalline phase transition monitored by the 5-SASL and 5-PCSL is a strong indication of the penetration of the peptides into the bilayer. A simple screening of the electrostatic charges at the membrane surface would not decrease the A_{max} values below T_m . Those probes indicate that the peptides are bound to the membrane both above and below the transition temperature.

The shift in the DMPG transition temperature, monitored by CSL, due to the presence of the analog MSH-I is rather interesting, and needs further investigation. The effect of a screening of the surface charges would go in the opposite direction, with an increase of T_m , which is observed for uncharged DMPG at low pH values (Watts et al. 1978) and DMPG in high ionic strength medium (Cvec et al. 1980). It has been recently shown by fluorescence spectroscopy, that the analog MSH-I penetrates deeper in DMPG membranes than the native hormone (Macêdo et al. 1996). This is in accord with the larger effect obtained here with MSH-I as compared to α -MSH.

This work shows that both α -MSH and MSH-I interact with DMPG lipid bilayer turning the membrane more rigid at all depth positions monitored here. The analog was found to cause a stronger effect on the membrane than the native hormone, possibly related to both its larger lipid association constant (Ito et al. 1993) and its deeper penetration into the bilayer (Macêdo et al. 1996). The stronger interaction of MSH-I with the lipid phase of biological membranes could partially explain its superpotent activity. As suggested before (Schwyzer 1986), the membrane could play a role as catalyst for the peptide-receptor interaction, either by selecting the proper peptide conformation or just by increasing the chances of peptide-receptor contact, via lateral diffusion. It could also be speculated that the depth of peptide penetration could facilitate its binding to the discriminator receptor site.

Acknowledgements. This work was supported by FAPESP, CNPq, BID and FINEP. We are grateful to Dr. S. Schreier for helpful discussions and for making the ESR spectrometer available. We also thank Dr. A. M. L. Castrucci for introducing us to the melanotropic peptides.

References

- Beschiaschvili G, Seelig J (1990) Peptide binding to lipid membranes: spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. *Biochemistry* 2: 52–58
- Biaggi MH, Schreier S, Castrucci AML, Lamy-Freund MT (1991) Interaction of melanotropic peptides with lipid membranes. *Am NY Acad Sci* 680: 459–461
- Brown MF, Seelig J (1977) Ion-induced changes in head group conformation of lecithin bilayers. *Nature (London)* 269: 721–723
- Brown MF, Seelig J, Häberlen U (1979) Structural dynamics in phospholipid bilayers from deuterium spin-lattice relaxation time measurements. *J Chem Phys* 70: 5045–5053
- Castrucci AML, Sawyer TK, Al-Obeidi F, Hruby VJ, Hadley ME (1990) Melanotropic peptide antagonists: Recent discoveries and biomedical implications. *Drugs of the Future* 15: 41–55
- Cvec G, Watts A, Marsh D (1983) Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered-fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers. *FEBS Lett* 120: 267–270
- Davis JH (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by $^2\text{H-NMR}$. *Biochim Biophys Acta* 737: 117–171
- Ellena JF, Archer SJ, Dominey RN, Hill BD, Cafiso DS (1988) Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 940: 63–70
- Gaffney BJ (1976) Practical considerations for the calculation of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. In: Berliner LJ (ed) *Spin Labelling. Theory and Applications*, vol I. Academic Press, New York, pp 567–571
- Godici PE, Landsberger FR (1974) The dynamic structure of lipid membranes. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study using spin-labels. *Biochemistry* 13: 362–368
- Griffith OH, Jost PC (1976) Lipid spin labels in biological membranes. In: Berliner LJ (ed) *Spin Labelling. Theory and Applications*, vol I. Academic Press, New York, pp 453–523
- Heimburg T, Biltonen RL (1994) Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33: 9477–9488
- Ito AS, Castrucci AML, Hruby J, Hadley ME, Krajcik T, Szabo A (1993) Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry* 32: 12264–12272
- Lange A, Marsh D, Wassmer K-H, Meier P, Kothe G (1985) Electron spin resonance study of phospholipid membranes employing a comprehensive line-shape model. *Biochemistry* 24: 4383–4392
- Macêdo ZS, Furquim T, Ito AS (1996) Estimation of average depth of penetration of melanotropins in DMPG vesicles. *Biophys Chem* (in press)
- Marassi FM, Macdonald PM (1991) Response of the headgroup of phosphatidylglycerol to membrane surface charge as studied by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 30: 10558–10566
- Marsh D (1980) Molecular motion in phospholipid bilayers in gel phase: Long axis rotation. *Biochemistry* 19: 1632–1637
- Marsh D (1981) Electron spin resonance: spin labels. In: Grell E (ed) *Membrane Spectroscopy*. Springer, Berlin, pp 51–142
- Pascher I, Lundmark M, Nyholm P-G, Sundell S (1992) Crystal structures of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1113: 339–373
- Pinheiro TJT, Duralski A, Watts A (1994) Phospholipid headgroup-headgroup electrostatic interactions in mixed bilayers of cardiolipin with phosphatidylcholines studies by ^2H NMR. *Biochemistry* 33: 4896–4902
- Presti FT, Chan SI (1982) Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. I. Cholestan spin-label studies of phase behavior of cholesterol-phospholipid liposomes. *Biochemistry* 21: 3821–3830

- Ptak M, Egret-Charlier M, Sanson A, Boloussa O (1980) A NMR study of the ionization of fatty acids, fatty amines and N-acylamino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. *Biochim Biophys Acta* 600: 387–397
- Roux M, Neumann J-M, Bloom M, Devaux PF (1988) ^2H and ^{31}P NMR study of pentalysine interaction with headgroup deuterated phosphatidylcholine and phosphatidylserine. *Eur Biophys J* 16: 267–273
- Sankaram MB, Brophy PJ, Marsh D (1989) Spin-label ESR studies on the interaction of bovine spinal cord myelin basic protein with dimyristoylphosphatidylglycerol dispersions. *Biochemistry* 28: 9685–9691
- Sargent S, Schwyzer R (1986) Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5774–5778
- Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett KB, Hadley ME (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte-stimulating hormone: A highly potent α -melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci, USA* 77: 5754–5758
- Scherer PG, Seelig J (1989) Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. *Biochemistry* 28: 7720–7728
- Schindler H, Seelig J (1973) ESR spectra of spin labels in lipid bilayers. *J Chem Phys* 59: 1841–1850
- Schindler H, Seelig J (1974) ESR spectra of spin labels in lipid bilayers. II. Rotation of steroid spin probes. *J Chem Phys* 61: 2946–2949
- Schwyzer R (1986) Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry* 25: 6335–6341
- Seelig J (1977) Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Q Rev Biophys* 10: 353–418
- Seelig J, Limacher H, Bader P (1972) Molecular architecture of liquid crystalline bilayers. *J Am Chem Soc* 94: 6364–6371
- Seelig J, Macdonald PM, Scherer PG (1987) Phospholipid head groups as sensors of electric charges in membranes. *Biochemistry* 26: 7535–7541
- Sixl F, Watts A (1985) Deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance studies on the binding of polymyxin B to lipid bilayers-water interfaces. *Biochemistry* 24: 7906–7910
- Sixl F, Brophy PJ, Watts A (1984) Selective protein-lipid interactions at membrane surfaces: a deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance study of the association of myelin basic protein with the bilayer head group of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylglycerol. *Biochemistry* 23: 2032–2039
- Subczynski WK, Markowska E, Gruszecki WI, Sielewiesiuk J (1992) Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim Biophys Acta* 1105: 97–108
- Watts A (1993) Magnetic resonance studies of phospholipid-protein interactions in bilayers. In: Cevc, G (eds) *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker, New York, pp 687–741
- Watts A, Harlos K, Maschke W, Marsh D (1978) Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochim Biophys Acta* 510: 63–74
- Yin J-J, Feix JB, Hyde JS (1988) Mapping of collision frequencies for stearic acid spin labels by saturation-recovery electron paramagnetic resonance. *Biophys J* 53: 521–531



Melanotropic peptides–lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog

Marcia H. Biaggi, Karin A. Riske, M. Teresa Lamy-Freund *

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil

Received 16 September 1996; revised 27 February 1997; accepted 27 February 1997

Abstract

The interaction of the native peptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) and the biologically more active analog [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH(MSH-I) with lipid vesicles was studied by spin label electron spin resonance (ESR) spectroscopy and circular dichroism (CD). Using spin labels located at the membrane interface and at different depths along the acyl chain, it was shown that the binding of both peptides to the membrane induces tighter lipid packing at all the monitored positions. However, the effect of the analog on the spin label ESR parameters was much more evident, and suggested that it penetrates farthest into the lipid matrix than the native molecule. Lipid partition coefficients were calculated based on the effect the peptides cause on the ESR spectra of spin labels incorporated in the membrane. For the biologically more potent peptide, the partition coefficient was found to be about 4-times greater than that of the native hormone. For the same concentration of peptide bound to the membrane, MSH-I was found to cause a slightly greater effect on the membrane structure than α -MSH, in accord with its possible deeper penetration into the bilayer. CD spectra in aqueous solution and in the α -helix inducing solvent 2,2,2-trifluoroethanol showed that the two peptides have somewhat different structures in solution, though similar conformational changes occur in both peptides as a result of their interaction with negatively charged vesicles or micelles. The higher peptide–lipid association constant and the deeper penetration of the analog into lipid bilayers could be related to its greater activity and/or prolonged action. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Melanotropin; Peptide–lipid interaction; Spin label; Circular dichroism

Abbreviations: ESR, electron spin resonance; CD, circular dichroism; NMR, nuclear magnetic resonance; SDS, sodium dodecyl sulfate; α -MSH, α -melanocyte stimulating hormone; MSH-I, [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH, 4-norleucine, 7-D-phenylalanine- α -melanocyte stimulating hormone; DMPG, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol; DMPC, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; 5-, 7-, 9- and 12-SASL, 5-, 7-, 9-, and 12-doxylstearic acid spin label; SSL, stearamide spin label; T_c , lipid main transition temperature; A_{\max} , outer hyperfine splitting; S_{eff} , effective order parameter; τ_{\parallel} , rotational correlation time about the molecular symmetry axis; τ_{\perp} , rotational correlation time perpendicular to the molecular symmetry axis; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol

* Corresponding author. Tel.: +55 11 8186829; Fax: +55 11 8134334; e-mail: mtfreund@if.usp.br

1. Introduction

In most vertebrates the tridecapeptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH; Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂) is the physiologically relevant hormone regulating skin pigmentation, causing darkening. In culture, both in normal and abnormal (melanoma) cells, α -MSH and its derivatives have been reported to stimulate adenylate cyclase, and to increase the activity of the enzyme tyrosinase, which controls the melanin synthesis [1-4]. α -MSH is also involved in many other biological functions, such as fetal growth and behavior [5].

Several modifications made within the primary structure of α -MSH have yielded peptides with superpotent activity [1,6]. The present work focuses on the native hormone α -MSH and the analog [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH (hereafter referred to as MSH-I), wherein norleucine was substituted for methionine, and D-phenylalanine was substituted for the L-enantiomer. The latter was reported to exhibit an increased potency and prolonged activity in the frog skin bioassay when compared to the native molecule [1]. It was suggested that the increased potency of MSH-I could be attributed to a reverse turn within the α -MSH₄₋₁₀ sequence which would be conformationally-stabilized by the D-Phe⁷ substitution [7]. Though the prolonged activity of MSH-I *in vivo* could be ascribed to its resistance to degradative inactivation by serum enzymes, its ultra-long action *in vitro* remains to be understood. It was suggested [1] that MSH-I could be sequestered into some compartment of the membrane, possibly irreversibly bound to a receptor.

Although different activities of α -MSH analogs may reflect different strengths of binding to protein membrane receptors, the peptide-lipid interaction could also be relevant to both the potency and the duration of the peptide action. According to the hypothesis of the lipid phase as a catalyst for the peptide biological action [8,9], the peptide-bilayer interaction could favor a particular peptide conformation appropriate for its interaction with the receptor site, and/or increase the local peptide concentration close to the receptor. Alternatively, the peptide could slightly change the membrane fluidity, triggering structural modifications in membrane proteins.

which would enhance the peptide-receptor interaction.

In a previous work we showed that both the native hormone α -MSH and the analog MSH-I interact with anionic lipid bilayers, turning the membrane more rigid [10]. We used electron spin resonance (ESR) spectroscopy of spin labels incorporated in the lipid phase, and NMR of deuterated lipids. However, it remained to be shown whether the different effects the two peptides cause on the bilayer structure were due to their different lipid partition coefficients, or to a relative different penetration into the membrane hydrophobic core.

The present work extends those studies, using stearic acids labeled at four different positions along the acyl chain and at the headgroup. This approach provides information on the motional and structural alterations caused by the peptides at different depths of the lipid bilayer, making possible a comparison between the effects due to the native hormone and its analog at the different positions. To further understand the peptide–bilayer interaction, lipid partition coefficients for the two peptides were calculated, based on the effect they cause on the membrane structure. Considering those partition coefficients, it was possible to compare the alterations in the bilayer caused by the two peptides when present at the same concentration in the membrane. Structural modifications on the conformation of the peptides were monitored by their circular dichroism (CD) spectra.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The peptides α -MSH and MSH-I, and SDS (sodium dodecyl sulfate) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Phospholipids, DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol) and DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). The spin labels 5-, 7-, 9- and 12-SASL (5-, 7-, 9- and 12-doxylstearic acid spin label) were either purchased from Sigma or kindly donated by A. Watts, from the University of Oxford, UK. SSL (stearamide spin label) was a gift from S. Schreier Laboratory, at the University of São

Paulo. The buffer contained 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 mM ethanesulfonic acid, 5 mM potassium bromate, and 5 mM potassium iodide. The reagents were added sequentially.

2.2. ESR sample

Stock solution in chloroform and were multilamellar containing 1 mol % formed from a mixture of labels, dried under vacuum for a portion of the organic solvent, the addition of the desired concentration followed by vortexing (LUV), prepared LUVs were also used. LUVs obtained with

2.3. CD sampling

Large unlabelled
scribed above,
optically clear,
Peptide solution
concentration

2.4. ESR spectra

ESR measurement
ER 200D-SRC
PC like computer
modulation amplitude
power of 10 mW
controlled to 100/700
100/700 variation
ture was always
tored with a Fluka
the stearic acid
in solution, the
result of the spectrum
from the computer
EPRANALA (Oxford
University of Oxford)

Paulo. The buffer used for the ESR experiments was 10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) at pH 7.4. For the CD experiments 5 mM phosphate buffer, pH 7.4, was used. All reagents were used without further purification.

2.2. ESR sample preparation

Stock solutions of spin labels were prepared in chloroform and stored at -80°C . The membranes were multilamellar dispersions of lipids (10 mM) containing 1 mol% of spin label. A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids and spin labels, dried under a stream of N_2 and left under vacuum for a minimum of 5 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the buffer solution, without or with the desired concentration of melanotropic peptides, followed by vortexing. Large unilamellar vesicles (LUV), prepared by the method of extrusion [11], were also used, yielding results similar to those obtained with liposomes.

2.3. CD sample preparation

Large unilamellar vesicles were prepared as described above, and sonicated until the sample was optically clear, producing no obvious light scattering. Peptide solution was added to the final desired concentration.

2.4. ESR spectroscopy

ESR measurements were performed in a Bruker ER 200D-SRC spectrometer interfaced with an IBM-PC like computer for spectrum digitalization. A field modulation amplitude of 0.08 mT and microwave power of 10 mW were used. The temperature was controlled to about 0.5°C with a Bruker B-ST 100/700 variable temperature device. The temperature was always varied from 40°C to 0°C and monitored with a Fluke 51 K/J thermometer. As most of the stearic acid spin labels presented a small partition in solution, the ESR spectra shown here are the result of the subtraction of free aqueous label signal from the composite spectrum, using the software EPRANALA (J. Rowntree, P. Fajer and B. Bennet, University of Oxford, UK). The LOWFIT program

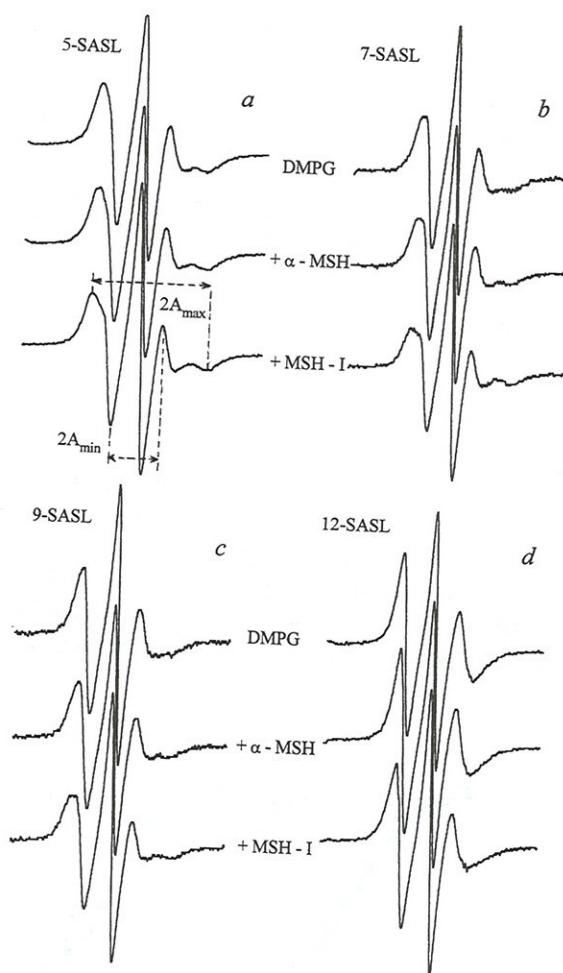


Fig. 1. ESR spectra of stearic acid spin label positional isomers, n-SASL, in DMPG dispersion (10 mM Hepes, pH 7.4) in the absence and presence of 10 mol% of α -MSH or MSH-I. Total spectral width is 100 G. Temperature = 40°C .

(B. Bales) was used for the SSL spectra simulations. For the measurement of the spectrum parameters the ORIGIN software (MicroCal Software, MA, USA) was used.

Effective order parameters, S_{eff} , were calculated from the expression

$$S_{\text{eff}} = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a'_0}{a_0}$$

where $2A_{\parallel}$ (or $2A_{\max}$) is the maximum hyperfine splitting and

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4 \left[1 - \frac{A_{\parallel} - A_{\min}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \right]$$

where $2A_{\min}$ is the measured inner hyperfine splitting [12,13]. (For $2A_{\max}$ and $2A_{\min}$ see Fig. 1.) The polarity was normalized from a'_o/a_o where

$$a'_o = (1/3)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

and

$$a_o = (1/3)(A_{\parallel} + 2A_{\perp})$$

A_{xx} , A_{yy} and A_{zz} being the principal values of the hyperfine tensor for doxylpropane [12]. All the data shown here are the mean of at least three experiments. Standard deviations were calculated for all the experimental data, considering three different experiments with ten independent measurements for each ESR spectrum. In Fig. 2 and Fig. 5, they were

found to be around 2%. In the other figures, whenever the standard deviation is greater than the symbol size it is shown in the graphic.

2.5. Circular dichroism

Spectra were recorded at 35°C on Jasco J-720 and CD6 Jobin Yvon spectropolarimeters, with quartz cells of 1 mm path length. Spectra were baseline corrected by using the appropriated reference, buffer or vesicle suspension. Typically five spectra were recorded and averaged over the range of 185 to 260 nm. The data are expressed as mean residue ellipticity, $[\theta]$, in deg/cm² dmol⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. ESR of spin labels at different depths of the carbon chain

Fig. 1 shows the ESR spectra of positional isomers of spin labeled stearic acids incorporated in DMPG liposomes, in the absence and in the presence of the two peptides. The fluidity of the membrane microenvironment can be quantified by measuring the outer maximum hyperfine splitting A_{\max} which contains contributions from both the amplitude and the rate of motion of the spin label chains ([14], and references therein). A_{\max} decreases as the region monitored by the spin label becomes less organized and/or more mobile. Comparing the A_{\max} values obtained with the different labels incorporated in pure lipid bilayers (filled symbols in Fig. 2a–d) it is clearly seen that, above the lipid main transition temperature, T_c , spin labels placed deeper in the acyl chain monitor a more mobile environment. Therefore, despite the known vertical fluctuation of stearic acid labels [15–17], their ESR spectra monitor, on average, the characteristic flexibility gradient toward the terminal methyl end of the chain. This result is similar to others reported in the literature [18–20], and can also be confirmed by the different a_o values measured for the different labels. The labels closer to the membrane surface yield higher a_o values (results not shown), indicating a more polar environment [14].

Above T_c , the addition of the analog MSH-I to

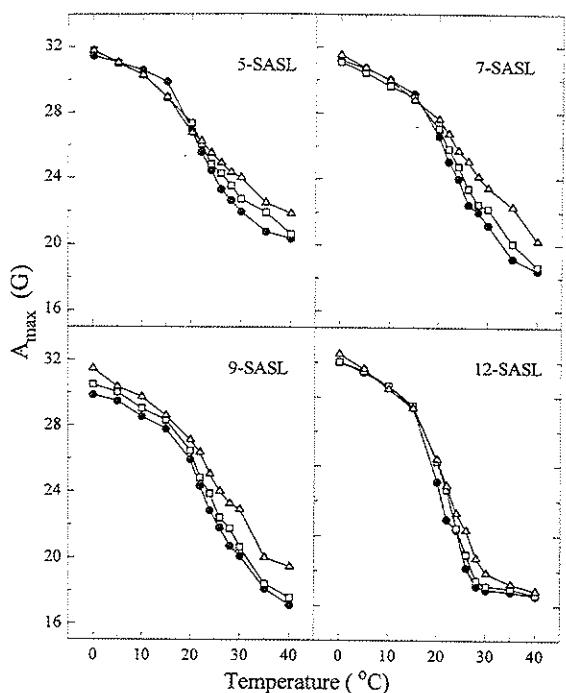


Fig. 2. Temperature dependence of the maximum hyperfine splitting constant, A_{\max} , of n-SASL stearic acid positional isomers in DMPG dispersion in the absence of peptide (●), and in the presence of 10 mol% of α -MSH (□) or MSH-I (Δ).

DMPG liposomes of the bilayer all labels placed effect in the hormone α -M the membrane

Below T_c , cause only mi variations obs the presence o tion and will

Fig. 3 shows effective order shown S_{eff} val lar profiles we T_c . S_{eff} is a p that it contain rate of motion S_{eff} is the am chain [21]. Di the distinct po were taken in also indicates on the bilayer molecule. It is hormone the la chain are mor lipid, for the affected positio

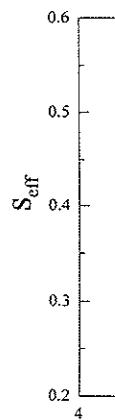


Fig. 3. Effective nitroxide position S_eff in the absence of 10 mol% of α -MSH

DMPG liposomes significantly enhances the packing of the bilayer (Fig. 2), increasing the A_{\max} values of all labels placed along the acyl chain, with a greater effect in the C-7 and C-9 positions. The native hormone α -MSH also causes an ordering effect in the membrane, though less evident.

Below T_c , apart for the 9-SASL, both peptides cause only minor changes on the A_{\max} values. The variations observed on the 9-SASL A_{\max} values in the presence of the two peptides are under investigation and will not be discussed here.

Fig. 3 shows the depth profile of the calculated effective order parameters (S_{eff}) (see Section 2). The shown S_{eff} values were calculated at 30°C, but similar profiles were obtained for all temperatures above T_c . S_{eff} is a parameter similar to A_{\max} in the sense that it contains contributions from both order and rate of motion, although the principal contribution to S_{eff} is the amplitude of segmental motion of the acyl chain [21]. Different from A_{\max} , in the S_{eff} values the distinct polarities of the spin labels microregions were taken into account [12]. The variation of S_{eff} also indicates that the analog causes a stronger effect on the bilayer packing as compared to the native molecule. It is interesting to note that whereas for the hormone the labels placed at C-5 and C-7 on the acyl chain are more sensitive to the interaction peptide-lipid, for the analog the C-7 and C-9 are the most affected positions. Those results probably indicate

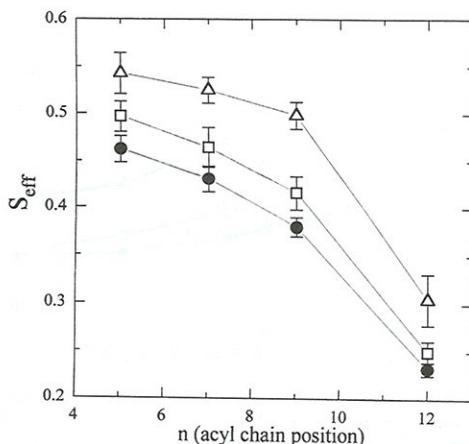


Fig. 3. Effective order parameter, S_{eff} , as a function of the nitroxide position, n -SASL stearic acid isomers in DMPG dispersion in the absence of peptide (\bullet) and in the presence of 10 mol% of α -MSH (\square) or MSH-I (\triangle). Temperature = 30°C.

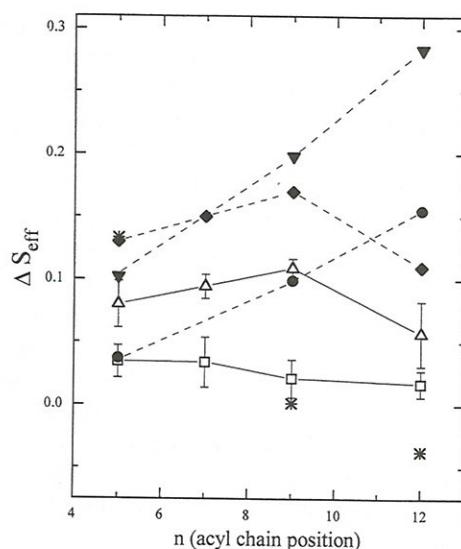


Fig. 4. Depth profiles of the variation of the effective order parameter, S_{eff} , relative to the pure lipid bilayer, of stearic acid positional isomers in DMPG dispersions, in the presence of 10 mol% of α -MSH (\square) and MSH-I (\triangle), and 0.3 M NaCl (\star). Temperature = 30°C. The profiles are compared to those of zeaxanthin (\bullet) and cholesterol (∇) calculated from [23], and that of Apocytochrome c (\blacklozenge), calculated from [19].

that MSH-I penetrates deeper into the bilayer than α -MSH.

The deeper penetration of the analog MSH-I into the membrane core has also been suggested by the parallax method, using steady-state fluorescence spectroscopy [22], despite the controversy about the method. The authors used as quenchers the same stearic acid labels used here, and phospholipid derivatives labeled at different positions of the *sn*-2 chain. They concluded that the Trp residue of the analog goes deeper into the bilayer as compared to the native molecule.

However, there is not an obvious correlation between the depth of penetration of a molecule into the bilayer core and the variation of the ESR spectrum of a nitroxide probing a certain region of the bilayer. Depending on the order/mobility of the label, its ESR spectrum will be more or less sensitive to changes on its micro-environment. Therefore, for a better analysis of the data, the ΔS_{eff} (difference relative to the pure lipid bilayer) depth profiles of the two melanotropic peptides in DMPG membranes (Fig. 4) were compared to those of the carotenoid zeaxanthin and cholesterol in DMPC (calculated from

[23]), and that of the extrinsic membrane protein apocytochrome *c* in bovine phosphatidylserine dispersion (calculated from [19]). The profile shown by the analog MSH-I is different from that of zeaxanthin and cholesterol, which are known to intercalate into the bilayer, and mostly disturb the C-12 chain region. However, MSH-I profile parallels that of apocytochrome *c* [19], which is supposed to partially penetrate into the apolar region of the membrane [24], mainly affecting the C-7 and C-9 positions. Although order parameters have not been calculated, the equivalent ΔA_{\max} profile found for the extrinsic basic protein from the myelin sheath (MBP) (calculated from [25]), which is also supposed to penetrate into the bilayer, follows the same pattern as that found for apocytochrome *c* [19] and MSH-I (data not shown).

Considering that the two peptides are positively charged molecules (equally charged), Fig. 4 shows the changes of the effective order parameter obtained for DMPG in the presence and in the absence of an excess of charge, 0.3 M of NaCl. It can be clearly seen that a possible bilayer packing caused by the increase of the PG⁺ shielding, due to the high concentration of ions at the membrane surface, leads to a ΔS_{eff} depth profile different from that obtained in the presence of the peptides.

All of the ESR spectra of the spin label positional isomers seem to consist of a single component only. Hence, different from the proteins mentioned above, with MSH-I there is no evidence of a second, more motionally restricted component, which would be taken as direct evidence of peptide penetration into the bilayer. However, it has been recently reported that the comparatively small lung surfactant protein SP-C, which is supposed to be a transmembrane α -helix peptide, reduces the mobility of the phospholipid acyl chains, without yielding a more immobilized ESR signal [20]. There are other similar reports in the literature [26].

3.2. ESR of spin labels at the bilayer interface

The stearamide spin label, SSL, was used to monitor the membrane headgroup region. Different from the stearic acid probes, where the anisotropic rotation is preferentially about the nitroxide *z* axis, the SSL rotation is axially symmetric about the *x*

axis, which is reflected in the higher amplitude of the $M_1 = +1$ line (corresponding to the nitrogen quantum number $M_1 = +1$) as compared to the other lines (top spectrum in Fig. 5a). The narrow lines

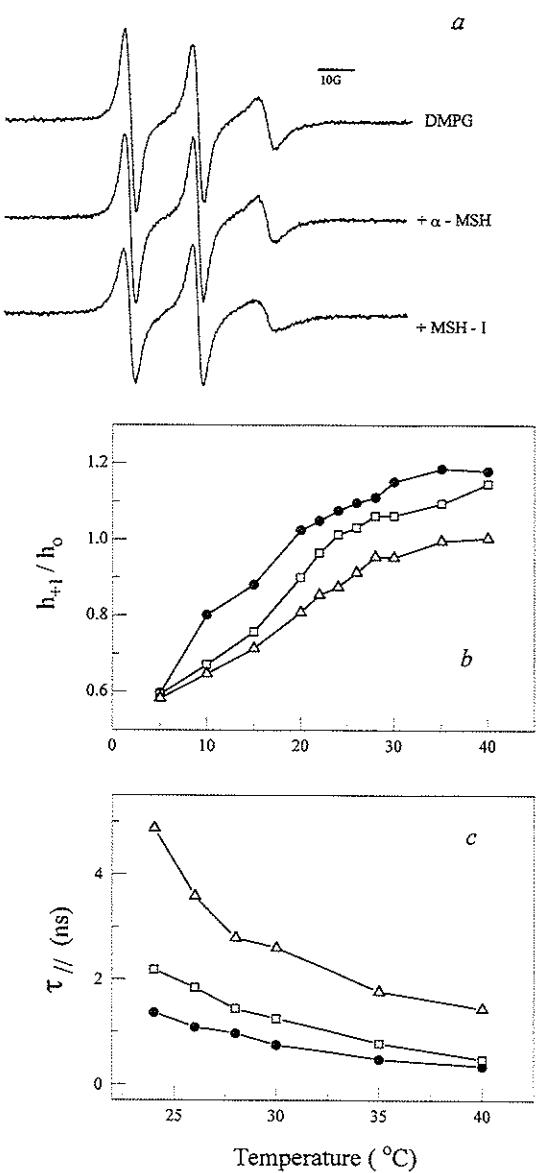


Fig. 5. Dependence of the ESR spectra of SSL in DMPG liposomes on the presence of 10 mol% of α -MSH (\square) or MSH-I (\triangle). (\bullet) corresponds to pure DMPG dispersions. (a) ESR spectra at a temperature of 30°C. Temperature variation of (b) the ratio between the amplitude of the lines corresponding to $M_1 = +1$ and $M_1 = 0$, and (c) the spin label rotation correlation time about the molecular symmetry axis.

obtained with indicate the 1 nitroxide moiety effect due evinced by the mainly with M

The alter bilayer interfac the empirical amplitude of and $M_1 = 0$ o Both peptides compact, as the ratio is in the diminishing th analog is much brane structure

Rotation co ing to [27]. T corrections fo unresolved hy Fig. 5c shows values (rotation symmetry axis decreasing the that obtained lipids [10]. It v the spin lattic uterons, theref segmental mo with the presen the analog MS peptide.

The values pendicular to t very sensitive

Considering ing potential i lated correlati tive paramet more compreh necessary for spectra.

3.3. Peptides—

To further u to DMPG ves

obtained with SSL incorporated in DMPG vesicles indicate the low order and high mobility of the nitroxide moiety in the head group region. The packing effect due to the interaction peptide–bilayer is evinced by the broadening of the SSL ESR lines, mainly with MSH-I (Fig. 5a).

The alterations caused by the peptides on the bilayer interface can be evaluated by the decrease of the empirical parameter h_{+1}/h_0 (ratio between the amplitude of the lines corresponding to $M_1 = +1$ and $M_1 = 0$) calculated from the SSL ESR spectra. Both peptides render the membrane surface more compact, as their effect in decreasing the h_{+1}/h_0 ratio is in the same direction as that caused by diminishing the temperature (Fig. 5b). Again, the analog is much more effective in changing the membrane structure than the native hormone.

Rotation correlation times were calculated according to [27]. The spectra were simulated using the corrections for inhomogeneous broadening due to unresolved hyperfine structure, as suggested by [28]. Fig. 5c shows that the effect of the peptides on the τ_{\parallel} values (rotation correlation time about the molecular symmetry axis) is also similar to that caused by decreasing the temperature. This result is similar to that obtained with NMR of headgroup deuterated lipids [10]. It was shown that both peptides decrease the spin lattice relaxation time of the DMPG α -deuterons, therefore increasing the carbon–deuterium segmental motion correlation time. In accordance with the present work it was found that the effect of the analog MSH-I was greater than that of the native peptide.

The values of τ_{\perp} (rotation correlation time perpendicular to the molecular symmetry axis) were not very sensitive to the presence of the peptides.

Considering that there is probably a small orienting potential in the membrane interface, the calculated correlation times should be taken as comparative parameters and not as true numerical values. A more comprehensive motional model [29] would be necessary for an accurate analysis of the SSL EPR spectra.

3.3. Peptides–membrane partition coefficient

To further understand the binding of the peptides to DMPG vesicles, membrane partition coefficients,

K_p , were calculated based on the effect the peptides cause on the structure of the bilayers [30]. It is assumed that the magnitude of the effect observed is only determined by the number of moles of peptides bound to the membrane, n_M . The above hypothesis was supported by the calculation of the membrane partition coefficient of the local anesthetic tetracaine using two different techniques, fluorescence and ESR spectroscopy [30].

K_p is defined as

$$K_p = \frac{n_M/V_M}{n_{H_2O}/V_{H_2O}}$$

where n_{H_2O} is the number of moles of peptides in water, and V_M and V_{H_2O} are the volumes of membrane and water, respectively.

Fig. 6a and b show the variation of the A_{max} parameter of 5-SASL incorporated in DMPG vesicles, for different concentrations of peptides and lipids. The dashed lines correspond to constant effects obtained for different lipid and peptide total concentrations (n_T is the total number of moles of peptide), leading to the same concentration of peptide actually bound to the membrane. It was shown that a plot of the n_T and V_M values generated by the dashed lines (Fig. 6a and b) yields the peptide concentration in the membrane, C_M , and the K_p value, as follows [30]:

$$n_T = \frac{C_M \cdot V_{H_2O}}{K_p} + C_M \cdot V_M$$

Accordingly, partition coefficients of 360 ± 70 and 1330 ± 160 were calculated for α -MSH and MSH-I, respectively. Similar values (290 ± 54 and 1360 ± 160) were obtained using the h_{+1}/h_0 parameter of SSL spin labels incorporated in DMPG vesicles (results not shown). It is important to point out that K_d values were previously calculated by fluorescence spectroscopy [22], but due to some problems with the methodology used there those values cannot be directly compared to the values obtained here (Lamy-Freund and Ito, in preparation).

To check whether the greater effect of MSH-I on DMPG bilayer structure was only due to its higher lipid association constant, the alterations caused by the same amount of the two peptides on the membrane structure were compared. Assuming 360 and

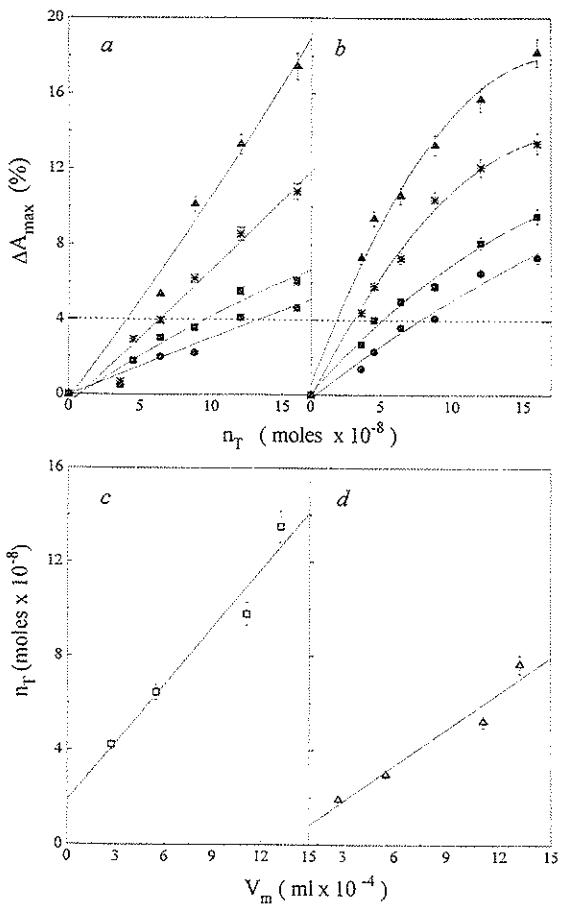


Fig. 6. Effect of (a) α -MSH and (b) MSH-I on the maximum hyperfine splitting, A_{\max} , parameter of 5-SASL in DMPG dispersions lipid concentration (mg/ml): (\blacktriangle) 3.4, (\ast) 6.9, (\blacksquare) 13.8, (\bullet) 16.0. The dashed lines parallel to the abscissa generate sets of n_T and V_M values for which the effect of the peptide is the same. c and d show the plots of n_T as a function of V_M for the sets generated by the dashed lines in a and b, respectively.

1330 as partition coefficients for α -MSH and MSH-I, respectively, the variations of A_{\max} in the 5-SASL spectra were calculated as a function of the actual peptide concentration interacting with the bilayer. Fig. 7 shows that for the same percentage of peptide bound to the membrane the packing effect is somewhat greater for the analog MSH-I.

In principle, one could use the partition coefficients calculated above and repeat the experiments shown in Figs. 2–5, using α -MSH and MSH-I concentrations that would yield the same amount of peptide bound to the membrane. For instance, con-

sidering $[DMPG] = 10 \text{ mM}$ ($8 \times 10^{-7} \text{ mol}$ in $80 \mu\text{l}$), and keeping $[MSH-I] = 1 \text{ mM}$ ($n_T = 8 \times 10^{-8} \text{ mol}$), as used before, from the definition of the partition coefficient, and using $K_p = 1330$ for MSH-I, one can calculate the amount of bound MSH-I, $n_M = 7.2 \times 10^{-8} \text{ mol}$. Hence, considering $K_p = 360$ for α -MSH, it would be necessary to have $n_T = 10.1 \times 10^{-8} \text{ mol}$ of the native peptide to get the same amount of the two peptides bound to the bilayer. However, Fig. 6a shows that the variation of A_{\max} , for 10 mM DMPG (\ast), from $n_T = 8 \times 10^{-8}$ to $10.1 \times 10^{-8} \text{ mol}$ is rather small. Hence, the corrections to be done in Figs. 2–5 do not seem to be very relevant. It is important to note that in the calculations above (and in the data in Figs. 2–5) the molar percentage of bound peptide (relative to DMPG) is rather high, around 9%. For lower peptide/lipid ratios the difference between the effect of the two peptides is not so well detected by that method (Fig. 7).

Considering the calculated partition coefficients, and the different effects the same amount of the two peptides cause on the bilayer structure, we can infer that the analog MSH-I not only preferentially binds to the bilayer, as compared to the native molecule, but it also seems to change the bilayer structure more pronouncedly. This is in accord with the obtained depth profile (Fig. 3), which suggests that MSH-I

disturbs the membrane more than the native peptide.

3.4. Circular dichroism spectra

Although the circular dichroism spectra in aqueous solution (Fig. 8a, b), with a large contribution of random coil, are very similar, the peptide CD spectra at low concentrations (10 nM) show some differences. The concentration of α -MSH is higher than that of MSH-I, and the peptide CD spectra at low concentrations (10 nM) show some differences. The concentration of α -MSH is higher than that of MSH-I, and the peptide CD spectra at low concentrations (10 nM) show some differences.

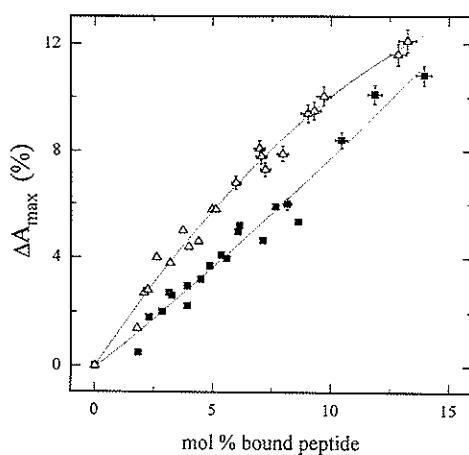


Fig. 7. Dependence of the outer hyperfine splitting of 5-SASL in DMPG dispersions (10 mM Hepes, pH 7.4), on the actual concentration of α -MSH (\blacksquare) or MSH-I (\triangle) bound to the liposomes (moles of bound peptide/moles of DMPG) $\times 100$.

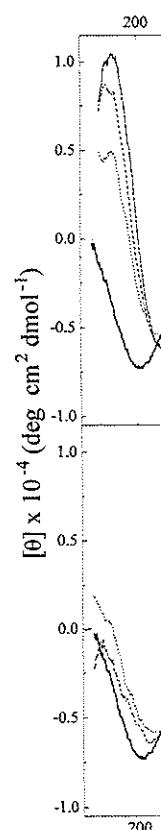


Fig. 8. CD spectra of 5-SASL in DMPG dispersions (10 mM Hepes, pH 7.4). The spectra were recorded at 10 nM peptide concentration and 100% (\cdots) and 100% (\cdots) SDS (\cdots) and $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ Ter-

disturbs the membrane in a position deeper into the bilayer than that felt by the presence of α -MSH.

3.4. Circular dichroism

Although the two peptides display similar CD spectra in aqueous medium (full lines in Fig. 8a and b), with a large negative band about 200 nm, indicative of random coil, their behavior in an α -helix inducing solvent, TFE, is rather different. The peptide CD spectra in the presence of different concentrations of TFE (Fig. 8a and b) clearly show that α -MSH much more easily acquires an α -helix structure than the analog MSH-I. The unordered structure

found for the two peptides in aqueous solution is in accord with the NMR studies with 4–11 α -MSH fragment analogs [7], which suggested that their backbone may possess considerable conformational flexibility. Otherwise, it was found that in the D-Phe⁷ analogs, such as MSH-I, the interaction between His⁶, D-Phe⁷ and Arg⁸ amino acid side chain groups might stabilize some type of β -like structure [7]. Hence, although no β structure is obviously detected in the MSH-I CD spectrum, its difficulty in acquiring an α -helix conformation, as compared to the native molecule, is certainly an indication of some other preferential structure in the water medium.

Considering the difficulty in analyzing the CD spectra of small peptides, one can speculate that the large positive band around 185 nm, observed for MSH-I in aqueous solution (full line in Fig. 8b or d), could be an indication of some sort of secondary structure. Recently, structure modeling calculations, considering rotameric conformations of Trp side chain, found that the most stable conformations for both α -MSH [31] and MSH-I (Jacchieri and Ito, personal communication) presented β -like structures. However, the energy barrier for interconversion among different conformational families was much lower for α -MSH than for its analog. Hence, the similar energies for a variety of different structures could explain the α -MSH's more flexible structure, favoring an α -helix formation in an appropriate solvent (Fig. 8a and b).

The tendency of both peptides to form a β -like structure is evinced in the presence of either anionic SDS micelles or DMPG vesicles. Although rather small, Fig. 8c and d show a clear indication of a negative band around 220 nm upon the peptides interaction with micelles or vesicles. This is likely to be due to a small amount of β -structure present in the peptide conformation. Previously, it was reported [32] that α -MSH at low pH (2–3) adopted a β -form in the presence of SDS, but only below the surfactant critical micellar concentration.

It is interesting to note that the two melanotropic peptides display similar CD spectra either in the presence of SDS micelles or DMPG vesicles. Moreover, although the spin label ESR results presented here, and fluorescence data [22] show that the analog MSH-I goes deeper into the bilayer than the native peptide, the conformational alterations in the struc-

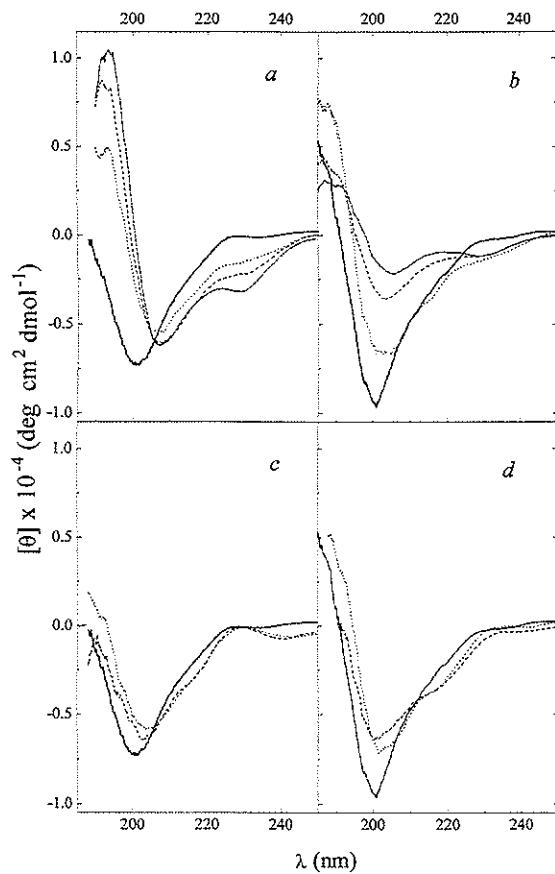


Fig. 8. CD spectra of α -MSH (a and c) and MSH-I (b and d), in 5 mM phosphate buffer, pH 7.4 (—). In a and b, the spectra were recorded in the presence of 50% (· · ·), 75% (---) and 100% (— · —) in volume of TFE, and in c and d in 40 mM SDS (· · ·) and 5 mM DMPG (---). Peptide concentration was 1.2×10^{-4} M. Temperature = 35°C.

ture of the two peptides upon interaction with vesicles, as monitored by CD, are rather similar. One must keep in mind that the ESR data were obtained with multilamellar liposomes, whereas sonicated unilamellar vesicles were used in the CD experiment.

4. Concluding remarks

It is shown here that the interaction between the melanotropic peptides and negatively charged lipids results in motional restriction of the lipids, to a certain extent resembling the interaction of surface membrane proteins. No effect was observed with zwitterionic vesicles (DMPC). As discussed before [10], this might be attributed to the low concentration of the cationic peptides on the surface of zwitterionic bilayers.

Considering that both the native hormone α -MSH and the more active analog MSH-I have the same net positive charge, and that the present work focuses on the difference of their interaction with lipid bilayers, no electrostatic correction through the Gouy–Chapman potential was found necessary. It is shown here that the overall perturbation on the lipid structure on peptide binding is greater for the analog than for the native peptide. The initial interaction is primarily electrostatic, but apparently there is a subsequent penetration of the peptides, mainly the analog MSH-I, into the hydrophobic core of the bilayer.

CD results indicate that both peptides acquire a certain percentage of β -like structure upon interaction with anionic vesicles or micelles. However, CD spectroscopy does not allow the discrimination between peptide structural alterations caused by electrostatic interaction with the negative surface charge of DMPG vesicles (or SDS micelles), and the actual penetration of the peptide into the bilayer, or both effects.

The results presented here should be regarded only as an indication of what might happen in a biological system, as they were obtained with a very simple model system, consisting of single phospholipid vesicles. Our data suggest that the more potent peptide MSH-I is the one that presents the highest peptide–lipid association constant and the deepest penetration into the membrane, consequently being the one that most disturbs the bilayer structure.

Considering that the lipid packing has been reported to modulate the conformation and related activity of several membrane proteins (see, for instance, [33,34]), it could be speculated that the MSH-I interaction with lipid bilayers could play a role in the peptide enhanced biological activity, inducing an appropriate receptor conformation. On the other hand, the superpotent action of MSH-I could be partially explained by its higher partition coefficient in membranes, which would lead to an increased local concentration close to the receptor. Additionally, the MSH-I prolonged biological activity in cultured cells, after saline rinse [35], could be related to its greater affinity for the lipid phase, in line with the previous suggestion that the analog MSH-I could be somehow sequestered by the melanotropin receptor membrane [35].

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq and FINEP. CNPq fellowships for M.H.B., K.A.R. and M.T.L.F. (research) are acknowledged. We are grateful to Dr. A.M.L. Castrucci for discussions about the biological aspects of the melanotropic peptides and to Dr. O.R. Nascimento and Dr. S. Schreier for making the ESR and CD spectrometers available. We also thank Dr. A.S. Ito for useful suggestions and comments.

References

- [1] T.K. Sawyer, P.J. Sanfilippo, V.J. Hruby, M.H. Engel, C.B. Heward, K.B. Burnett, M.E. Hadley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5754.
- [2] D.G. Klemes, K.L. Kreutzfeld, M.E. Hadley, W.L. Cody, V.J. Hruby, Biochem. Biophys. Res. Commun. 137 (1986) 722.
- [3] U. Rodeck, M. Herlyn, Cancer Res. 10 (1991) 89.
- [4] J. Jiang, S.D. Sharma, S. Nakamura, J.-Y. Lai, J.L. Fink, V.J. Hruby, M.E. Hadley, Pigment Cell Res. 8 (1995) 314.
- [5] A.M.L. Castrucci, T.K. Sawyer, F. Al-Obeidi, V.J. Hruby, M.E. Hadley, Drugs Future 15 (1990) 41.
- [6] V.J. Hruby, S.D. Sharma, K. Toth, J.Y. Jaw, F. Al-Obeidi, T.K. Sawyer, M.E. Hadley, Ann. NY Acad. Sci. 680 (1993) 51.
- [7] V.J. Hruby, W.L. Cody, A.M.L. Castrucci, M.E. Hadley, Collection Czech. Chem. Commun. 53 (1988) 2549.
- [8] D. Sargent, R. (1986) 5774.
- [9] R. Schwyzer,
- [10] M.H. Biaggi, Eur. Biophys. J. 24 (1995) 111.
- [11] M.J. Hope, M. Biophys. Acta 1282 (1996) 111.
- [12] O.H. Griffith, Belling, Theory and Application, New York, 1980.
- [13] B.J. Gaffney, and Application, pp. 567–571.
- [14] D. Marsh, in: Springer, Berlin, 1992.
- [15] P.E. Godici, F. Cafiso, Biochemistry 33 (1994) 161.
- [16] J.F. Ellena, S. Cafiso, Biochemistry 33 (1994) 161.
- [17] J.-J. Yin, J.B. Hwang, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 131.
- [18] J. Harris, T.J. Hwang, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 131.
- [19] H. Görriksen, Chemistry 25 (1986) 3964.
- [20] J. Pérez-Gil, 3964.
- [21] H. Schindler,

- [8] D. Sargent, R. Schwyzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5774.
- [9] R. Schwyzer, *Biochemistry* 25 (1986) 6335.
- [10] M.H. Biaggi, T.J.T. Pinheiro, A. Watts, M.T. Lamy-Freund, *Eur. Biophys. J.* 24 (1996) 251.
- [11] M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta* 812 (1985) 55.
- [12] O.H. Griffith, P.C. Jost, in: L.J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*, Vol. I, Academic Press, New York, 1976, pp. 453–523.
- [13] B.J. Gaffney, in: L.J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*, Vol. I, Academic Press, New York, 1976, pp. 567–571.
- [14] D. Marsh, in: E. Grell, (Ed.), *Membrane Spectroscopy*, Springer, Berlin, 1981, pp. 51–142.
- [15] P.E. Godici, F.R. Landsberger, *Biochemistry* 13 (1974) 362.
- [16] J.F. Ellena, S.J. Archer, R.N. Dominey, B.D. Hill, D.S. Cafiso, *Biochim. Biophys. Acta* 940 (1988) 63.
- [17] J.-J. Yin, J.B. Feix, J.S. Hyde, *Biophys. J.* 53 (1988) 521.
- [18] J. Harris, T.J. Power, A.L. Bieber, A. Watts, *Eur. J. Biochem.* 131 (1983) 559.
- [19] H. Görrisen, D. Marsh, A. Rietveld, B. Kruijff, *Biochemistry* 25 (1986) 2904.
- [20] J. Pérez-Gil, C. Casals, D. Marsh, *Biochemistry* 34 (1995) 3964.
- [21] H. Schindler, J. Seelig, *J. Chem. Phys.* 59 (1973) 1841.
- [22] Z.S. Macêdo, T.A. Furquim, A.S. Ito, *Biophys. Chem.* 59 (1996) 193.
- [23] W.K. Subczynski, E. Markowska, W.I. Gruszecki, J. Sielewiesiuk, *Biochim. Biophys. Acta* 1105 (1992) 97.
- [24] A. Rietveld, G.A.E. Ponjee, P. Schiffrers, W. Jordi, P.J.F.M. van de Coolwijk, R.A. Demel, D. Marsh, B. de Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta* 818 (1985) 398.
- [25] M.B. Sankaram, P.J. Brophy, D. Marsh, *Biochemistry* 28 (1989) 9685.
- [26] M.T. Ge, J.H. Freed, *Biophys. J.* 65 (1993) 2106.
- [27] D. Marsh, in: L.J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*, Vol V, Academic Press, New York, 1989, pp. 255–300.
- [28] B.L. Bales, in: L.J. Berliner (Ed.), *Spin Labelling. Theory and Applications*, Vol VIII, Academic Press, New York, 1989, pp. 77–126.
- [29] A. Lange, D. Marsh, K.-H. Wassmer, G. Kothe, *Biochemistry* 24 (1985) 4383.
- [30] E. Lissi, M.L. Bianconi, A.T. Amaral, E. Paula, L.E.B. Blanch, S. Schreier, *Biochim. Biophys. Acta* 1021 (1990) 46.
- [31] A.G. Jacchieri, A. Ito, *Int. J. Quant. Chem.* 53 (1995) 335.
- [32] C.-S.C. Wu, J.T. Yang, *Mol. Cell. Biochem.* 40 (1981) 109.
- [33] N.J. Gibson, M.F. Brown, *Biochemistry* 32 (1993) 2438.
- [34] C.D. McCallum, R.M. Epand, *Biochemistry* 34 (1995) 1815.
- [35] M.E. Hadley, Z. Abdel-Malek, M.M. Maewan, K.L. Kreutzfeld, V.J. Hruby, *Endocr. Res.* 11 (1985) 157.

Permeability of pure lipid bilayers to melatonin

Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res.* 1995; 19:123-126. © Munksgaard, Copenhagen

Abstract: Melatonin, the chief hormone of the pineal gland, has been reported to interact with a variety of different cells. This ubiquitously acting hormone has been found to interact with protein receptors both at the cell membrane and in the nucleus. Moreover, melatonin was recently shown to be a very potent hydroxyl radical scavenger. The present work focuses on the interaction of melatonin with pure lipid bilayers. It is shown that melatonin can cross multilamellar lipid vesicles, which are used here as model systems for the lipid phase of biological membranes. Thus, the data prove that melatonin can easily pass through the cell membrane and bath every part of the cell, as previously suggested in the literature. Melatonin lipid association constant was calculated based on the change of the hormone fluorescence intensity due to its penetration into the hydrophobic lipid phase. Though melatonin was recently shown to be highly soluble in aqueous media, its lipid association constant is rather high, indicating that the biological action of the hormone is likely to be at the membrane level, either via its interaction with membrane receptors, and/or as a lipoperoxidation radical scavenger.

Ernane J.X. Costa, Roberto Harzer Lopes, and M.Teresa Lamy-Freund

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: melatonin – lipid bilayer permeability – lipid association constant

Address reprint requests to
M.Teresa Lamy-Freund, Instituto de Física,
Universidade de São Paulo, CP 66318,
CEP 05389-970, São Paulo, Brasil.

Received April 25, 1995; accepted July 26, 1995.

Introduction

Diverse physiological roles have been assigned to melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), which is the most important hormone synthesized by the pineal gland. Some of its biological functions were shown to be dependent on protein plasma membrane receptors [Morgan and Williams, 1989; Sudgen, 1992; Ebisawa et al., 1994], though it has also been suggested that melatonin can cross the cell membrane barrier and interact in the nucleus [Tan et al., 1993a; Reiter et al., 1993].

It was recently shown that melatonin is highly soluble in aqueous media, being soluble and stable up to the concentration of 5×10^{-3} M [Shida et al., 1994]. Thus, after being secreted by the pineal gland, melatonin could be carried by the blood stream to its target cells, without requiring protein transport. The aqueous solubility of melatonin could explain its presence in the cytosol and hence its interaction with nuclear receptors. However, for a better understanding of the melatonin path across cell membranes, including the possible absence of protein membrane transporters, it remains to be proved that melatonin can cross pure lipid barriers.

The present work focuses on the interaction of melatonin with lipid bilayers. A simple dialysis ex-

periment is used here to show that melatonin can easily penetrate pure lipid bilayers. It is also shown that despite its high solubility in aqueous medium melatonin has a relatively large lipid membrane association constant, in line with its capacity of crossing the bilayers.

Materials and methods

Materials

Melatonin (P6414, lot 98F8374), asolectin (Type II-S, from soybean, L- α -phosphatidylcholine 10–20%), methylene blue (MB), and sodium dodecyl sulfate (SDS, 99% sodium salt) were purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA and employed without further purification. 2-I-melatonin (M-112) was from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA). Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was from SERVA Feinbiochemica (New York, NY, USA).

Sample preparation

A concentrated melatonin solution, 10^{-3} M, was prepared as described elsewhere [Shida et al., 1994]. Diluted samples were prepared from that stock solution.

Multilamellar asolectin vesicles were prepared from direct addition of the desired solution to the lipid powder, followed by vortexing. Considering that asolectin is a mixture of many lipids it will be assumed here an average molecular weight of 750 for the lipids.

Dialysis experiment

Dialysis tubing (D 2272) from Sigma Chemical Co. was used with 0.5 ml of the desired sample inside. Asolectin concentration was 50 mM, calculated as described above. Samples were prepared in water and dialyzed against 2 l of water, at room temperature. Water was changed three times, and each time stirred for 30 min. Optical absorption spectra were registered in a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. SDS was added to the final concentration of 5% (g/100 ml), immediately before the sample absorbance measurement. SDS micelles solubilize the lipids, breaking the vesicles, thus allowing a proper quantification of the chromophore inside and outside them. For comparison among different samples, SDS was used in all samples, though the addition of the detergent is only necessary for the lipid containing ones. Due to the high lipid concentration used here, even after the addition of SDS the lipid containing samples were slightly turbid. Thus, the MB and melatonin measured absorbances were also corrected for light scattering, calculated from pure lipid samples. That correction is particularly important for melatonin, whose absorbance is measured at a low wavelength, 290 nm.

Fluorescence experiment

Melatonin fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{excitation}}=290 \text{ nm}$) were registered in a Hitachi 3010 spectrofluorimeter, at 25°C and were corrected for the instrumental sensitivity variation with wavelength. Fluorescence intensity measurements were properly corrected for vesicles light scattering. Samples were prepared in 10 mM Hepes buffer pH 7.4. Melatonin was used at the concentration of 10^{-5} M . Large unilamellar asolectin vesicles were prepared by the method of extrusion [Hope et al., 1985] resulting in 2.5 mM stock suspensions. Lipid titration was performed by adding small amounts of the concentrated lipid vesicle suspension to melatonin solution and monitoring the changes in its fluorescence intensity.

Results and discussion

Lipid membrane permeability

To check whether melatonin could cross pure lipid bilayers we used a dialysis experiment based on the

methodology described by Augusto and Carmona-Ribeiro [1989]. Asolectin was chosen as a convenient lipid membrane model system as it is composed of a variety of lipids and form rather stable multilamellar vesicles.

A control experiment was done with MB, which is known to be retained by asolectin vesicles, not being able to cross lipid barriers [Augusto and Carmona-Ribeiro, 1989]. Vesicles were prepared by the addition of a $1.0 \times 10^{-1} \text{ mM}$ solution of MB to the lipid powder, resulting in a sample containing the dye both inside and outside the multilamellar vesicles. Two samples were dialyzed simultaneously in the same vessel: one containing pure MB solution and the other containing MB inside and outside the asolectin vesicles, as described above. Before dialysis, MB concentration was $1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$ for both samples. The optical absorbance of the samples at 660 nm were measured before and after dialysis (Table I). As expected, the absorbance values before dialysis were very similar, and a mean value was used for both samples.

The percentage of MB entrapment can be calculated by

$$\text{ENT (\%)} = 100 \left\{ \frac{A_{\text{MB+aso(after)}} - A_{\text{MB(before)}}}{A_{\text{MB(before)}}} \right\}$$

where $A_{\text{MB(before)}}$ is the absorbance of both pure MB and MB plus asolectin before dialysis. $A_{\text{MB(after)}}$ and $A_{\text{MB+aso(after)}}$ are the absorbances of pure MB and MB plus asolectin samples after dialysis, respectively.

The percentage of MB entrapment was calculated to be around 50%. This is in accord with previous results [Augusto and Carmona-Ribeiro, 1989], showing that asolectin vesicles are not permeable to the cationic dye MB.

The same methodology described above was used with melatonin in the place of MB. The initial melatonin concentration was $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ and the absorbance was measured at 290 nm (Table I).

Table 1. Optical absorption of methylene blue (MB) and melatonin samples before and after dialysis

Sample	Absorbance before dialysis	Absorbance after dialysis
MB	0.763 ⁽¹⁾	0.022 ⁽¹⁾
MB + asolectin	0.763 ⁽¹⁾	0.428 ⁽¹⁾
Melatonin	1.242 ⁽²⁾	0.009 ⁽²⁾
Melatonin + asolectin	1.242 ⁽²⁾	0.065 ⁽²⁾

Absorbances were measured at 660 nm⁽¹⁾ and 290 nm⁽²⁾. Optical path length 0.1 cm⁽¹⁾ and 0.5 cm⁽²⁾. The data are expressed as mean values of three experiments.

Opposite to the results with MB, the percentage of melatonin entrapment was found to be negligible (ca. 5%), showing that pure lipid bilayers are very permeable to that hormone.

Considering that many biological experiments use the radioactive complex ^{125}I -melatonin, the dialysis experiment was also done with 2-I-melatonin. The results showed that the lipid bilayers are equally permeable to both melatonin and its I complex, within the accuracy of the dialysis experiment.

Lipid bilayer partition coefficient

Melatonin lipid association constant (K_a) was calculated through the increase of the hormone fluorescence intensity due to its penetration into lipid bilayers, which are a more hydrophobic medium (Lakowicz, 1983) (Fig. 1). K_a was calculated as described below.

The amount of bound melatonin [M_b] is given by the equation

$$[M_b] = [M_t](I - I_o)/(I_{max} - I_o)$$

where $[M_t]$ is the total melatonin concentration, I is the fluorescence intensity for different lipid concentrations, I_o is the initial fluorescence intensity in the absence of lipid and I_{max} is the final fluorescence intensity, in the presence of excess of lipid.

For the calculation of K_a we considered the equilibrium equation

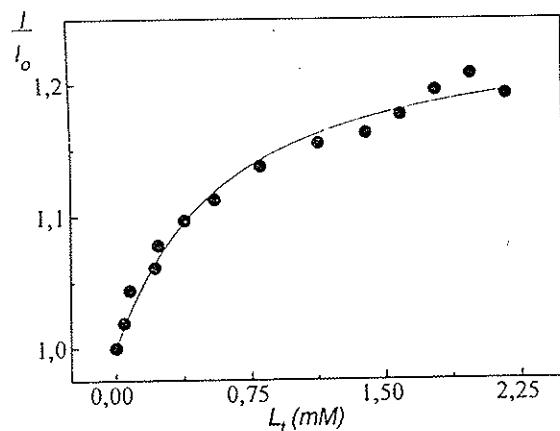
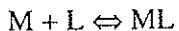


Fig. 1. Relative increase in the fluorescence emission maximum intensity of melatonin (350 nm) on addition of asolectin vesicles, at 30°C. Excitation wavelength 290 nm. L_t is the total concentration of lipid, I and I_o are the fluorescence intensity at a certain L_t and in the absence of lipid, respectively. $[\text{melatonin}] = 10^{-5} \text{ M}$. The experimental data (●) are expressed as mean values of three experiments. The best fit (continuous line) was calculated by the chi-square reduced method, using the model described in the text.

where M and L stand for melatonin and lipid, respectively. The association constant can be calculated by $K_a = [ML]/[M_t][L_t]$, where $[M_t]$ and $[L_t]$ are the concentration of free melatonin and lipid, respectively, and $[ML]$ is the concentration of bound molecules. Considering that $[M_b] = [ML]$ and making the simplifying hypothesis that there is an infinity number of binding sites for the hormone, that is $[L_f] \approx [L_d]$, where $[L_d]$ is the total number of lipids. The above equations can be combined to yield

$$\frac{1}{(I - I_o)} = \frac{1}{(I_{max} - I_o)} + \frac{1}{(I_{max} - I_o)} \cdot \frac{1}{K_a L_t}$$

from which a melatonin lipid association constant $K_a = 1570 \pm 200 \text{ M}^{-1}$ was calculated from the best fit (continuous line in Fig. 1) to the experimental data. The melatonin lipid partition coefficient K_p can be calculated from the relation $K_p = \rho K_a / MW$, where ρ is the lipid density, which will be considered 1 g/ml, and MW is the lipid molecular weight, which is taken as an average value of 750. Those values yield a lipid partition coefficient K_p around 2000 for melatonin. Therefore, though melatonin is a highly aqueous soluble molecule [Shida et al., 1994] its affinity for the hydrophobic lipid micro environment is much higher.

Final comments

Considering the variety of lipid composition of most biological cells, and the number of different lipids present in asolectin, the system used here can be considered a good model for regions of the lipid phase of many biological membranes. The present work shows that melatonin has a relatively high lipid partition coefficient and can easily cross lipid bilayers. Its ability to cross lipid membranes is in accord with its reported effect at the cell nuclear level [Tan et al., 1993a].

The multiple biological roles played by melatonin should be analyzed in the light of its ability of being almost everywhere in the cell, but preferentially in hydrophobic portion of the membrane. Its reported radical scavenging action [Tan et al., 1993b; Reiter et al., 1993] should certainly be extended to the membrane lipid phase. Accordingly, it has recently been reported [Melchiorri et al., 1995; Reiter et al., 1995], that radicals formed by lipid peroxidation can be efficiently on-site destroyed by melatonin.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP, CNPq, and FINEP. We are indebted to M.H. Biaggi for technical assistance.

Costa et al.

Literature cited

- AUGUSTO, O., A.M. CARMONA-RIBEIRO (1989) Introducing model membranes and lipoperoxidation. *Biochem. Educat.* 17:209-210.
- EBISAWA, T., S. KARNE, M.R. LERNER, S.M. REPPERT (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:6133-6137.
- HOPE, M.J., M.B. BALLY, G. WEBB, P.R. CULLIS (1985). Production of large unilamellar vesicles by rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812:55-65.
- LAKOWICZ, J.R. (1983) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.
- MELCHIORRI, D., R.J. REITER, A.M. ATTIA, M. HARA, A. BURGOS, G. NISTICO (1995) Potent protective effect of melatonin on *in vivo* paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sciences* 56:83-89.
- MORGAN, P.J., L.M. WILLIAMS (1989) Central melatonin receptors: Implications for a mode of action. *Experientia* 45:955-965.
- REITER, R.J., B. POEGGELER, D.X. TAN, L.D. CHEN, L.C. MANCHESTER, J.M. GUERRERO (1993) Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15:103-116.
- REITER, R.J., D. MELCHIORRI, E. SEWERYNEK, B. POEGGELER, L. BARLOW-WALDEN, J. CHUANG, G.G. ORTIZ, D. ACUÑA-CATROVIEJO (1995) A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 18:1-11.
- SHIDA, C.S., A.M.L. CASTRUCCI, M.T. LAMY-FREUND (1994) High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* 16:198-201.
- SUGDEN, D. (1992) Effect of putative melatonin receptor antagonists on melatonin-induced pigment aggregation in isolated *Xenopus laevis* melanophores. *Eur. J. Pharm.* 213: 405-408.
- TAN, D.X., B. POEGGELER, R.J. REITER, L.D. CHEN, S. CHEN, L.C. MANCHESTER, L.R. BARLOW-WALDEN (1993a) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Lett.* 70:65-71.
- TAN, D.X., L.D. CHEN, B. POEGGELER, L.C. MANCHESTER, R.J. REITER (1993b) Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1:57-60.

High melatonin solubility in aqueous medium

Shida CS, Castrucci AML, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res.* 1994;16:198-201.

Abstract: The pineal hormone melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) has been reported to participate in important physiological processes. Although some of its biological actions seem to depend on a protein receptor at the membrane surface, melatonin is known to interact with a large variety of tissues and cells, suggesting that the molecule may not necessarily interact through a specific membrane receptor at a specific cell. Most discussions of melatonin activity have assumed that the molecule is highly hydrophobic. Contrary to belief, the present work shows that melatonin is soluble in a purely aqueous medium up to 5×10^{-3} M and describes a new method of melatonin preparation which shows the high hydrophilicity of the molecule. The results presented will affect the current biological hypothesis on the need of a melatonin carrier in the blood stream or the mechanisms which allow the hormone to cross the cell membrane and interact at the level of the nucleus.

C.S. Shida,¹ A.M.L. Castrucci,² and
M.T. Lamy-Freund³

¹Instituto de Física, Universidade de São Paulo,
São Paulo, Brazil; ²Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Key words: melatonin, aqueous solubility, time stability

Address reprint requests to: M. Teresa
Lamy-Freund, Instituto de Física, Universidade de
São Paulo, CP 20516, CEP 01452-990, São
Paulo, Brazil.

Received December 14, 1993;
accepted February 23, 1994.

Introduction

The complex role of a molecule in the body is related to many factors, including its lipophilic or hydrophilic character. Many aqueous soluble hormones do not penetrate cells but interact at the cell membrane surface with protein receptors. On the other hand, steroid and thyroid hormones, for instance, are known to enter target cells to exert their effects [Stryer, 1988].

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), a tryptophan-derived hormone, has been reported to interact with a variety of different cells [Reiter, 1991], playing a number of distinct physiological functions, including many photoperiod-dependent responses [Reiter, 1980; Bartness and Goldman, 1989; Armstrong, 1989]. Recently melatonin was shown to behave as a very potent oxygen radical scavenger [Tan et al., 1993a; Reiter et al., 1993], and its anti-aging, life-prolonging [Pierpaoli et al., 1991; Reiter, 1992], and DNA protective effects [Tan et al., 1993b] were suggested to be related to its antioxidant capacity. Although some melatonin membrane receptors have been identified [Morgan and Williams, 1989; Sudgen, 1992], it has been suggested that there could be many melatonin actions where a protein receptor would not be necessary [Reiter et al., 1993].

Melatonin is a small non-charged molecule, which is considered to be highly hydrophobic, possibly due to its chemical structure, but mainly

due to the difficulty of directly dissolving melatonin in aqueous media. In the literature, melatonin has always been reported to be prepared by first dissolving melatonin powder in an organic solvent, such as ethanol or dimethylsulfoxide, followed by dilution with an aqueous medium. Because of its presumed hydrophobic nature it was suggested that melatonin requires plasma proteins to be transported in the blood [Cardinali et al., 1972], and it easily crosses the lipid membrane barrier [Reiter, 1992]. Considering its accepted high degree of hydrophobicity, there still remained the question of how melatonin gets into the aqueous compartment of the cell and interacts at the nuclear level [Tan et al., 1993b]. The present work shows that melatonin is soluble in pure aqueous medium up to 5×10^{-3} M when it is prepared by the new method described here.

Materials and methods

Chemicals

Melatonin (P6414, lot 98F8374), purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, was employed without further purification. HEPES was from INLAB, Brazil.

Melatonin preparation

Melatonin was prepared based on the method used for the preparation of lipid vesicles [Lasic, 1992].

Melatonin solubility in aqueous medium

TABLE 1. Solubility and stability of melatonin in water

Theoretical ¹ (M)	Immediately after preparation ² (M)	3 days after ² (M)	10 days after ² (M)	12 days after ² (M)
2×10^{-5}	1.9×10^{-5}	1.9×10^{-5}	1.9×10^{-5}	1.9×10^{-5}
4×10^{-5}	3.8×10^{-5}	—	—	—
5×10^{-5}	4.5×10^{-5}	—	—	—
1×10^{-4}	8.7×10^{-5}	—	—	—
2×10^{-4}	1.9×10^{-4}	1.9×10^{-4}	8.3×10^{-5}	—
4×10^{-4}	3.9×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1.9×10^{-4}	—
5×10^{-3}	4.8×10^{-3}	4.7×10^{-3}	3.7×10^{-4}	—
1×10^{-2}	8.2×10^{-3}	8.2×10^{-3}	4.7×10^{-3}	4.7×10^{-3}
2×10^{-2}	1.7×10^{-2}	7.6×10^{-3}	5.9×10^{-3}	4.4×10^{-3}
			4.5×10^{-3}	5.1×10^{-3}

¹Melatonin concentrations calculated from the stock solution (see text).

²Melatonin concentrations calculated from optical measurements (see text). Solutions were kept at 4°C.

About 0.3 ml of a 10^{-2} M stock solution of melatonin in chloroform was slowly evaporated under a stream of N_2 , while gently spinning the test tube until a dried and homogeneous film was obtained on the bottom of the tube. Residual solvent was removed by evaporation under vacuum for at least 3 hr. Melatonin was then dissolved in water, with vortexing, to the desired final concentration. Results obtained using 10×10^{-3} M HEPES buffer, pH 7.4 were identical to those obtained with water.

Whenever the "traditional method" of melatonin preparation is mentioned here it refers to the technique of dissolution melatonin powder in ethanol (10^{-2} M) and dilution to the desired concentrations with water or buffer, with not more than 0.2% residual ethanol, in volume.

Optical measurements

Melatonin optical absorption spectra were registered in a Aminco SW-100 spectrophotometer, at room temperature, with a 1cm path length quartz cell. For concentrations above 4×10^{-4} M, the samples were diluted before absorption measurement. All the absorption values shown here are mean values of at least 3 samples. Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{excitation}} = 278$ nm) were registered in a Hitachi 3010 spectrofluorimeter, at room temperature, with a 1cm path length quartz cell.

Biological activity measurements

The toad (*Bufo ictericus*) skin bioassay was utilized as previously reported [Ferroni and Castrucci, 1987]. Isolated skin in physiological saline is light in color due to the melanin granule aggregation within melanocytes. In skin previously darkened by the pigment dispersing agonist α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone), melatonin causes a re-

versal back to the original light color [Filadelfi and Castrucci, 1993]. The changes in color were monitored by a Photovolt reflectometer and calculated as percentage of the initial (basal) values.

Results and discussion

The optical (240 nm $< \lambda <$ 300 nm) and fluorescence (300 nm $< \lambda <$ 400 nm) spectra of melatonin prepared by the new method described here are identical to those obtained with samples made by the traditional method. Signals were registered with melatonin concentrations up to 4×10^{-4} M and 2×10^{-5} M, for optical and fluorescence spectroscopies, respectively.

For higher melatonin concentrations, Table 1 compares the concentration that should be obtained if all the melatonin molecules in the film had been solubilized by water, calculated from the stock solution (first column), with the actual concentration of melatonin in solution, calculated by measuring the samples optical absorption assuming $\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at $\lambda = 278$ nm (second column) (Merck Index, 1989). The stability of several melatonin solutions, for up to 12 days, is also shown in Table 1. It can be seen that within an experimental error of 8%, melatonin is soluble in water (or HEPES buffer) up to the concentration of 5×10^{-3} M; furthermore, melatonin is highly stable when kept at 4°C. This result is also emphasized in Figure 1, where it is evident that, for concentrations higher than 5×10^{-3} M, melatonin will precipitate down to its solubility concentration.

Melatonin solubilized by the new method was also checked for biological activity (see Materials and methods). The results obtained were identical to those with the hormone prepared by the traditional method, within the experimental error (Fig. 2).

It was clearly shown here that melatonin is rather soluble in aqueous medium when it is prepared from

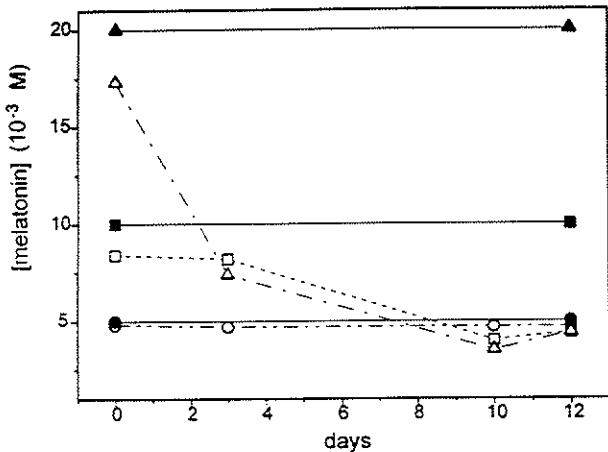


Fig. 1. Time stability of melatonin in water solutions. 2×10^{-2} M, ▲ and Δ; 1×10^{-2} M, ■ and □; 5×10^{-3} M, ● and ○. Full symbols correspond to theoretical values, as explained in the text.

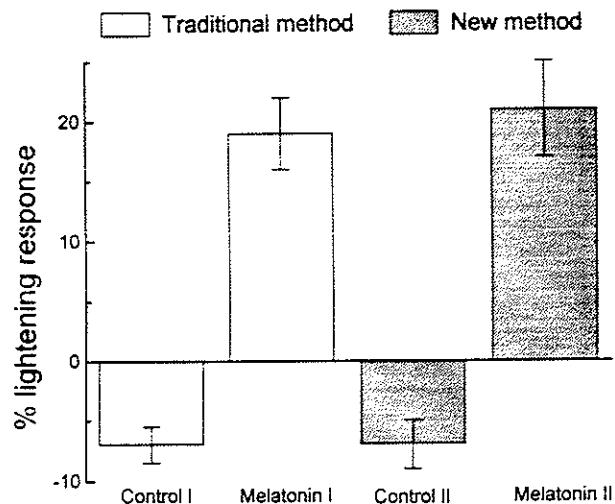


Fig. 2. Lightening effects of melatonin solubilized by the new method as compared to the hormone solubilized by the traditional method in the *in vitro* toad skin bioassay ($n = 6$).

a thin film on a glass surface. This is understandable considering that melatonin is an indoleamine where the pyrrole ring can be polarized so the N-H group may participate in a hydrogen bond with a water molecule. Moreover, the heterocyclic indole could also form hydrogen bonds with water, similar to the benzene ring, as has been recently reported [Suzuki et al., 1992]. Therefore, the role of the film seems to be to make the melatonin molecule more accessible to water, compared to the packed structure of the powder microcrystals.

Another important aspect of the melatonin preparation described here is the possibility of eliminating ethanol from melatonin solutions. Although fluorescence and optical absorption spectra, as well

as the biological activity assay described here, showed identical results for the two different melatonin preparations, it has been found that even low concentrations of ethanol (0.1% in volume) exhibit remarkable inhibitory effects on proliferation of cultured neoplastic melanocytes (data not shown).

Though the results above were obtained with melatonin in pure water or HEPES buffer, it is obvious that the melatonin solubility in the different aqueous media of the body will be around 10^{-3} M, which is much higher than the concentration required for the molecule to act. On the other hand melatonin has also been found to partition in lipid vesicles [C.S. Shida et al., in preparation], indicating that this molecule could penetrate a lipid bilayer and bath every part of the cell, possibly locating preferentially in the nucleus [Menendez-Pelaez et al., 1993], and acting, for instance, as an endogenous radical scavenger [Reiter et al., 1993; Poeggeler et al., 1993].

The method of melatonin preparation shown here should be tested with other endogenous molecules or pharmaceutical products that have been considered "water insoluble." The understanding of the solubility properties of biologically relevant molecules is certainly fundamental for the discussion of their role in organisms.

Acknowledgments

This work was supported in part by FAPESP and CNPq. We are indebted to Miss Ana Maria Filadelfi for performing the biological assays.

Literature cited

- ARMSTRONG, S.M. (1989) Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia* 45:932-938.
- BARTNESS, T.J., B.D. GOLDMAN (1989) Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons. *Experientia* 45:939-945.
- CARDINALI, D.P., H.J. LYNCH, R.J. WURTMAN (1972) Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 91:1213-1218.
- FERRONI, E.N., A.M.L. CASTRUCCI (1987) A sensitive *in vitro* toad skin bioassay for melanotropic peptides. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 20:213-220.
- FILADELFIA, A.M.C., A.M.L. CASTRUCCI (1993) Melatonin desensitizing effects on the *in vitro* responses to MCH, Alpha-MSH, isoproterenol and melatonin in pigment cells of a fish, a toad, a frog and a lizard, exposed to varying photoperiodic regimens. *Comp. Biochem. Physiol.* In press.
- LASIC, D. (1992) Liposomes. *Am. Sci.* 80:21-31.
- MENENDEZ-PELAEZ, A., R.J. REITER (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* 15:59-69.
- MERCK INDEX (1989) 11th edition. Merck Research Laboratory, Rahway, NJ, p. 5695.
- MORGAN, P.J., L.M. WILLIAMS (1989) Central melatonin receptors: Implications for a mode of action. *Experientia* 45:955-965.

- PIERPAOLI, W., A. DALL'ARA, E. PEDRINIS, W. REGELSON (1991) The pineal control of aging: the effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 620:291-313.
- PÖEGGELER, B., R.J. REITER, D.X. TAN, L.D. CHEN, L.C. MANCHESTER (1993) Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res.* 14:151-168.
- REITER, R.J. (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev.* 1:109-131.
- REITER, R.J. (1991) Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.* 6:223-227.
- REITER, R.J. (1992) The aging pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays* 14:169-175.
- REITER, R.J., B. PÖEGGELER, D.X. TAN, L.D. CHEN, L.C. MANCHESTER, J.M. GUERRERO (1993) Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15:103-116.
- STRYER, L. (1988) *Biochemistry*, 3rd Ed. W.H. Freeman, New York.
- SUGDEN, D. (1992) Effect of putative melatonin receptor antagonists on melatonin-induced pigment aggregation in isolated *Xenopus laevis* melanophores. *Eur. J. Pharmacol.* 213:405-408.
- SUZUKI, S., P.G. GRENN, R.E. BUMGARNER, S. DASGUPTA, W.A. GODDARD III, G.A. BLAKE (1992) Benzene forms hydrogen bonds with water. *Science* 257:942-945.
- TAN, D.X., L.D. CHEN, B. PÖEGGELER, L.C. MANCHESTER, R.J. REITER (1993a) Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1:57-60.
- TAN, D.X., B. PÖEGGELER, R.J. REITER, L.D. CHEN, S. CHEN, L.C. MANCHESTER, L.R. BARLOW-WALDEN (1993b) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 70:65-71.

Abstract
surface
fluoresc
shallow
according
nitroxid
melaton
cients w
similar
here ma
physiolo
© 19

Key wo
Spin la

1. Intro

Mela
mone d
with ma
iological
many t
protein
melato
lished [
lipids a
melato
that the
being a
shown t
highly s

Consi
both its
role as a
stand ha
titious
changes
the lipic
hormon

The p
porated
analyze
acids an

*Corresp
E-mail: i

¹Present
Brazil.

0014-579
PII S 00

How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies

Ernane J.X. Costa¹, Claudio S. Shida, Márcia H. Biaggi, Amando S. Ito,
M. Teresa Lamy-Freund*

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil

Received 24 July 1997

Abstract ESR spectra of spin labels placed at the membrane surface and at different depths of the bilayer core, and melatonin fluorescence in the presence of lipid vesicles, suggest an average shallow position for the hormone in the membrane. However, according to the melatonin ability to cross lipid bilayers, nitroxides placed deep in the bilayer were able to quench the melatonin fluorescence. Melatonin membrane partition coefficients were calculated for bilayers in different packing states, and similar and rather high values were found. The data presented here may be quite important to the understanding of melatonin physiological actions at the membrane level.

© 1997 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Melatonin; Lipid bilayer; Fluorescence;
Spin label

1. Introduction

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), a pineal hormone derived from tryptophan, has been reported to interact with many different cells, playing a number of distinct physiological roles. The hormone has been shown to participate in many biological process via its interaction with membrane protein receptors (for instance see [1–4]). On the other hand, melatonin's action as a free radical scavenger is well established [5–7], being effective in protecting DNA, membrane lipids and some cytosolic proteins. Supporting the idea that melatonin could cross the cell membrane barrier, it was shown that the hormone could cross pure lipid bilayers [8], therefore being able to act at the cytosol or nuclear levels. It was also shown that although melatonin partitions in lipid bilayers it is highly soluble in aqueous medium (up to 5×10^{-3} M) [9].

Considering the action of melatonin at the membrane level, both its interaction with membrane protein receptors and its role as a membrane antioxidant, it seems important to understand how melatonin interacts with lipid bilayers: how it partitions in the water/membrane system, how the bilayer changes the melatonin structure, how the hormone disrupts the lipid environment, and what the distribution profile of the hormone is inside the bilayer.

The present work uses the ESR signal of spin labels incorporated in lipid bilayers, and the melatonin fluorescence, to analyze the hormone's interaction with lipid vesicles. Stearic acids and phospholipids labeled at different positions along

the acyl chain and at the headgroup were used either as spin labels or as quenchers of the melatonin fluorescence. The well studied zwitterionic lipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was chosen as the model membrane system, due to its very convenient main transition temperature, $T_m \approx 23^\circ\text{C}$, easily allowing studies with the membrane at the gel and liquid crystal phases, below and above T_m , respectively. Those two phases would mimic micro-regions of different packing in a biological membrane.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Melatonin, DMPC, the spin labels 5- and 12-SASL (5- and 12-doxylstearic acid spin label) and the cholestane spin label CSL were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The spin labels 5- and 12-PCSL (1-palmitoyl-2-[5- or 12-doxyl stearoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). SSL (stearamide spin label) was a gift from S. Schreier's laboratory, at the University of São Paulo. The buffer used was 10 mM HEPES (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) at pH 7.4. All reagents were used without further purification. Deionized double distilled water was used throughout.

2.2. Melatonin sample preparation

A concentrated melatonin solution, 10^{-3} M, was prepared either as described elsewhere [9], or by directly dissolving the powder in buffer using a bath-type sonicator. The integrity of melatonin prepared by the last method was checked by its light absorption and fluorescent emission spectra, and by biological activity measurements [10]. Diluted samples were prepared from the stock solution. The two preparations avoid the presence of even small amounts of organic solvent in the final melatonin solution.

2.3. ESR sample preparation

Stock solutions of spin labels were prepared in chloroform and stored at -80°C . The membranes were multilamellar dispersions of lipids (10 mM) containing 1 mol% of spin label. A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids and spin labels, dried under a stream of N_2 and left under vacuum for a minimum of 5 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the buffer solution, without or with the desired concentration of melatonin, followed by vortexing.

2.4. Fluorescence sample preparation

DMPC large unilamellar vesicles (LUV) were prepared by the method of extrusion [11], resulting in 2.5 ± 0.1 mM stock suspensions (inorganic phosphate was quantitated based on [12]). Lipid titration was performed by adding small amounts of the concentrated lipid vesicle suspension to 10^{-3} M melatonin aqueous solution. The lipid concentration varied from 0.1 to 2.0 mM. Appropriate corrections for volume changes were made. For the quenching experiments, the samples were prepared as described above for the ESR experiments, but with 10 mol% of spin label, prior to extrusion.

2.5. ESR spectroscopy

ESR measurements were performed in a Bruker ER 200D-SRC spectrometer interfaced with an IBM-PC like computer for spectrum

*Corresponding author. Fax: (55) (11) 8134334.
E-mail: mtlfreund@fge.if.usp.br

¹Present address: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

digitalization. A field modulation amplitude of 0.08 mT and microwave power of 5 mW were used. The temperature was controlled to about 0.5°C with a Bruker B-ST 100/700 variable temperature device. The temperature was always monitored with a Fluka 51 K/J thermometer. The LOWFIT program (B. Bales) was used for the SSL spectrum simulations above the lipid transition temperature. For the measurement of several ESR spectrum parameters the ORIGIN software (MicroCal Software, Inc., MA, USA) was used. The data shown here are the mean values of at least three experiments, and the error bars are the calculated standard deviations.

2.6. Fluorescence spectroscopy

Melatonin fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 290$ nm) were registered in a Hitachi 3010 spectrophotometer, interfaced with an IBM-PC like computer, and were corrected for the instrumental sensitivity variation with wavelength. Slit widths were typically set at 5 nm, for both the excitation and emission. Fluorescence intensity was properly corrected for vesicle light scattering, making use of correction factors calculated from the experiment with pyranin (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrilisulfonate) and DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) vesicles, which are known not to interact with one another [13]. The concentrations of DMPG were such that they yielded the same turbidity as those of DMPC, measured in a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. Alternatively, a home-made front face fluorescence cell was used, with the excitation beam making an angle of 36° with the normal to the cell face, to avoid specularly reflected light from reaching the emission optics [14]. The fluorescence data are also the mean values of at least three experiments, and the error bars are the calculated standard deviations.

3. Results and discussion

3.1. Membrane spin label ESR

To study the effect of the melatonin-lipid interaction in the bilayer structure, spin labels that monitor different depths of the lipid bilayer were used. The alterations caused by melatonin in the ESR signal of SSL, which monitors the lipid head-group region, can be evaluated by the decrease of the empirical parameter h_{+1}/h_0 (ratio between the amplitude of the lines corresponding to $M_I = +1$ and $M_I = 0$) calculated from the SSL ESR spectra (Fig. 1). The hormone alters the DMPC membrane surface, below and above T_m , indicating that melatonin binds to the bilayer independent of its packing state. For temperatures above 30°C, rotation correlation times were calculated according to [15]. The spectra were simulated using the corrections for inhomogeneous broadening due to unresolved hyperfine structure, as suggested by [16]. Fig. 2 shows that the effect of melatonin on the $\tau_{||}$ values (rotation correlation time about the molecular symmetry axis) is analogous to that caused by decreasing the temperature, suggesting that melatonin increases the packing of the PC head-groups. Considering that there is probably a small orienting potential in the membrane interface, the calculated correlation times should be taken as comparative parameters and not as true numerical values. The changes caused by melatonin on both h_{+1}/h_0 and $\tau_{||}$ are similar, though less intense, to those yielded by the interaction of melanotropic peptides with DMPG vesicles [17]. Those peptides were shown to partially penetrate anionic bilayers.

Although melatonin was shown to cross lipid bilayers [8], the ESR spectra of spin labels placed at the 5th or 12th carbon of the acyl chain of stearic acid (5- and 12-SASL) or phospholipid (5- or 12-PCSL) derivatives do not change in the presence of up to 50 mol% of melatonin (relative to DMPC). The same result was obtained with the cholesterol analog spin label CSL. Therefore, unlike the melanotropins [17,18] and other small peptides, melatonin does not seem to

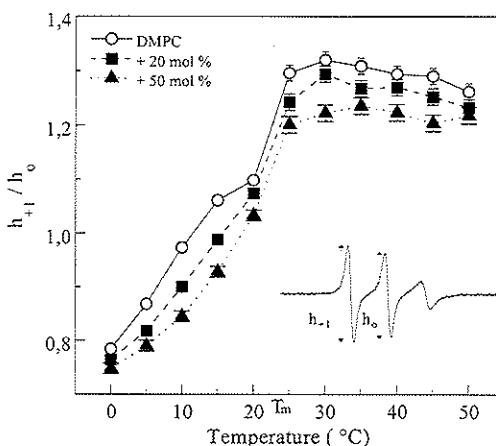


Fig. 1. Effect of melatonin on the ESR spectra of SSL in DMPC, at different temperatures (mol% melatonin relative to lipid).

significantly alter the packing of the bilayer core. The same result was recently found with a fluorescence probe [7]. That could be either due to the small volume of the hormone, as compared to the peptides, and/or to its preferential distribution at the membrane surface. Small aromatic hydrocarbons were also found to penetrate lipid bilayers, without altering the degree of organization of the membrane [19]. It was suggested that the small hydrophobic molecules were dissolved in the central region of the bilayer, close to the acyl terminal methyl group, although the water/lipid interface was not monitored.

3.2. Melatonin fluorescence

Like many fluorophores, the melatonin emission spectrum is highly dependent on the medium dielectric constant. Melatonin fluorescence spectra in solutions containing different proportions in volume of water/ethanol were obtained. The corresponding spectral variations were evaluated in terms of the changes in the area under the curves and position of the maximum of emission, and plotted versus the dielectric constant of the medium (ϵ) (Fig. 3). The values of ϵ for the different mixtures were calculated from the given values for different mixtures in weight of water/ethanol [20], assuming 1.00 and 0.80 g/cm³ for the water and ethanol densities, respectively. Fig. 3 shows that the fluorescence emission of melatonin is highly sensitive to its environment. Keeping that in mind, it is interesting to analyze the spectra of melatonin in the presence of excess DMPC (2.5 mM, where the titration experiment discussed below showed that melatonin was completely bound to the vesicles). The hormone fluorescence emission does not change much, yielding $I_{\max}/I_{\min} \approx 1.25$ and $\Delta\lambda \approx 3$ nm, where I_{\min} and I_{\max} are the areas under the melatonin emission spectra in the absence and the presence of DMPC, respectively. Therefore, based on the data in Fig. 3, melatonin in DMPC bilayers seems to be mainly localized in a region of dielectric constant around 75, hence close to the bilayer interface. The small variations on the melatonin fluorescence anisotropy at 30°C – from 0.002 in buffer to 0.033 in the presence of excess DMPC – also suggest the bilayer/water interface as the hormone localization. It is important to note that the fluorescence spectra of melatonin in DMPC vesicles indicated similar hormone-membrane interactions for the two different states of lipid packing.

Fig. 2. The liquid c...

3.3. Mel...

To fur... vesicles, n... K_p is de...

$K_p = \frac{n_M}{n_{M_b}}$ where n_M bound to ... are the v... will be as...

The ab... bound an... $[M_f]$, resp...

$K_p = \frac{[M_b]}{[M_f]}$ Hence,

$[M_b] = \frac{K_p}{(K_f)}$ where $[M_b]$...

The ab... atonin is ... (M_b) and ... and I_{\min} ,

$I = \frac{[M_b]}{[M_f]}$

can be pu... the melat... concentration

$I = \frac{I}{I_{\min}} = \frac{1}{(K_f)}$

where M_f ... was assu... of data w... lower tha... value for ... number o...

The ti...

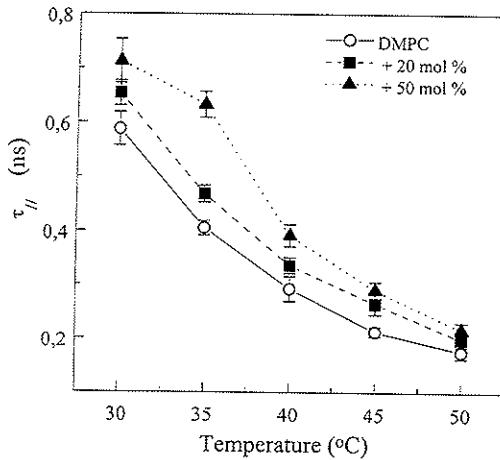


Fig. 2. The melatonin increase of SSL rotation correlation time, in the liquid crystal phase of DMPC.

3.3. Melatonin-lipid membrane partition coefficient

To further understand the binding of melatonin to DMPC vesicles, membrane partition coefficients, K_p , were calculated. K_p is defined as

$$K_p = \frac{n_M/V_M}{n_{H_2O}/V_{H_2O}}$$

where n_M and n_{H_2O} are the number of moles of melatonin bound to the membrane and in solution, and V_M and V_{H_2O} are the volumes of membrane and solution, respectively. It will be assumed that the total volume $V_t = V_{H_2O}$.

The above equation can be rewritten as a function of the bound and the free molar melatonin concentrations, $[M_b]$ and $[M_f]$, respectively.

$$K_p = \frac{[M_b]}{[M_f]} \frac{V_t}{V_M}$$

Hence, the bound peptide concentration is

$$[M_b] = \frac{K_p [M_t] V_M}{(K_p V_M - V_t)}$$

where $[M_t]$ is the total concentration of melatonin.

The above equation, together with the assumption that melatonin is partitioned between two media, lipid membrane (M_b) and buffer (M_f), where its fluorescence intensity is I_{\max} and I_{\min} , respectively

$$I = \frac{[M_b]}{[M_t]} I_{\max} + \frac{[M_f]}{[M_t]} I_{\min}$$

can be put together to yield an expression for the variation of the melatonin fluorescence I , as a function of the total concentration of lipids, $[L_t]$.

$$\frac{I}{I_{\min}} = \frac{K_p [L_t] M_w / \rho}{(K_p [L_t] M_w / \rho) + 1} \left(\frac{I_{\max}}{I_{\min}} - 1 \right) + 1$$

where M_w and ρ are the lipid molecular weight and density (ρ was assumed to be 1 kg/l). That equation will fit well any set of data where the concentration of bound molecule is much lower than the total concentration of lipid, yielding a constant value for K_p for the range of $[L_t]$ used. That is, when the number of binding sites is not restricted.

The titration data for the melatonin fluorescence in the

presence of different DMPC concentrations, above and below T_m , obtained as described in Section 2, were well fitted with the model discussed above, yielding K_p values of 3100 ± 500 and 4300 ± 800 , for the partition of melatonin in the gel and liquid crystal DMPC phases, respectively. Within the experimental error, the membrane melatonin partition is not a function of the packing lipids. It is interesting to point out that K_p values around 3000 are rather high, as compared to the values obtained, for instance, for the binding of melanotropic peptides to lipid bilayers [21], after the correction for the electrostatic effect ($K_p \approx 3$, assuming $K_p = K_a/0.7$ and $K_a = 1/nK_d$ where K_a , K_d are the association and dissociation constants, respectively, and n is the number of bound lipid molecules per peptide, as defined in [21]). They could also be compared with the partition of melatonin in a chloroform/water system, which yields a K_p around 20 (unpublished results). Values for solute/membrane partition coefficients around 10^3 were found, for example, for the neutral form of the local anesthetic dibucaine, but rather smaller values were obtained for other local anesthetics [22]. Therefore, although it is highly soluble in aqueous medium [9], melatonin strongly associates with lipid vesicles, both in the gel and in the liquid crystal states of the bilayer.

3.4. Membrane fluorescent quenchers

The interaction of melatonin with DMPC bilayers was also monitored by the quenching of its fluorescence emission by spin labels placed at the 5th and 12th carbon of the acyl chain (5- and 12-PCSL). This approach has been extensively used to localize fluorophores in lipid bilayers. It has been found that fluorophores which are supposed to bind near the membrane surface have their fluorescence emission better suppressed by nitroxides localized close to the lipid headgroups (for instance see [21,23]). Surprisingly, Fig. 4 shows that the melatonin fluorescence is better quenched by spin labels deeper in the bilayer (12-PCSL) than by those closer to the interface (5-PCSL). These results could be rationalized in the light of the known vertical fluctuation of acyl chain spin labels [24–26], and the ability of melatonin to cross lipid bilayers [8]. Hence, even considering that melatonin is preferentially localized at the membrane surface, as it is crossing the bilayer, the label at the 12th position, which is on average deeper in the bilayer [17] but can span most of the membrane, could be

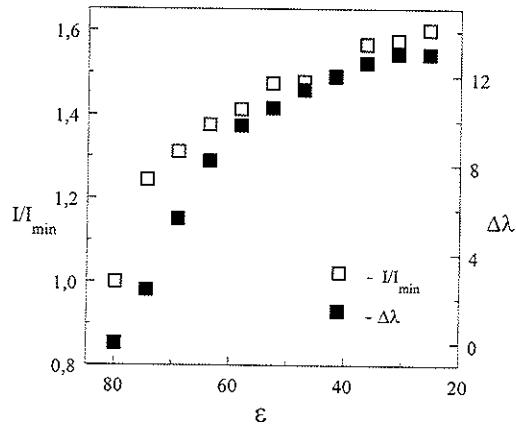


Fig. 3. The dependence of the melatonin fluorescence (area under the emission spectra and peak position) with the medium dielectric constant. I_{\min} is the intensity in pure water.

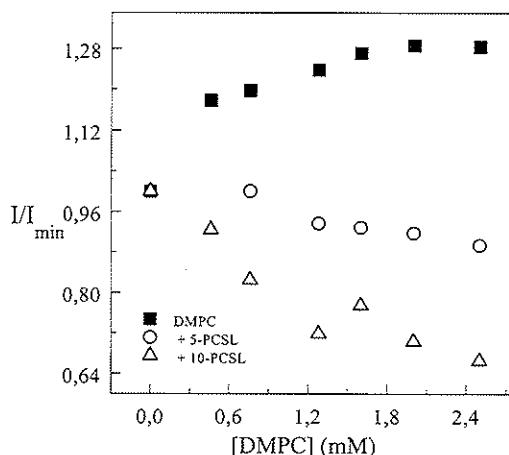


Fig. 4. Quenching of melatonin fluorescence as a function of the DMPC/PCSL (molar ratio 90/10) concentration.

more effective in quenching the hormone fluorescence than the less mobile quencher 5-PCSL.

For the understanding of the average distribution of melatonin near the surface of the bilayer one could make a very simple parallel with the distribution of a particle under a classical harmonic field, centered at the middle of the bilayer ($x = 0$). If the particle oscillates between the bilayer surfaces, its probability distribution would be such that the particle is predominantly found at the maximum value of $|x|$, the bilayer surfaces. Actually, melatonin inside the membrane could be subjected to any potential with a minimum at the middle of the bilayer, which would yield a higher molecular density close to the membrane interfaces. The origin of that potential could possibly be attributed to 'hydrophobic' and 'viscous' interactions.

The results presented here, concerning the melatonin/lipid interaction, will certainly be relevant for the discussion of the several melatonin physiological actions at the membrane level.

Acknowledgements: This work was supported by FAPESP, CNPq and FINEP. CNPq fellowships for E.J.X.C., C.S.S., M.H.B. and M.T.L.F. (research) are acknowledged. We are grateful to Dr. A.M.L. Castrucci for introducing us to melatonin and for the biological activity measurements. We would also like to thank Dr. S. Schreier for making the ESR spectrometer available, and Dr. G. Moscati for helpful discussions about dielectric constants.

References

- [1] Morgan, P.J. and Williams, L.M. (1989) *Experientia* 45, 955–965.
- [2] Sugden, D. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* 213, 405–408.
- [3] Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. and Reppert, S.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6133–6137.
- [4] Barrett, P., Conway, S., Jockers, R., Strosberg, A.D., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrange, P. and Morgan, P.J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1356, 299–307.
- [5] Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C. and Guerrero, J.M. (1993) *Neuroendocrinol. Lett.* 15, 103–116.
- [6] Marshall, K.A., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Aruoma, O.I. and Halliwell, B. (1996) *Free Radical Biol. Med.* 21, 307–315.
- [7] García, J.J., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Yu, B.P., Oh, C.S. and Muñoz-Hoyos, A. (1997) *FEBS Lett.* 408, 297–300.
- [8] Costa, E.J.X., Lopes, R.H. and Lamy-Freund, M.T. (1995) *J. Pineal Res.* 19, 123–126.
- [9] Shida, C.S., Castrucci, A.M.L. and Lamy-Freund, M.T. (1994) *J. Pineal Res.* 16, 198–201.
- [10] Ferroni, E.N. and Castrucci, A.M.L. (1987) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 20, 213–220.
- [11] Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. and Cullis, P.R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55–65.
- [12] Chen Jr., T.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756–1758.
- [13] Clement, N.R. and Gould, J.M. (1981) *Biochemistry* 20, 1534–1538.
- [14] Eisinger, J. and Flores, J. (1979) *Anal. Biochem.* 94, 15–21.
- [15] Marsh, D. (1989) in: *Spin Labelling. Theory and Applications* (Berliner, L.J., Ed.) Vol. V, pp. 255–300, Academic Press, New York.
- [16] Bales, B.L. (1989) in: *Spin Labelling. Theory and Applications* (Berliner, L.J., Ed.) Vol. V, pp. 77–126, Academic Press, New York.
- [17] Biaggi, M.H., Riske, K.A. and Lamy-Freund, M.T. (1997) *Bioophys. Chem.* (in press).
- [18] Biaggi, M.H., Pinheiro, T.J., Watts, A. and Lamy-Freund, M.T. (1996) *Eur. Biophys. J.* 24, 251–259.
- [19] Sanioto, D.L. and Schreier, S. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 530–537.
- [20] Hartshorn, L., Harris, C.C., Hey, J.A., Jones, T.I. and Milligan, A.G., in *International Critical Tables*.
- [21] Macêdo, Z.S., Furquim, T.A. and Ito, A.S. (1996) *Biophys. Chem.* 59, 193–202.
- [22] Paula, E. and Schreier, S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1240, 25–33.
- [23] Louro, S.R.W., Tabak, M. and Nascimento, O.R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 243–246.
- [24] Godici, P.E. and Landsberger, F.R. (1974) *Biochemistry* 13, 362–368.
- [25] Ellena, J.F., Archer, S.J., Dominey, R.N., Hill, B.D. and Cafiso, D.S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 940, 63–70.
- [26] Yin, J.J., Feix, J.B. and Hyde, J.S. (1988) *Biophys. J.* 53, 525–531.



Te

Ka

Abstrac

The t
(dimyri
crystal,
(T_m) w
tempera
decreas
negative
the dec
molecu
 A_2 beco
post tr
detected
increas
counter

Keywo

* Cor
8134334

0009-30
PII S00



Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions

Karin A. Riske ^a, Mário J. Politi ^b, Wayne F. Reed ^c, M. Teresa Lamy-Freund ^{a,*}

^a Institute of Physics, Universidade de São Paulo, CP 66318, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil

^b Institute of Chemistry, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Department of Physics, Tulane University, New Orleans, LA, USA

Received 4 June 1997; received in revised form 14 July 1997; accepted 14 July 1997

Abstract

The temperature dependence of the intensity of light scattered by aqueous dispersions of the anionic lipid DMPG (dymristoyl phosphatidylglycerol) was studied at different ionic strengths. The lipid main transition, gel-liquid crystal, is clearly detected by a sharp decrease in light scattering. As expected, the temperature of the main transition (T_m) was found to increase with the increase of the ionic strength. For low ionic strength, a DMPG second temperature transition, termed the 'post-transition', can be monitored by both an increase in light scattering and a decrease in conductivity. Zimm plot analysis indicates that below T_m the liposomes tend to aggregate, and show a negative second virial coefficient A_2 , and particles of large molecular weight. At the main phase transition, parallel to the decrease in light scattering, there is an increase in the sample conductivity, A_2 becomes positive and the particle molecular weight decreases, indicating that the vesicles become disaggregated. Moreover, at the post-transition (T_{post}) A_2 becomes very small, perhaps slightly negative, and the molecular weight increases again. Both the main and the post transitions were found to be reversible. In contrast to the main transition, the post-transition could not be detected by spin labels placed either at the membrane surface, or in the bilayer core. While the mechanism of increased ionization at T_m could be related to the melting of the hydrocarbon chains, the mechanism for the possible counterions recondensation at T_{post} is far less clear. © 1997 Elsevier Science Ireland Ltd.

Keywords: DMPG; Light scattering; Ionic strength; Phase transition; Surface ionization

1. Introduction

Although the thermotropic properties of charged lipids in aqueous suspensions has been extensively studied, their complex behavior has

* Corresponding author. Tel: +55 11 8186829; fax: +55 11 8134334; e-mail: mtfreund@fge.if.usp.br

not been fully characterized. DMPG (dimyristoyl phosphatidylglycerol), in particular, has been found to present different thermal phases depending on the lipid concentration, the sample pH, ionic strength, and time and temperature of incubation (Cevc et al., 1981; Epand and Hui, 1986; Gershfeld et al., 1986; Salonen et al., 1989; Epand et al., 1992; Kodama et al., 1993; Heimburg and Biltonen, 1994; Zhang et al., 1997). Heimburg and Biltonen (1994) observed a complex profile for the variation of the heat capacity of DMPG dispersions with temperature. For DMPG at concentrations between 10 and 150 mM, in low ionic strength (2 mM phosphate buffer and 1 mM EDTA), an intermediate thermal phase was described, called a large main transition region, characterized by high viscosity and low turbidity. Those results, together with electron microscopy, were discussed in terms of a long range order in the lipid dispersion. That same intermediate state had been seen before (Salonen et al., 1989) by DSC (differential scanning calorimetry), and was shown to be highly dependent on the solution ionic strength, and said to be limited by the main lipid transition and a second thermal transition, termed the 'post-transition'.

The present work investigates the different thermotropic states of freshly prepared DMPG, for different ionic strengths, mainly by light scattering. Zimm plot analysis of light scattering data showed that there is a net repulsion among the liposomes in the intermediate phase, accompanied by a measurable increase in the sample conductivity. A tentative, qualitative rationalization based on the Gouy–Chapman–Stern electrostatic double layer theory is discussed (see references in McLaughlin, 1977), which considers different $\text{Na}^+ - \text{PG}^-$ association constants in the gel and liquid crystal phases.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The sodium salt of the phospholipids, DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) and DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phos-

phocholine), and the spin labels 5- and 12-PCSL (1-palmitoyl-2-[5- or 12- doxyl stearoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). SSL (stearamide spin label) was a gift from S. Schreier laboratory, at the University of São Paulo. The buffer used was 10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) at pH 7.4. All reagents were used without further purification. Deionized water double distilled was used throughout.

2.2. Lipid dispersion preparation

A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids, dried under a stream of N_2 and left under vacuum for a minimum of 5 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the desired buffer or water solution, with or without added salt, followed by vortexing above the phase transition temperature. For the ESR measurements spin label solutions in chloroform were dried with the lipids, to the final concentration 1 mol% of spin label.

2.3. 90° Light scattering

A fluorimeter Hitachi F-3010 at a wavelength of 280 nm was used. The temperature was maintained with an external water bath Forma Scientific 2006, and measured with a Fluke 51 K/J thermometer placed inside the cuvette. After achieving the desired temperature, the sample was left for at least 5 min at each temperature before the measurement was done.

2.4. Multi-angle static light scattering

Static light scattering (SLS) measurements were made with a Wyatt Technology Dawn-F DSP light scattering photometer (Sta. Barbara, CA). To allow the scattering to be measured simultaneously from 18 angles, ranging from 26 to 145°, 25 mm diameter scintillation vials were used. Data was transferred via an RS-232c line to a microcomputer. One of the authors (WFR) wrote software for data acquisition and analysis.

Raw scattering vector q , $V(\mathbf{q})$, were converted to weight ratios $I(\mathbf{q})$ according to

$$I(\mathbf{q}) = \frac{V(\mathbf{q}) - V_s(\mathbf{q})}{V_a(\mathbf{q}) - V_d}$$

where $V_s(\mathbf{q})$ is the scattering from a reference solution, $V_a(\mathbf{q})$ is the voltage from the detector, (here taken as the absolute calibration), V_d was toluene, with a scattering ratio $I_d = 1$. The detector dark count at the geometrical center of cylindrical cells and of the refractive index of toluene, division losses at the scattering vector q

$$q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$$

where n is the index of refraction, λ is the vacuum wavelength, θ is the scattering angle. $I(\mathbf{q})$ for each photodiode is proportional to

$$N(\mathbf{q}) = \frac{V_n(\mathbf{q}) - V_s(\mathbf{q})}{V_n(\mathbf{q}) - V_d}$$

where $V_n(\mathbf{q})$ is the signal from the normalization solution, $V_s(\mathbf{q})$ is the reference wavevector, V_d is composed of a dilute sample solvent. In the weight average molecular weight M_w is 15 mg ml⁻¹ in water solution.

The standard 2.5% dilution for a single measurement was used for analysis.

$$\frac{Kc}{I(\mathbf{q})} = \frac{1}{M_w P(\mathbf{q})} + \frac{1}{M_w}$$

where M_w is the weight average molecular weight of the scatterer, $P(\mathbf{q})$ is a factor, which, in the case approximated, for a spherical particle, is given by

predicts a decrease in intensity with some dependence on q .

Raw scattering voltages at each angle scattering vector \mathbf{q} , $V(\mathbf{q})$, were transformed to absolute Rayleigh ratios $I(\mathbf{q})$ according to

$$I(\mathbf{q}) = \frac{V(\mathbf{q}) - V_s(\mathbf{q}_r)}{V_a(\mathbf{q}_r) - V_d(\mathbf{q}_r)} N(\mathbf{q}) I_a F \quad (1)$$

where $V_s(\mathbf{q})$ is the solvent scattering voltage at \mathbf{q} , $V_a(\mathbf{q}_r)$ is the voltage at a reference wavevector \mathbf{q}_r (here taken as that corresponding to $\theta = 90^\circ$) of the absolute calibration solvent, which in this case was toluene, with a known absolute Rayleigh scattering ratio for $\lambda = 633$ nm at $T = 25^\circ\text{C}$ of $I_a = 1.408 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$. $V_d(\mathbf{q}_r)$ is the photodetector dark count at the reference wavevector. F is a geometrical correction factor which, for upright, cylindrical cells amounts to the square of the ratio of the refractive index of the sample's solvent to that of toluene, divided by the total Fresnel reflection losses at the glass–solvent interface. The scattering vector \mathbf{q} has its usual definition as

$$\mathbf{q} = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2) \quad (2)$$

where n is the index of refraction of the solvent, λ is the vacuum wavelength of the laser and θ is the scattering angle. $N(\mathbf{q})$ is the normalization factor for each photodiode which is computed according to

$$N(\mathbf{q}) = \frac{V_n(\mathbf{q}) - V_s(\mathbf{q}_r)}{V_n(\mathbf{q}) - V_s(\mathbf{q})} \quad (3)$$

where $V_n(\mathbf{q}_r)$ is the scattering voltage of the normalization solution in the sample solvent at the reference wavevector. The normalization solution is composed of an isotropic scatterer in the sample solvent. In this case a solution of dextran of weight average molecular weight $M_w = 15\,000$ at 15 mg ml^{-1} in water was used as the normalizing solution.

The standard Zimm single contact approximation for a single component system (Zimm, 1948) was used for analyzing the total Rayleigh ratios

$$\frac{Kc}{I(\mathbf{q})} = \frac{1}{M_w P(\mathbf{q})} + 2A_2 c Q(\mathbf{q}) \quad (4)$$

where M_w is the weight average molecular weight of the scatterer, and $P(\mathbf{q})$ is the particle form factor, which, in the limit $\mathbf{q}^2 \langle R_g^2 \rangle < 1$ is approximated, for particles of any shape, by

$$P(\mathbf{q}) \sim 1 - \frac{\mathbf{q}^2 \langle R_g^2 \rangle_z}{3} \quad (5)$$

Here, $\langle R_g^2 \rangle_z$ is the z -averaged mean square radius of gyration. K is an optical constant, given for vertically polarized light as

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 (\partial n/\partial c)^2}{N_A \lambda^4} \quad (6)$$

$Q(\mathbf{q})$ depends on both particle form factor and interparticle interactions. In the current case of fairly small particles ($\mathbf{q}^2 R_g^2 < 1$) in dilute solution, we make the approximation that $Q(\mathbf{q}) = 1$.

N_A is Avogadro's number and $\partial n/\partial c$ is the refractive index increment of the solution per unit mass concentration increase of lipid. An average value of 0.12 ml g^{-1} was used here for DMPG.

2.5. ESR spectroscopy

ESR measurements were performed in a Bruker ER 200D-SRC spectrometer interfaced with an IBM-PC like computer for spectrum digitalization. A field modulation amplitude of 0.08 mT and microwave power of 10 mW were used. The temperature was controlled to about 0.5° with a Bruker B-ST 100/700 variable temperature device. The temperature was always monitored with a Fluke 51 K/J thermometer. For the measurement of the spectrum parameters, A_{\max} , the outer hyperfine splitting, and the linewidth of the low field line ($m_I = +1$) the ORIGIN software (MicroCal Software, MA) was used.

2.6. Refractive index

Refractive index was measured with a Carl Zeiss Abbe refractometer, equipped with a jacketed cell. Water was circulated to the cell from a constant temperature water bath Forma Scientific 2006, and temperature was measured with a Fluke 51 K/J thermometer in contact with the sample. A sodium lamp ($\lambda \approx 590 \text{ nm}$) was used.

2.7. Conductivity

A standard platinum electrode (1 cm^2) with a conductivimeter Digimed CD-20 Brazil was used.

predicts surface potentials similar to those observed as a decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

3. Results

3.1. General light scattering trends

The DMPG main thermal transition can be clearly monitored by the sharp decrease in light scattering. Fig. 1 shows the temperature dependence of the light scattered at $\theta = 90^\circ$ by two samples (the trend of the light scattering is the same for all angles in the measurable range): DMPG liposomes at relatively high ionic strength (100 mM NaCl) and zwitterionic DMPC liposomes. Both samples display a sharp drop around 22.5°C, indicating their gel–liquid crystal transition temperature (T_m).

However, DMPG at low ionic strength, 10 mM Hepes buffer only, shows a light scattering pattern rather different from those discussed above. The main transition continues to be clearly seen, and there is another transition (called here post-transition), which appears at around 35°C (Fig. 2). The DMPG post-transition has been seen before by light scattering (Heimburg and Biltonen, 1994), and DSC (Salonen et al., 1989), but, contrary to the main transition, it has not been well characterized. Fig. 2 shows that both the main and the post transitions are reversible. However, whereas the temperature of the main transition, T_m , measured

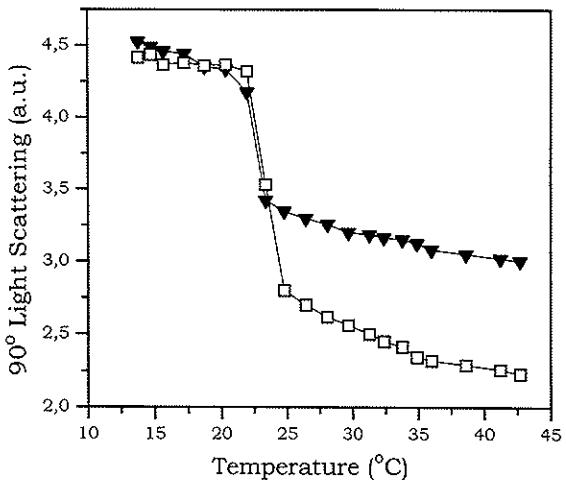


Fig. 1. Temperature dependence of 90° light scattering of dispersions of 10 mM DMPG + 100 mM NaCl (▼) and 10 mM DMPC (□) in 10 mM Hepes buffer pH 7.4.

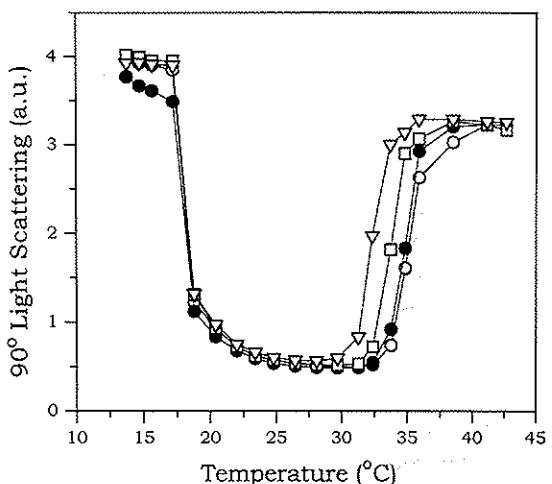


Fig. 2. Temperature dependence of 90° light scattering of 10 mM DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4, freshly prepared, temperature up (○) and temperature down (●), after 1 day (□) and after two days (▽).

by light scattering, does not change after 48 h of incubating the sample at 30°C, the post-transition temperature, T_{post} , decreases in time. It is important to note that for DMPG at low ionic strength the ratio between the intensity of the light scattered before and after T_m is much higher (about 4-fold, in Fig. 2) than that observed at high ionic strength (Fig. 1).

For some liposomes, the sharp decrease in turbidity at the gel–liquid crystal transition has been attributed to a change in the increment of refractive index (dn/dc), related to the known vesicle swelling and corresponding decrease in the bilayer density and thickness at the phase transition (Yi and MacDonald, 1973; Disalvo, 1991). Fig. 3 shows the temperature dependence of dn/dc for two DMPG samples: in the absence and in the presence of 100 mM NaCl. For the high ionic strength sample the observed variation of turbidity at the main transition (around 1.3, Fig. 1) could be related to a change in the refractive index n or to the square of dn/dc , as it appears in the Rayleigh scattering approximation (the ratio of $(dn/dc)^2$ below and above T_m is around 1.2, Fig. 3). For the low ionic strength sample no significant variation of the refractive index increment could be detected at the transition tempera-

ture (18°C). whole range (dn/dc)² char cannot explai indicating tha phase transiti

The transit known to inc strength (Trä of 29°C at a The shift in T of the DMPC present in so potential wo state more th a higher ph 1976; Träuble dependence o strength is cle In distilled w increase in tur the results ob 1986), which mal transition gether with led the autho strength, DM

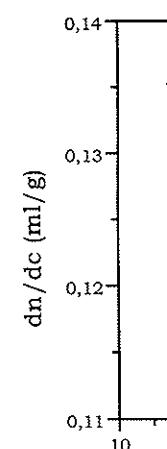


Fig. 3. Temperature dependence of the refractive index increment (dn/dc) of 10 mM DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4 in the absence (□) and presence (▽) of 100 mM NaCl.

pred
decre
some

ture (18°C). Even considering dn/dc over the whole range of temperature (from 10 to 40°C) (dn/dc)² changes by a factor of 1.4), its variation cannot explain the drop in light scattering at T_m , indicating that the large change in turbidity at the phase transition must have a different origin.

The transition temperature of ionized DMPG is known to increase with the increase of the ionic strength (Träuble et al., 1976), reaching the value of 29°C at about 2 M NaCl (Cevc et al., 1980). The shift in T_m can be attributed to the screening of the DMPG negative charges by the counterions present in solution. The decrease of the surface potential would increase the stability of the gel state more than that of the fluid state, leading to a higher phase transition temperature (Jähnig, 1976; Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980). The dependence of both T_m and T_{post} on the ionic strength is clearly seen by light scattering (Fig. 4). In distilled water DMPG displays a gradual decrease in turbidity with temperature, paralleling the results obtained with DSC (Epanad and Hui, 1986), which showed that the DMPG main thermal transition was very broad. That result, together with freeze-fracture electron microscopy, led the authors to suggest that, at very low ionic strength, DMPG could destabilize bilayers and

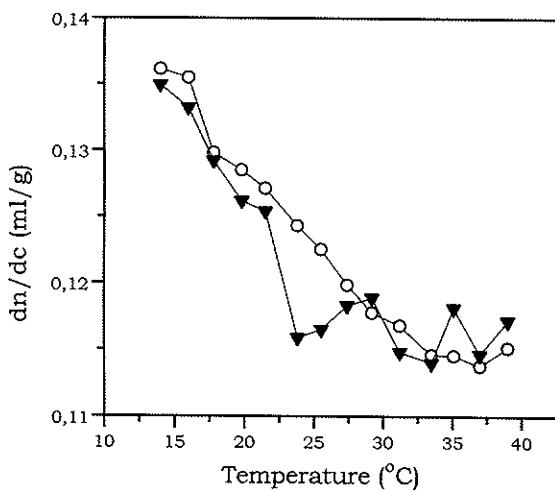


Fig. 3. Temperature dependence of the refractive index increment (dn/dc) of dispersions of DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4 in the absence (○) and in the presence of 100 mM NaCl (▼). DMPG concentrations from 1 to 70 mM.

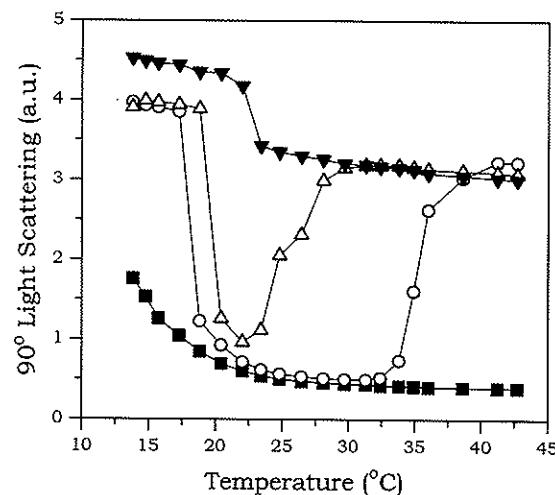


Fig. 4. Temperature dependence of 90° light scattering of dispersions of 10 mM DMPG in distilled water (■) and in 10 mM Hepes pH 7.4 with no added salt (○); + 10 mM (△); and + 100 mM NaCl (▼).

form smaller particles due to the strong repulsion between the charged layers (Epanad and Hui, 1986).

The sharp decrease in light scattering at the phase transition, allows the measurement of rather accurate T_m values for DMPG at the conditions used here (Table 1). In contrast to the main transition, the post-transition temperature decreases as the ionic strength increases, and disappears completely at 100 mM NaCl, as seen before (Fig. 1). Below T_m and above T_{post} the samples are visibly cloudy. In distilled water DMPG dispersions are transparent for all temperatures studied here, as opposed to the high ionic sample (100 mM NaCl) which is cloudy at all temperatures. Interestingly, the high salt and dis-

Table 1
Transition temperatures of DMPG dispersions, measured by light scattering, for different lipid concentrations in different ionic strengths

Sample	T_m (°C)	T_{post} (°C)
10 mM DMPG in 10 mM Hepes	18.0	35.0
+ 10 mM NaCl	19.5	26.0
+ 100 mM NaCl	22.5	—
50 mM DMPG in 10 mM Hepes	19.5	26.0

predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed general decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

tilled water samples provide well defined upper and lower limits, between which all other samples varied.

Similar to the results obtained with DSC (Heimburg and Biltonen, 1994), light scattering also detects an increase in T_m and a decrease in T_{post} with the increase of the DMPG concentration (Table 1).

Results comparable to those obtained with 10 mM NaCl were obtained with the same concentration of KCl. The T_m values found in the presence of the two cation species were very similar, but T_{post} for K^+ was lower, about 22.5°C, indicating some ion specific effect. The presence of 10 mM of Na_2SO_4 resulted in an increase in T_m ($T_m \sim 20^\circ C$) and decrease in T_{post} ($T_{post} \sim 22^\circ C$), possibly due to its higher ionic strength as compared with NaCl. Further studies on the effect of different ions on T_m and T_{post} could possibly indicate some correlation between the change in the phase transition temperatures and the ions so-called water 'structure maker' or 'structure breaker' (Toko and Yamafuji, 1980; Conway, 1981; Kraayenhof et al., 1996). It is important to note that similar results were obtained with phosphate buffer, indicating that there is no specific effect of the Hepes buffer.

All the thermal transitions shown here, measured by changes in the sample light scattering, were found reversible, and, for a given temperature, they were found stable for at least a few hours. In terms of the overall stability and reproducibility of the DMPG vesicles, it is important to make the following observations. The method of preparing the DMPG vesicles does not lead to a unique dispersion for each preparation. There can be significant batch-to-batch variation in the vesicles in terms of M_w , $\langle R_g \rangle_z$ and polydispersity, as will be discussed below, although the results obtained in Figs. 1 and 2 and Fig. 4 were rather reproducible. Furthermore, the vesicles are not stable against aggregation over a time scale of weeks. Hence, the vesicles can only be considered as in a metastable state. The temperature cycling experiments, however, were performed over a scale of hours, which is very short compared to the long term scale of vesicle instability, so that the vesicles were in equilibrium over the interval of the reversibility experiments.

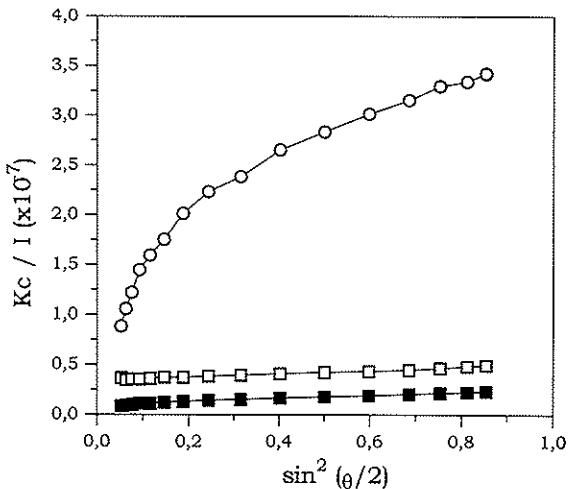


Fig. 5. K_c/I (Eq. (4)) as a function of $\sin^2(\theta/2)$ for 1.0 mM DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4 at $T = 15^\circ C$ (■); $23^\circ C$ (○); and $40^\circ C$ (□).

3.2. Light scattering results on vesicle mass and interactions

The light scattered at different angles displays the same pattern as that observed at 90° . Namely, the plots of K_c/I vs. $\sin^2(\theta/2)$ in Fig. 5 show that, between T_m and T_{post} , the light scattered at all angles, by the low ionic strength sample, was significantly less intense than that scattered below T_m and above T_{post} . Table 2 shows typical Zimm plot results for a particular preparation of DMPG liposomes in 10 mM Hepes buffer, at three temperatures: before the main transition, between the two transitions and after the post transition.

There was considerable polydispersity, as could be detected by the strong scattering at low angles, and only angles from 45° and higher were used. There was significant variation in the values of the

Table 2
Typical Zimm plot results for a DMPG dispersion in 10 mM Hepes buffer, for three temperature regions: below T_m ($13^\circ C$), between T_m and T_{post} ($22^\circ C$), and above T_{post} ($40^\circ C$)

T ($^\circ C$)	M_w (MDa)	A_2 ($cm \cdot mol per g^2$)	R_g (nm)
13	60	-2.0×10^{-6}	65
22	15	30×10^{-6}	80
40	40	1.0×10^{-6}	60

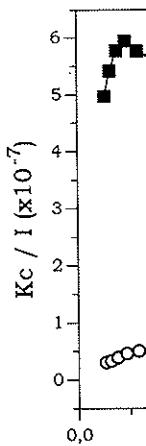


Fig. 6. Comparison of K_c/I (Eq. (4)) as a function of $\sin^2(\theta/2)$ for 1.0 mM DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4 at $T = 15^\circ C$ (■) and $40^\circ C$ (○).

results when measured, with M_w . However, the For a given high, and A_2 , some net attri liposomes. A large, indicat significantly, higher temper becomes extr indicating a c force between increase in M_w temperature trans charged lip Waals attrac increase in the and T_{post} , co solution con shown later.

3.3. Light scattering correlations

DMPG di salt display strongly inte

pre de son

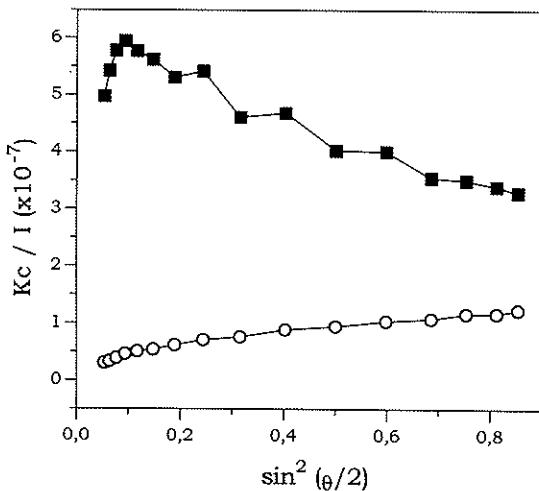


Fig. 6. Comparison of K_c/I (Eq. (4)) as a function of $\sin^2(\theta/2)$ for 1.0 mM DMPG in distilled water (■) and in 10 mM Hepes pH 7.4 (○).

results when different preparations were measured, with M_w , R_g and A_2 changing up to 100%. However, the overall trends were always the same. For a given preparation, below T_m the mass is high, and A_2 is very low and negative, indicating some net attraction, and hence aggregation of the liposomes. After T_m , A_2 becomes positive and large, indicating net repulsion, and the mass drops significantly, while R_g increases somewhat. For higher temperatures, after the post-transition, A_2 becomes extremely small or even slightly negative, indicating a considerable decrease in the repulsive force between the liposomes, which parallels an increase in M_w . Apparently, between the two temperature transitions, a repulsive force between the charged liposomes dominate over the van der Waals attraction. This could be explained by an increase in the vesicles surface charge between T_m and T_{post} , consistent with the increase in reduced solution conductivity in this range, as will be shown later.

3.3. Light scattering shows strong intervesicular correlations in the absence of added salt

DMPG dispersions in solutions with no added salt display scattering behavior characteristic of strongly interacting, electrically charged particles.

Fig. 6 compares the K_c/I versus $\sin^2(\theta/2)$ for 1 mM DMPG in water with no added salt and in 10 mM Hepes added at 25°C. The fact that K_c/I has a negative slope in the case of pure water indicates the strong interparticle correlation which occur. In 10 mM Hepes, these strong interactions are screened out by the mobile electrolytes in the Hepes, and K_c/I shows the positive slope typical of weakly interacting particles. In short, the total scattered intensity can be approximated by $I(q) \propto S(q)P(q)$, where $S(q)$ is the interparticle structure factor, given by

$$S(q) = 1 + 4\pi N \int_0^\infty (1 - g(r)) d^3r \quad (7)$$

$g(r)$ being the interparticle correlation function, given by

$$g(r) = \exp(-U(r)/kT) \quad (8)$$

where $U(r)$ is the potential energy between two particles at a separation r from each other. $P(q)$ is the particle form factor appearing in Eq. (4). When interparticle interactions are relatively weak, such as when added salt is present, $S(q)$ is essentially a q -independent constant and the angular dependence of $I(q)$ is determined by $P(q)$, the particle form or shape factor. For the vesicles in this work the approximate Eq. (4) applies fairly well, and a linear increase of $1/I(q)$ is seen when screening is present, such as for the case of DMPG in Hepes shown in Fig. 6. When repulsive correlations are strong, however, such as in the absence of added salt, $S(q)$ is very small at $q = 0$, increases to a maximum value and then decreases. The inverse of $I(q)$ is hence a decreasing function, as seen in the pure water case of DMPG in Fig. 6. The peak in this case is apparently off the high end of the q^2 (or $\sin^2(\theta/2)$) plot. In fact, as has been demonstrated (Krause et al., 1989; Wang and Bloomfield, 1991; Maier et al., 1992) the q for which the peak of $S(q)$ occurs, termed q_p , is given, for very dilute particles of any shape by

$$q_p = 2\pi [C_p N_A / M]^{1/3} \quad (9)$$

where C_p is the concentration in g ml^{-1} and M is the molar mass. For $C_p = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ and $M \sim 10^7$ q_p is $2.45 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$. This is close to the maximum measurable q of the multi-angle laser

predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed symmetric decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

light scattering system, which is $q = 2.5 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$, at $\theta = 145^\circ$. Given that such light scattering maxima are usually quite broad in q , and that there is significant vesicle polydispersity, it would presumably take more dilute solutions to unambiguously identify and measure q_p .

Such scattering peaks, although reminiscent of Bragg peaks in X-ray diffraction cases, are nonetheless quite broad, and have been recently interpreted in terms of liquid-like correlations (Li and Reed, 1991; Morfin et al., 1994; Norwood et al., 1996). There is a fair, but not unanimous consensus, that such scattering behavior reflects dynamic correlations between particles and in no way implies a static, long range ordering of particles. In fact, evidence was recently found that the scattering peaks for such particles remain the same even under high shear flow conditions, further suggesting that no long-range or static structuring is involved (Reed, 1994). A damped, quasi-periodic potential for $U(r)$ in Eq. (8) was recently proposed (Norwood et al., 1996), which gives a good account of the observed scattering. Therefore, there is no reason to suspect any type of long-range ordering in any of the DMPG dispersions.

3.4. Spin label ESR

As is well known, the gel–liquid crystal transition of lipid vesicles, related to an increase in the order/mobility of the hydrocarbon chains, can be monitored by spin labels placed at different positions in the bilayer. Fig. 7 shows the dependence of some EPR parameters with the temperature, using two different labels which give information about different micro-regions of the bilayer, incorporated in DMPG dispersions. The parameters were chosen considering their accuracy and reproducibility at all temperatures, and their sensitivity to temperature and ionic strength variation. The outer hyperfine splitting A_{\max} and the linewidth of the low field line ($m_J = +1$) are the empirical parameters used here. In general, an increase in both the linewidth and A_{\max} is associated with an increase of the label environment viscosity or

packing. Although 12-PCSL in membranes is known to present a large vertical fluctuation (Godici and Landsberger, 1974; Yin et al., 1988), it monitors, on average, a deeper position in the bilayer core than 5-PCSL (Biaggi et al., 1996). The lipid main phase transition is better followed by a spin label down in the bilayer like 12-PCSL, than by 5-PCSL, near the interface. As expected, the two labels show that the main phase transition temperature, T_m , increases with the increase of the sample ionic strength. Although the phase transitions monitored by the spin labels are much less sharp (even for 12-PCSL) than those measured by light scattering, the T_m values are rather similar. However, it is noteworthy that, opposite to the main transition, the post-transition could not be detected by the spin labels used here. Similar results were obtained with SSL (not shown), which monitors the membrane interface.

It has been suggested before that DMPG in pure water produces small discs or shells rather than large bilayer vesicles (Epand and Hui, 1986). However, it is important to note that although the light scattering pattern of DMPG in water is very different from that in Hepes buffer, the hydrocarbon chain packing of the two samples are rather similar for low (10°C) and high (above 25°C) temperatures, as indicated by the ESR parameters of spin labels intercalated in the aggregates (Fig. 7). Moreover, the ESR spectra yielded by 5- and 12-PCSL incorporated in soya lecithin vesicles at 10°C , which are in the liquid crystal state, or in different types of micelles, at the same temperature, are typical of a much more mobile environment (results not shown) than those obtained with DMPG, in Hepes or pure water solution, at 10°C . Therefore, strongly suggesting that, even in pure water, DMPG is organized in bilayers, with highly packed hydrocarbon chains at low temperatures. The light scattering and spin labeling results shown here, together with differential scanning calorimetry and freeze-fracture electron microscopy (Epand and Hui, 1986), would be in accord with the formation of small aggregates which would still keep some bilayer structure, but displaying no sharp phase transition.

Fig. 7. Measured

3.5. Conductivity

To further study the effect of ionic strength on the conductive properties of DMPG in water, differential ionization current measurements were performed in Hepes buffer, in which the ionic strength is reduced compared to that of pure water. The conductivities of

precipitation
decreased
some

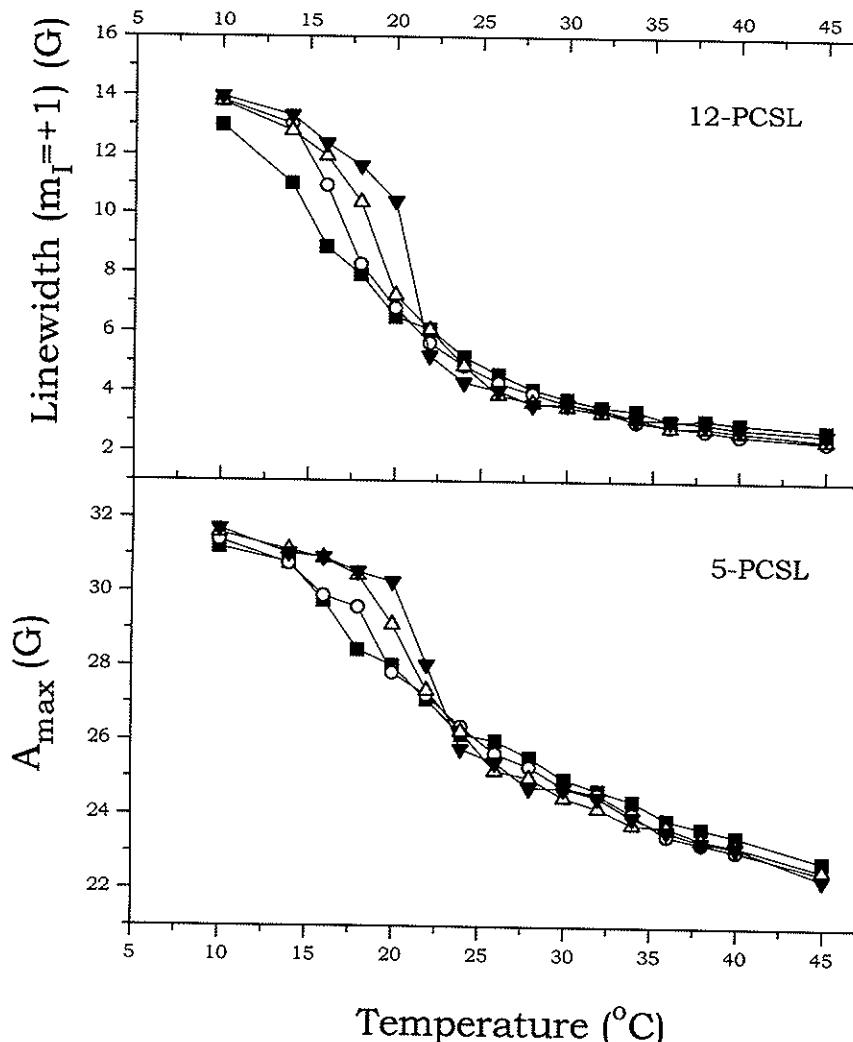


Fig. 7. Measured parameters from ESR spectra of 1 mol% of 12-PCSL and 5-PCSL incorporated in 10 mM DMPG in distilled water (■) and in 10 mM Hepes pH 7.4 with no added salt (○), +10 mM (△) and +100 mM NaCl (▼).

3.5. Conductivity

To further investigate the temperature dependent ionization window suggested by the light scattering experiments, conductimetric measurements were made for 10 mM DMPG dispersion in Hepes buffer. The results are shown in Fig. 8 as a 'reduced' or 'excess conductivity', defined as the difference in conductivity between the DMPG and pure solvent samples, divided by pure solvent conductivity at each temperature. This reduced

conductivity eliminates the effect of mere increased mobility on conductivity with increasing temperature and should reflect changes in concentrations of mobile ions, related to changes in DMPG headgroup ionization. Though the temperature transitions are not sharply indicated, it can be seen that below T_m and above T_{post} the sample conductivity is rather low, as compared to that in between the two transitions. Those results corroborate the discussion made above, in the sense that both the vesicle surface charge and the

predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed general decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

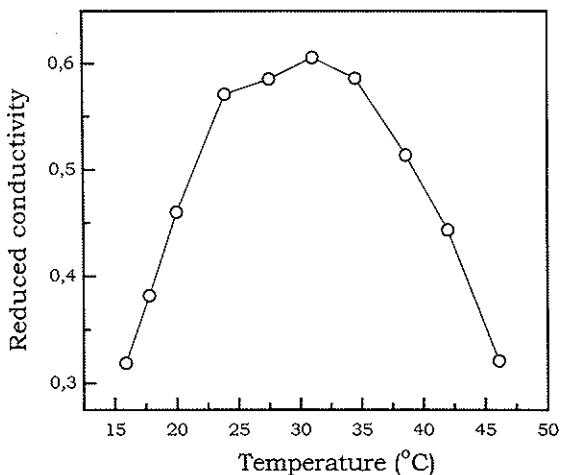


Fig. 8. Reduced conductivity as a function of temperature for 10 mM DMPG in 10 mM Hepes pH 7.4.

related ion concentration in the bulk are higher between the two phase transitions.

4. Discussion

The experimental results presented here suggest that, below T_m , DMPG liposomes have a net attraction, since A_2 is negative. At T_m , for relatively low ionic strength (i.e. below 100 mM), the melting of the hydrocarbon chains, which is known to cause an increase in the area per lipid headgroup, leads to a sharp decrease in the light scattered by the lipid dispersion (scattered intensity typically falls to less than 1/4 its level before the transition). This decrease in scattering is much too large to be accounted for by the relatively modest change in dn/dc (Fig. 3), and is related to a significant decrease in the mass of vesicular aggregates. Moreover, after T_m and below T_{post} , a strong positive A_2 is measured, which indicates a net repulsion among the vesicles, and conductivity increases throughout this range. R_g also appears to increase at the melting transition. The simplest explanation is that below T_m the vesicles are aggregated in clusters, which then fall apart due to a net repulsion above T_m . This net repulsion is likely to be gained by an increased ionization of the vesicles surface, hence increasing its potential.

Above the post-transition temperature, T_{post} , the dispersion scatters as strongly as before T_m , and a large M_w is again measured, with an A_2 value close to zero (either weakly negative or positive). The reduced conductivity also decreases. A possible interpretation here is that there is a recondensation of counterions on the vesicle surface, which lowers the potential and leads to a net attraction, and re-aggregation of the vesicles.

The interpretation that the vesicles are in a disaggregated state in the T_m to T_{post} range is consistent with the increase in viscosity observed by Heimburg and Biltonen (1994) between T_m and T_{post} . Qualitatively, this is rationalized as follows: The total solution viscosity η is given by (Tanford, 1961)

$$\eta = \eta_0(1 + [\eta]C_p + \beta[\eta]^2C_p^2 + \dots) \quad (10)$$

where η_0 is the viscosity of the pure solvent, $[\eta]$ is the intrinsic viscosity of the particle, C_p is the particle concentration in g cm^{-3} , and β is a function of two body hydrodynamic interactions between particles. Since the experiments in this work are in quite dilute solutions it suffices to consider the first two terms in parentheses above. For spheres, intrinsic viscosity is given by

$$[\eta] = \frac{2.5N_A V_H}{M} \quad (11)$$

where V_H is the hydrodynamic volume of the particle. For a unilamellar vesicle the radius of gyration is nearly equal to the hydrodynamic radius so that Eq. (11) can be approximated for dilute solutions as

$$\eta = \eta_0 \left(\frac{1 + 10\pi N_A R_g^3 C_p}{3M} \right) \quad (12)$$

From Table 2 we see that, between the two phase transitions, R_g remains roughly the same, but M decreases. Since C_p , the total surfactant concentration (g ml^{-1}), does not change, solution viscosity should increase when vesicles disaggregate with only minor change in R_g in the T_m to T_{post} regime.

The interaction between two charged vesicles can be described by considering the balance of four forces: the electrostatic double layer repulsion (which is actually entropic (Israelachvili,

1992)); the a very short c steric forces al., 1991).

Focusing double layer association v face of DM tering obse transition co in the area effect on the the vesicle interaction Theoretical solving num al., 1986), considering Gouy–Chap mM (corre buffer, pH per lipid h crystal phas al., 1981).

used was 15 calculated f Na⁺–PG⁻ difficult, as binding of glycerol (T 1976; Cevc 1982), whi tions of Na al., 1979; I Ghazal et Ghazal and 1990), with from 0.1 to lated surfac ciation co important have neglig used here. H⁺ bindin the differen per headgr for a grou

1992)); the attractive van der Waals force and; at very short distance, the repulsive hydration and steric forces (LeNeveu et al., 1977; Parsegian et al., 1991).

Focusing only on the standard electrostatic double layer model, considering H^+ and Na^+ association with the phosphate groups at the surface of DMPG bilayers, the changes in light scattering observed at the main thermal phase transition could be related with the known change in the area per lipid headgroup at T_m , and its effect on the degree of phosphate dissociation, α , the vesicle surface potential Ψ_0 , hence, in the interaction between vesicles (Israelachvili, 1992). Theoretical values for α and Ψ_0 were calculated solving numerically the equation for α (Helm et al., 1986), in the high potential approximation, considering uniformly charged planes in the Gouy–Chapman–Stern model, ionic strength 4 mM (corresponding to DMPG in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4), and 48 and 60 \AA^2 , for the areas per lipid headgroup (f) in the gel and liquid crystal phases, respectively (Marsh, 1974; Watts et al., 1981). The $H^+ - PG^-$ association constant used was 15.8 M^{-1} (Toko and Yamafuji, 1980; or calculated from Watts et al., 1978). The choice of $Na^+ - PG^-$ association constant, K_{Na} , is more difficult, as some authors do not consider the binding of monovalent cations to phosphatidylglycerol (Träuble and Eibl, 1974; Träuble et al., 1976; Cevc et al., 1980; Copeland and Andersen, 1982), whereas there are several different calculations of $Na^+ - PG^-$ in the literature (Eisenberg et al., 1979; Loosley-Millman et al., 1982; Lakhdar-Ghazal et al., 1983; Helm et al., 1986; Lakhdar-Ghazal and Tocanne, 1988; Tocanne and Tessié, 1990), with K_{Na} values varying in a wide range, from 0.1 to 1 M^{-1} . The dependence of the calculated surface potential with the $Na^+ - PG^-$ association constant is plotted in Fig. 9. It is important to point out that large variations of K_H have negligible effect on α or Ψ_0 , in the conditions used here. Moreover, considering only the $PG^- - H^+$ binding, α does not change significantly for the different conditions used here (different areas per headgroup, and ionic strength), as expected for a group in a pH far from its pK value.

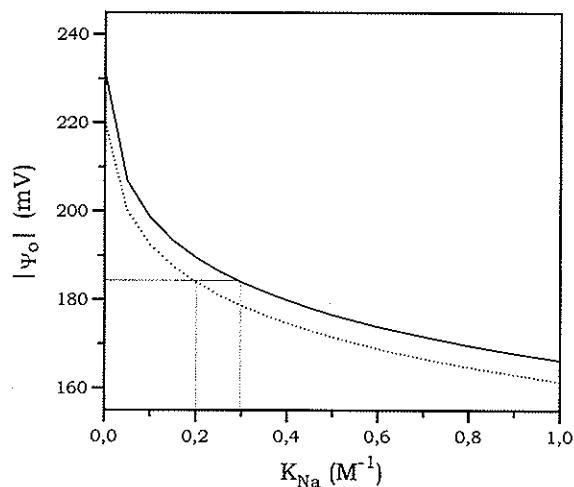


Fig. 9. Dependence of the calculated surface potential (Gouy–Chapman–Stern model) with the $Na^+ - PG^-$ association constant, K_{Na} . The areas per lipid headgroup were 48 \AA^2 (—) and 60 \AA^2 (···), corresponding to the gel and liquid crystal phases, respectively. Ionic strength was 4 mM and $K_H = 15.8 \text{ M}^{-1}$.

Fig. 9 shows that assuming the same K_{Na} for the gel and liquid crystal phases, independent of its value, the magnitude of the surface potential is always lower after T_m ($f = 60 \text{ \AA}^2$) than before ($f = 48 \text{ \AA}^2$). That would not be in accord with the experimental data shown here, which indicate that there is an increase in the vesicles repulsion on the main thermal transition. Therefore, it is necessary to assume that the more fluid DMPG phase has a lower Na^+ binding constant than the gel phase. For instance, if K_{Na} is assumed to be 0.3 M^{-1} for the gel phase¹, the K_{Na} value for the liquid crystal phase would have to be lower than 0.2 M^{-1} , to result in a more negative Ψ_0 after T_m (see Fig. 9).

Also important to be considered is the conductivity experimental data (Fig. 8), showing that there is an increase in the amount of ions in solution after T_m . The model used here shows that for $K_{Na} = 0 \text{ M}^{-1}$ there is no significant increase in the degree of PG dissociation upon the gel–liquid

¹ it is interesting to note that considering $K_{Na} = 0.3 \text{ M}^{-1}$, and the Gouy–Chapman–Stern model, it is possible to calculate a surface potential very similar to that measured by Cevc et al. (1980) for DMPG in 100 mM salt (99 mV), in the gel phase

predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed general decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

crystal transition. The variation in α increases with the increase of K_{Na} (results not shown). For instance, for $K_{\text{Na}} = 0.3 \text{ M}^{-1}$ for the two phases, there is a 12% increase in α value upon the transition, with the corresponding increase in the amount of ions in solution. If it is assumed K_{Na} values of 0.3 and 0.1 M^{-1} , for the gel and liquid crystal phases, respectively, the more fluid phase would be 48% more ionized than the gel state. About the possible dependence of K_{Na} on the area per lipid headgroup, it could be speculated that the amount of bound counterion is a function of the packing of the lipids, water organization and/or local dielectric constant dependent on temperature or surface undulations. Although in a different system, it is interesting to point out that Loosley-Millman et al. (1982) suggested that the binding of Na^+ ions to negatively charged bilayers might increase as the bilayers are pushed together, possibly related to their electric fields perturbing the conformation of neighboring polar groups.

If the above model is applied to DMPG in pure water (ionic strength 0.0025 mM and $f = 48 \text{ \AA}^2$), a very low degree of PG dissociation is found, $\alpha = 0.12$, in accord with experiments with DMPG monolayers (Tocanne et al., 1974; Sacré and Tocanne, 1977). However, due to the low ionic strength, even with the low vesicle surface charge, the magnitude of the surface potential is rather high, $\Psi_0 = -313 \text{ mV}$, which could be responsible for a great repulsion among vesicles. That would explain the observed strong interparticle correlation effect with DMPG in water (Fig. 6), and the DSC results obtained by Epand and Hui (1986).

The mechanism that could cause the counterions recondensation at T_{post} , for DMPG in Hepes buffer, is more difficult to be understood, as the possible post-transition structural changes are unknown, and could not be monitored by spin labels placed in the lipid bilayer.

Very simple considerations on the low scattering window between T_m and T_{post} have been presented here. We wanted to point out that it is necessary to have a lower K_{Na} value in that temperature region in order to obtain a certain minimum increase in surface potential, which would cause the aggregated vesicles to repel strongly

enough to disaggregate. However, in order to get a negative value for A_2 , there must be attractive intervesicle forces. The origin of these, if any exist besides the standard van der Waals dipole forces, is not clear. An alternative to the above hypothesis would be that at T_m the attractive forces are lost and net repulsion takes over, i.e. the increase in conductivity and surface ionization does not necessarily cause the aggregated vesicles to separate, but rather the loss of attractive forces. In this alternative, above T_{post} the attractive forces reappear and the vesicles re-aggregate. On the other hand, the hydration forces could also play an important role in the inter-vesicle interactions.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq and FINEP. CNPq fellowships for KAR and MTLF. (research) are acknowledged. We are grateful to Dr V.B. Henriques and to Dr C. Goldman for very helpful discussions, and to Dr S. Schreier for making the ESR spectrometer available. WFR acknowledges travel support from FAPESP and SBBo.

References

- Biaggi, M.H., Pinheiro, T.J., Watts, A., Lamy-Freund, M.T., 1996. Spin label and $^2\text{H-NMR}$ studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.* 24, 251–259.
- Cevc, G., Watts, A., Marsh, D., 1980. Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered-fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers. *FEBS Lett.* 120 (2), 267–270.
- Cevc, G., Watts, A., Marsh, D., 1981. Titration of the phase transition of phosphatidylserine bilayers membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration. *Biochemistry* 20, 4955–4965.
- Conway, B.E., 1981. Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics. Elsevier, Amsterdam.
- Copeland, B.R., Andersen, H.C., 1982. A theory of effects of protons and divalent cations on phase equilibria in charged bilayer membranes: Comparison with experiments. *Biochemistry* 21, 2811–2820.
- Disalvo, E.A., 1991. Optical properties of lipid dispersions induced by permeant molecules. *Chem. Phys. Lipids* 59, 199–206.
- Eisenberg, M., 1992. Adsorption containing n. *J. Phys. Chem.* 96, 5223.
- Epand, R.M., 1992. On the morphology of phospholipid vesicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 1–20.
- Epand, R.M., 1992. Formation of glycerol. *Biochemistry* 31, 1133–1139.
- Gershfeld, N.L., 1992. Equilibrium study of the interaction of phospholipid vesicles with proteins. *Discuss. Colloid Sci.* 93, 1–10.
- Godici, P.E., 1992. Liquid-crystalline study using fluorescence polarization. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 21–39.
- Heimburg, T., 1992. Interaction of dimyristoylphosphatidylserine with cytochrome c. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 41–59.
- Helm, C.A., 1992. Electrostatic interactions in liquids. *Influence of the environment*. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46–55.
- Israelachvili, J.N., 1992. Liquids. *In: Intermolecular Forces*. Academic Press, London, pp. 1–100.
- Jähnig, F., 1992. Phase transitions in phospholipid bilayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 31–40.
- Kodama, M., 1992. Cylindrical micelles of phosphatidylglycerol. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 11–20.
- Kraayenhof, P., 1992. Membrane properties revealed by spin labeling. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 21–39.
- Krause, R., 1992. Surface tension of phospholipid solutions on a microscale. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 111–147.
- Lakhdar-Ghazouani, 1992. Effect of the state of phospholipid membranes on the adsorption of dimannosyldiacylglycerol. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 19–27.
- LeNeveu, D.M., 1977. Measurement of the lecithin bilayer thickness. *Biochemistry* 16, 103–107.
- Li, X., Reed, W., 1992. Glycan moieties in membrane proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 46, 109–128.
- Loosley-Millman, 1982. Effects of ionic strength on the interaction of phospholipid vesicles with proteins. *Adv. Colloid Interface Sci.* 21, 19–27.

- Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., McLaughlin, S., 1979. Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry* 18, 5213–5223.
- Epand, R.M., Hui, S.W., 1986. Effect of electrostatic repulsion on the morphology and thermotropic transitions of anionic phospholipids. *FEBS Lett.* 209 (2), 257–260.
- Epand, R.M., Gabel, B., Epand, R.F., Sen, A., Hui, S.W., 1992. Formation of a new stable phase of phosphatidylglycerol. *Biophys. J.* 63, 327–332.
- Gershfeld, N.L., Stevens Jr, W.F., Nossal, R.J., 1986. Equilibrium studies of phospholipids bilayer assembly. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81, 19–28.
- Godici, P.E., Landsberger, F.R., 1974. The dynamic structure of lipid membranes. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study using spin labels. *Biochemistry* 13, 362–368.
- Heimburg, T., Biltonen, R.L., 1994. Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33, 9477–9488.
- Helm, C.A., Laxhuber, L., Lösche, M., Möhwald, H., 1986. Electrostatic interactions in phospholipid membranes. I: Influence of monovalent ions. *Colloid Polym. Sci.* 264, 46–55.
- Israelachvili, J., 1992. Electrostatic forces between surfaces in liquids. In: *Intermolecular and Surface Forces*. Academic Press, London, pp. 213–259.
- Jähnig, F., 1976. Electrostatic free energy and shift of the phase transition for charged lipid membranes. *Biophys. Chem.* 4, 309–318.
- Kodama, M., Miyata, T., Yokoyama, T., 1993. Crystalline cylindrical structures of Na^+ -bound dimyristoylphosphatidylglycerol as revealed by microcalorimetry and electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1168, 243–248.
- Kraayenhof, R., Sterk, G.J., Sang, H.W.W.F., Krab, K., Epand, R.M., 1996. Monovalent cations differently affect membrane surface properties and membrane curvature, as revealed by fluorescent probes and dynamic light scattering. *Biochim. Biophys. Acta* 1282, 293–302.
- Krause, R., Maier, E.E., Deggelmann, M., Hagenbuchle, M., Schulz, S.F., Weber, R., 1989. Static light scattering by solutions of salt-free polyelectrolytes. *Physica A* 160, 135–147.
- Lakhdar-Ghazal, F., Tichiadou, J.L., Tocanne, J.F., 1983. Effect of pH and monovalent cations on the ionization state of phosphatidylglycerol in monolayers. *Eur. J. Biochem.* 134, 531–537.
- Lakhdar-Ghazal, F., Tocanne, J.F., 1988. Modulation of the adsorption of alkaline cations to phosphatidylglycerol by a dimannosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 943, 19–27.
- LeNeveu, D.M., Rand, R.P., Parsegian, V.A., Gingell, D., 1977. Measurement and modification of forces between lecithin bilayers. *Biophys. J.* 18, 209–230.
- Li, X., Reed, W.F., 1991. Polyelectrolyte properties of proteoglycan monomers. *J. Chem. Phys.* 94, 4568–4580.
- Loosley-Millman, M.E., Rand, R.P., Parsegian, V.A., 1982. Effects of monovalent ion binding and screening on measured electrostatic forces between charged phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 40, 221–232.
- Maier, E.E., Krause, R., Deggelmann, M., Hagenbuchle, M., Weber, R., Fraden, S., 1992. Liquidlike order of charged rodlike particle solutions. *Macromolecules* 25, 1125–1133.
- Marsh, D., 1974. An interaction spin label study of lateral expansion in dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 363, 373–386.
- McLaughlin, S., 1977. Electrostatic potentials at membrane–solution interfaces. *Curr. Top. Membr. Transp.* 9, 71–144.
- Morfin, I., Reed, W.F., Rinaudo, M., Borsali, R., 1994. Further evidence of liquid-like correlations in polyelectrolyte solutions. *J. Phys. II France* 4, 1001–1035.
- Norwood, D.P., Benmouna, M., Reed, W.F., 1996. Static light scattering from mixtures of polyelectrolytes in low ionic strength solutions. *Macromolecules* 29, 4293–4304.
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., Fuller, N.L., 1991. Direct osmotic stress measurements of hydration and electrostatic double-layer forces between bilayers of double-chained ammonium acetate surfactants. *J. Phys. Chem.* 95, 4777–4782.
- Reed, W.F., 1994. A conformational interpretation for the peak of reduced viscosity for polyelectrolytes at low ionic strength. *J. Chem. Phys.* 100, 7825–7827.
- Sacré, M.M., Tocanne, J.F., 1977. Importance of glycerol and fatty acid residues on the ionic properties of phosphatidylglycerols at the air-water interface. *Chem. Phys. Lipids* 18, 334–354.
- Salonen, I.S., Eklund, K.K., Virtanen, J.A., Kinnunen, P.K.J., 1989. Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of *sn*-1' and *sn*-3' stereoisomers of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 205–215.
- Tanford, C., 1961. *The Physical Chemistry of Macromolecules*. Wiley, New York.
- Tocanne, J.F., Ververgaert, P.H.J.T., Verkleij, A.J., van Deenen, L.L.M., 1974. A monolayer and freeze-etching study of charged phospholipids. I. Effects of ions and pH on the ionic properties of phosphatidylglycerol and lysophosphatidylglycerol. *Chem. Phys. Lipids* 12, 201–219.
- Tocanne, J.F., Tessié, J., 1990. Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 111–142.
- Toko, K., Yamafuji, K., 1980. Influence of monovalent and divalent cations on the surface area of phosphatidylglycerol monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 26, 79–99.
- Träuble, H., Eibl, H., 1974. Electrostatic effects on lipid phase transitions: Membrane structure and ionic environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 214–219.
- Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P., Eibl, H., 1976. Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. *Biophys. Chem.* 4, 319–342.
- Wang, L., Bloomfield, V.A., 1991. Small-angle scattering of semidilute rodlike DNA solutions: polyelectrolyte behavior. *Macromolecules* 24, 5791–5795.

predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed general decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

- Watts, A., Harlos, K., Maschke, W., Marsh, D., 1978. Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochim. Biophys. Acta* 510, 63–74.
- Watts, A., Harlos, K., Marsh, D., 1981. Charge-induced tilt in ordered-phase phosphatidylglycerol bilayers. Evidence from X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 91–96.
- Yi, P.N., MacDonald, R.C., 1973. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 11, 114–134.
- Yin, J.J., Feix, J.B., Hyde, J.S., 1988. Solution of the nitroxide spin-label spectral overlap problem using pulse electron spin resonance. *Biophys. J.* 53, 525–531.
- Zhang, Y.P., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 1997. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behaviour of the *n*-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 72, 779–793.
- Zimm, B.H., 1948. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *J. Chem. Phys.* 16, 1093–1116.

PROBING

Karin A. Riske

^a Institut für^b Instituto de^c Department

Running title

Key words:

Correspondence

Abstract

A trimethylated sugar was used to directly compare recent sugar surface pressure measurements. The temperature dependence of aqueous interfacial transition spectra was measured at a higher concentration of sugar. The spectra were compared with surface pressures measured at 1 mole/tot. The pressure is zero even though the sugar predicts a decrease in surface pressure somewhat.

PROBING DMPG AGGREGATE SURFACE WITH A CATIONIC AQUEOUS SOLUBLE SPIN LABEL

Karin A. Riske ^a, Otaciro R. Nascimento ^b, Miroslav Peric ^c, Barney L. Bales ^c and M. Teresa Lamy-Freund ^a

^a Instituto de Física, Universidade de S. Paulo, CP 66318, CEP 05315-970, S. Paulo, SP, Brazil

^b Instituto de Física de S. Carlos, Universidade de S. Paulo, CP 780, CEP 13560-970, S. Carlos, SP, Brazil

^c Department of Physics and Astronomy, California State University at Northridge, Northridge, CA 91330

Running title: Aqueous soluble spin label probing DMPG

Key words: DMPG, spin label, phase transition, surface potential

Correspondence to: M. Teresa Lamy-Freund

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, CP 66318,
CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil.

Tel: 5511 818 6829; FAX: 5511 813 4334
Email: MTFREUND@FGE.IF.USP.BR

Abstract

A small, highly aqueous soluble, deuterated, cationic spin label, 4-trimethylammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-d₁₇-1-oxy iodide (dCAT1), was used to directly monitor the negatively charged DMPG aggregate surface in order to test a recent suggestion (Riske et al., 1997, *Chem. Phys. Lipids.* 89:31-44) that alterations in the surface potential accompanied apparent phase transitions observed by light scattering. The temperature dependence of the label partition between the lipid surface and the aqueous medium indicated an increase in the surface potential at the gel to liquid-crystal transition, supporting the previous suggestion. Results at the phase transition occurring at a higher temperature were less definitive. Although some change in the dCAT1 ESR spectra was observed, the interpretation of the phenomena is still rather unclear. DMPG surface potentials were estimated from the dCAT1 partition ratios (bound label moles/total label moles), using a simple two sites model, where the electrostatic potential is zero everywhere but at the aggregate surface, and the interaction between the spin label and the membrane surface is strictly electrostatic. The Gouy-Chapman-Stern model predicts surface potentials similar to those observed as well as the observed general decrease in the surface potential with ionic strength, although the observed decrease is somewhat steeper than that predicted by the model.

1. Introduction

Considering that under physiological conditions most of the cell membranes have a negative net charge, due to the dominance of negative lipids headgroup, anionic phospholipids have been widely used as model systems for biological membranes. The charged character of the lipids is rather important in many of the membrane roles, for instance, hormone and protein binding, the selectivity of protein or peptide - lipid interaction, and the macromolecule conformation inside the bilayer (see, for instance, Gennis, 1989). Phosphatidylglycerol is the most abundant anionic phospholipid present in prokaryotic cell membranes, having been extensively studied as a charged model membrane (Watts et al., 1978; Seelig et al., 1987; Heimburg and Biltonen, 1994; Biaggi et al., 1997), presenting some properties similar to those of the ubiquitous phosphatidylcholine, with the same acyl chains, under physiological conditions (Watts et al., 1978; Watts and Marsh, 1981; Epand et al., 1992).

On the other hand, the thermotropic behavior of DMPG dispersions at different conditions of pH, ionic strength, lipid concentration and time of incubation at a certain temperature (Watts et al., 1978; Epand and Hui, 1986; Gershfeld et al., 1986; Salonen et al., 1989; Epand et al., 1992; Kodama et al., 1993; Heimburg and Biltonen, 1994, Riske et al., 1997; Zhang et al., 1997), has revealed itself to be a very rich and interesting field of physicochemical research. Although biological membranes are composed of many different lipids, the lipid phase separations that are likely to occur physiologically, could create domains where the structural properties of a given lipid might be fundamental to a certain biological function.

In a range of ionic strength, freshly prepared dispersions of DMPG were found to present two different phase transitions, between 5 °C and 45 °C: the well known gel to liquid-crystal transition at T_m , and another one, called the post-transition, at T_{post} . Both transitions could be clearly observed by 90° light scattering (Riske et al., 1997) and differential scanning calorimetry (DSC) (Salonen et al., 1989). In previous work (Riske et al., 1997), it was suggested that, at least at T_m , the decrease in light scattering could be due to an increase in the surface electrostatic potential of the DMPG aggregates upon the thermal phase transition. Hence, among the different forces that act between two charged vesicles, the increase in the electrostatic double layer repulsion would be the triggering factor responsible for the low scattering window observed between T_m and T_{post} . Accordingly, a simple Gouy-Chapman-Stern model was put forward for the main transition, considering that the melting of the hydrocarbon chains could change both the area per lipid headgroup and the $\text{Na}^+ - \text{PG}^-$ association constant, therefore modifying the electrical surface potential of the DMPG aggregate. The phenomena occurring at T_{post} was more difficult to understand, as there was no indication of any microscopic structural change at that temperature (Riske et al., 1997).

In an effort to understand better the role of surface electrostatics in the phase transition of DMPG aggregates, in the present paper a small, highly aqueous soluble, deuterated, cationic spin label, dCAT1, was used to directly monitor the negatively charged DMPG aggregate surface. This strategy is based on those used for calculating surface potential with amphiphilic fluorescent or spin probes (Castle and Hubbel, 1976; Hartsel and Cafiso, 1986; Khramtsov et al., 1992; Franklin et al., 1993; Epand et al., 1996; Krasnowska et al., 1998), but probing the physicochemistry of biological membranes from the "outside". Such a strategy provides an alternative view and most likely perturbs the membrane less than a probe incorporation into the membrane. Further, as a practical matter, many lipid soluble probes yield ESR spectra too

immobilized to yield precise data.

Deuteration of the label reduces the unresolved hyperfine structure (Bales, 1989), making the spectral analysis and fitting more accurate. The temperature dependence of the partitioning of the label between the lipid surface and the aqueous medium was analyzed for various ionic strengths. The membrane partition ratio (bound label moles/total label moles) and the ESR spectra parameters for the dCAT1 in DMPG dispersions were compared with those obtained with the same spin label in sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles.

Based on a simple two sites model, assuming that electrostatics dominate the interactions between the spin label and DMPG, partition ratios were used to calculate the lipid aggregate electrostatic surface potential. The values so calculated are compared with those yielded by the Gouy-Chapman-Stern model.

2. Materials and methods

2.1 Materials - The sodium salt of the phospholipid DMPG (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, lot# 140PG-115) and the spin label 16-PCSL (1-palmitoyl-2-(16-doxylo stearoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA). The deuterated spin label dCAT1 (4-trimethylammonium-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-d₁₇-1-oxyl iodide) was purchased from CDN Isotopes (Quebec, Canada). SDS (sodium dodecyl sulfate) was from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). If not stated otherwise, the buffer system used was 10 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) adjusted with NaOH to pH 7.4. The ionic strength was calculated and measured to be 4 mM. Mille-Q Plus water (Millipore), pH 5.6, was used throughout.

2.2 - Lipid dispersion preparation. A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids, dried under a stream of N₂ and left under vacuum for a minimum of 2 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the desired buffer or water solution, with or without added salt, followed by vortexing above the phase transition temperature. For the ESR measurements, 0.1 mM of dCAT1 was added to the aqueous solution where the lipid dispersion was suspended, resulting in the exposure of all the DMPG aggregate surface to the spin label.

2.3 - 90° light scattering. A fluorimeter Hitachi F-3010 at a wavelength of 280 nm was used. The temperature was maintained with an external water bath Forma Scientific 2006, and measured with a Fluke 51 K/J thermometer placed inside the cuvette. For both light scattering and ESR, the experimental results shown here were obtained by varying the temperature from the higher to the lower value, and leaving the sample for at least 5 minutes at each temperature. Nevertheless, both experiments were found to be reversible, and identical results were obtained by increasing the temperature.

2.4 - ESR spectroscopy. ESR measurements were performed with a Bruker EMX spectrometer. A field-modulation amplitude of 0.7 G and microwave power of 5 mW were used. This modulation amplitude broadened only the Gaussian component of the ESR line as expected (Bales et al., 1998). The temperature was controlled to about 0.2 °C with a Bruker BVT-2000 variable temperature device. The temperature was always monitored with a Fluke 51 K/J thermometer with the probe placed just above the cavity. The magnetic field was measured with a Bruker ER 035 NMR Gaussmeter, and the

spectra were converted to a g-value scale with the WINEPR software (Bruker). Most of the spectra shown here are aligned by the g-value. The spectral parameters were found by fitting each line to a Gaussian-Lorentzian sum function (Halpern et al., 1993) taking advantage of the fact that the sum function is an accurate representation of a Gaussian-Lorentzian convolution, the Voigt function (Bales, 1989). The hyperfine splitting, a_0 , was taken to be one-half the difference in the resonance fields of the high- and low-field lines. The intrinsic (Lorentzian) linewidths and the line heights were determined from the fits (Bales, 1989). Spectral subtractions were done using the WINEPR software (Bruker). The data shown in Figs. 4, 7, and 8 are results from at least three experiments with samples prepared at different times. In each experiment, two spectra were taken at each temperature and for each of these, two different subtractions of the type illustrated in Figs. 3 and 5 were carried out. The values are unweighted means of all of the results and the uncertainties are the standard deviations. When not shown (all data in Fig. 9 and some points in the other figures) the uncertainties are about the size of the symbols.

2.5 Surface potential calculation - Based on Castle and Hubbell (1976), a very simple two sites model will be used here, where the spin label can be either in the aqueous phase, or close to the aggregate surface, with chemical potentials, in the ideal gas approximation, given by

$$\mu_{\text{sol}} = \mu^{\circ}_{\text{sol}} + kN_A T \ln(X_{\text{sol}}) \quad \text{and} \quad \mu_{\text{surf}} = \mu^{\circ}_{\text{surf}} + kN_A T \ln(X_{\text{surf}}) + ZeN_A \Psi_{\text{surf}}$$

where the parameters μ° , k , N_A , T , Ze , X_{sol} and X_{surf} , mean the standard chemical potential, the Boltzmann constant, the Avogadro's constant, the absolute temperature, the spin label charge ($Z = 1$), and the mole fractions of the spin label in the aqueous medium and at the aggregate surface, respectively. In our two sites model, the electrostatic potential is zero everywhere but at the aggregate surface, where the mean-field surface potential is $\Psi_{\text{surf}} = \Psi_o$. Assuming that there are no specific molecular interaction between the spin labels and the membrane surface, $\mu^{\circ}_{\text{sol}} = \mu^{\circ}_{\text{surf}}$ as only the electrostatic interaction will be considered here.

At equilibrium, $\mu_{\text{sol}} = \mu_{\text{surf}}$, so,

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln\left(\frac{X_{\text{surf}}}{X_{\text{sol}}}\right)$$

Considering that $X_{\text{surf}}/X_{\text{sol}} \approx (\text{bound label moles/volume surface})/(\text{free label moles/volume solution}) = (P/(1-P)) (V_{\text{sol}}/V_{\text{surf}})$, where P is the calculated dCAT1 membrane partition ratio, namely (bound label moles)/(total label moles).

$$\Psi_o = -\frac{kT}{e} \ln\left(\frac{P}{1-P} \frac{V_{\text{sol}}}{V_{\text{surf}}}\right) \quad (1)$$

It will be assumed that $V_{\text{sol}} \approx V_{\text{total}}$, $V_{\text{surf}} = (A.N.h)$, where A is the area per lipid headgroup, N is the total number of lipids in V_{total} , and h is the thickness of the thin shell surrounding the lipids where dCAT1 can reside.

2.6 - Gouy-Chapman-Stern model - The Gouy-Chapman-Stern electrostatic double layer theory (see, for instance, Evans and Wennerström, 1994) considers the electrostatic surface potential of a uniformly distributed infinite charged plane, with a surface charge density $\sigma = e\alpha/A$, where e is the elementary charge, α is the degree of DMPG dissociation

and A is the area per lipid headgroup. Here, the degree of DMPG dissociation will depend on the $\text{PG}^- - \text{H}^+$ and $\text{PG}^- - \text{Na}^+$ binding constants:

$$K_H = \frac{[\text{PGH}]}{[\text{PG}^-][\text{H}^+]_o} \quad K_{\text{Na}} = \frac{[\text{PGNa}]}{[\text{PG}^-][\text{Na}^+]_o}$$

where $[]$ refers to molar concentrations, and $[]_o$ to molar concentrations at the lipid aggregates surface. The latter can be estimated through the Boltzmann distribution:

$$[\text{H}^+]_o = [\text{H}^+]_\infty e^{-\frac{e\Psi_o}{kT}}$$

where $[\text{H}^+]_\infty$ is the proton concentrations at the bulk, k is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, and Ψ_o is the electrostatic surface potential. $[\text{Na}^+]_o$ can be calculated by a similar expression.

So,

$$\alpha = \frac{[\text{PG}^-]}{[\text{PG}^-] + [\text{PGH}] + [\text{PGNa}]} = \frac{1}{1 + (K_H [\text{H}^+]_o + K_{\text{Na}} [\text{Na}^+]_o) e^{-\frac{e\Psi_o}{kT}}} \quad (2)$$

The surface potential, in the Gouy-Chapman high potential approximation, (Evans and Wennerström, 1994), in MKS units, is written as:

$$\Psi_o^{\text{GCS}} = -\frac{kT}{e} \ln \left(\frac{e^2}{2 \times 10^3 \epsilon \epsilon_o k T N_A} \frac{\alpha^2}{A^2 n} \right) \quad (3)$$

where ϵ is the medium dielectric constant, ϵ_o is the permittivity of free space, and n is the bulk ionic strength (in mol/l). Using Eqs. (2) and (3) we obtain an expression for α , that can be solved numerically:

$$\beta \alpha^3 + \alpha - 1 = 0 \quad (4)$$

with

$$\beta = \frac{e^2}{2 \times 10^3 \epsilon \epsilon_o k T N_A A^2} \left(K_{\text{Na}} \frac{[\text{Na}^+]_o}{n} + K_H \frac{[\text{H}^+]_o}{n} \right)$$

3. Results

Fig. 1 shows typical profiles of the temperature dependence of the 90° light scattered by DMPG dispersions at different ionic strengths. Although the profiles shown here are similar to those presented in a previous paper (Riske et al., 1997), it is interesting to point out that whereas the DMPG main transition temperatures were identical to those found before, T_{post} was found to be dependent on the lipid batch used. With the DMPG batch used in the present paper it was necessary to add 2 mM NaCl to the dispersions in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4, to obtain a well defined post-transition (Fig. 1), very similar to that previously obtained with the lipid in pure Hepes buffer (Riske et al., 1997). The strong dependence on the DMPG batch could possibly be related to a crucial dependence of T_{post} on the concentration of ions present in solution, which would be in accord with the large variation in T_{post} with the sample ionic strength. (The data shown in Fig. 1 were obtained in the presence of 0.1 mM dCAT1, but very similar results were obtained without the spin label, indicating that no significant variation was detected by the presence of the small additional concentration of ions due to the charged label).

Fig. 2 compares dCAT1 ESR spectra obtained with the label in buffer, at three different temperatures (identical spectra were obtained in pure water), with those yielded by the label in the presence of 10 mM DMPG in water, and in buffer with 2 mM NaCl.

For the latter sample, these temperatures correspond to lipid dispersions below T_m (10°C), between T_m and T_{post} (30°C) and above T_{post} (45°C). It is interesting to note that below T_m the spectra of dCAT1 in buffer (or water) and DMPG-buffer are rather similar while the spectrum in DMPG-water is somehow different. Above T_m (30° and 45°) the dCAT1 spectra in either DMPG-water or DMPG-buffer clearly indicate the presence of more than one ESR signal. One of the component signals is identical to the signal observed in buffer which we refer to as "free" component.

In Fig. 3, a typical spectrum, labeled "composite spectrum" is shown in greater detail in the top trace. The composite spectrum is decomposed into two components in the lower two traces of Fig. 3 by subtracting a weighted "free" spectrum. The weight of the free signal was varied until the resulting spectrum looked like a one component signal and could be well fitted by a Voigt line shape (Bales, 1989). This subtraction proceeds by trial and error, judging by eye the quality of the resultant spectrum; however, the fidelity of the spectrum is judged by the fact that the doubly-integrated intensities and Gaussian linewidths of each of the three lines are required to be the same (Bales, 1989). The fact that two well separated spectra are obtained shows that the exchange rate between the two respective sites is slow on the ESR time scale. In the simple two sites model assumed here, the resulting spectrum (the bottom one in Fig. 3) is yielded by the population of spin label close to the DMPG surface, henceforth called bound dCAT1. Decompositions of spectra into free and bound components were carried out for DMPG samples with different ionic strengths, at temperatures between $5 - 45^{\circ}\text{C}$, and, whenever possible, dCAT1 membrane surface partition ratios ($P = \text{bound label moles} / \text{total label moles}$) were calculated from the double integral of the ESR signals (Fig. 4). The values are compared to those obtained with dCAT1 in the 12.1 mM SDS in water system¹ (Fig. 5 shows the dCAT1 composite and subtracted spectra in SDS, at 25°C). The partition ratios calculated for temperatures below 17°C for DMPG-water, and 20°C for DMPG-buffer at the various salt concentrations are not very accurate, due to the similarity between the bound and free components of the ESR spectra, and should be regarded as minimum possible values. Yet, there is a clear tendency of migration of the cationic spin label to the DMPG aggregates surface above T_m , as compared to the roughly constant value obtained for SDS at all temperatures. A decrease of the dCAT1 membrane partitioning with an increase in the sample ionic strength can also be observed in Fig. 4. For DMPG-buffer with 100 mM NaCl, at all temperatures, the dCAT1 spectra were identical, within experimental error, to the free spectrum; that is no bound label could be detected (spectra not shown).

For each ionic strength, partition ratios could be calculated up to a certain temperature, after which no simple decomposition could be obtained. This upper limit is the point at which data cease in Fig. 4; around 35°C , 30°C and 25°C , for the 2, 5 and 10 mM NaCl samples, respectively. Fig. 6 shows some attempts to decompose spectra at 35 and 40°C . At 35°C the bound spectra of DMPG-water, DMPG-buffer, and DMPG-buffer + 2 mM NaCl could be attributed to a single ESR signal, whereas for higher ionic strengths they could not. The resulting ESR spectra are more complex, indicating the presence of, at least, two different components. At 40°C , not even the spectrum in

¹ 12.1 mM was a very convenient SDS concentration, as the spin label partitioned between the aqueous medium and the micellar surface. For SDS concentrations above 50 mM no free label could be detected. At 12.1 mM of SDS, in average, 8 mM is free and 4.1 mM is arranged in micelles (Quina et al., 1995). It is important to note that dCAT1 in SDS samples bellow the CMC (around 8 mM), yielded ESR spectra identical to those obtained in pure aqueous solution (results not shown), showing that there is no label binding to SDS monomers or pre-micellar aggregates.

DMPG-buffer + 2 mM NaCl could be decomposed in one free and one bound component (Fig. 6). It is important to mention that, for each ionic strength, the number of bound spin labels (calculated from the second integral of the subtracted spectra) remained roughly unchanged for all temperatures above T_m , despite the complexity of the signal. Interestingly, the limiting temperatures for successful decomposition, were rather similar to the post-transition temperatures, for the different DMPG samples (see Fig. 1). These results might be a coincidence, or might be an indication of some kind of change at the DMPG aggregate surface at T_{post} , which is not yet understood.

Whenever a successful spectral decomposition was possible, the dCAT1 bound signal was least-squares fit to a Voigt line shape and the parameters analyzed according to Bales (1989) and Marsh (1989), to yield isotropic hyperfine splitting values (a_0) and correlation times, parallel and perpendicular to the molecular symmetry axis (τ_{\parallel} and τ_{\perp}). The same procedures were applied to spectra observed in SDS micelles. Figs. 7 and 8 compare the hyperfine splittings and correlation times for the free component as well as the bound component in different DMPG and SDS samples. The calculated τ_{\parallel} values for all samples are not shown in Fig. 8 because they were found to be small, similar to the τ_{\perp} values obtained for free dCAT1, at all temperatures.

It is interesting to use the well known dependence of the hyperfine interaction parameter of nitroxyl radicals on polarity, to compare the a_0 values and correlation times for dCAT1 in the several DMPG systems and SDS micelles. For the lipid samples, below T_m , the spin label is localized in a region with a dielectric constant very similar to that of bulk water (Fig. 7), although its movement is somewhat more restricted, as indicated by the slightly higher τ_{\perp} values for the DMPG samples (Fig. 8). Upon the main lipid transition, there is a significant increase in the dCAT1 τ_{\perp} values for all DMPG samples, indicating that the label interacts more strongly with the aggregate surface, possibly by residing deeper within the aggregate. Such a relocation could be due to a less packed membrane surface above T_m and would be in accord with the decreasing values of a_0 above T_m since the deeper penetration of the label would locate it in a region of diminished polarity. In SDS micelles, the a_0 values (Fig. 7) show only a minor decrease with temperature so the dielectric constant of the microenvironment where dCAT1 is localized does not change much with temperature. The bound dCAT1 in SDS micelles is generally in a less polar microenvironment than the bound label in DMPG aggregate; the only exception being DMPG-water at high temperature. The perpendicular correlation times (Fig. 8), in all DMPG systems, are much larger than they are in SDS, indicating a significantly higher degree of spin label immobilization at the DMPG aggregates surface as compared to SDS micelles.

The dielectric constant of the site where the spin label is localized can be estimated by comparing the obtained a_0 values with those yielded by the label in different mixtures of methanol/water. Fig. 9 shows the isotropic hyperfine constants calculated by the fitting of the dCAT1 ESR signals in different media, recorded at 25 °C, as a function of the polarity index H (Mukerjee et al., 1982). The latter is defined as the ratio of the volume concentration of OH groups to that in water (55.4 mol/L) and calculated for the different mixtures of methanol/water used. The polarity index H shows (Mukerjee et al., 1982) an excellent linear correlation to other measures of polarity, for example, the dielectric constant. The corresponding dielectric constants for the sites monitored by the bound dCAT1, at 25 °C in DMPG ($a_0 = 16.37$ G, H = 0.77) and in SDS ($a_0 = 16.13$ G, H = 0.63), can be estimated (Mukerjee et al., 1982) to be around 60 and 49, respectively.

4. Discussion

Considering that dCAT1 is a cationic highly aqueous soluble molecule, it probably does not penetrate vesicles and micelles, but resides on their surface, therefore causing minimum disturbance of the original aggregate structure. The dCAT1 ESR signal can be ascribed to the label either free in solution or close to the negative surface of DMPG aggregates. The appearance of two separate signals shows that the frequency of exchange between the two sites is low compared with the difference in resonance fields. This ability to report simultaneously on the surface of the aggregate and the bulk solution, its enhanced resolution due to the replacement of protons by deuterons, and its motionally narrowed spectra allowing precise determination of a_0 and τ_{\perp} , makes dCAT1 a very convenient probe for the surface electrostatic potential of an anionic amphiphilic aggregate.

Based on light scattering and conductivity measurements, it was previously proposed (Riske et al., 1997) that, at T_m , the melting of the hydrocarbon chains would trigger a process leading to an increase in the degree of DMPG aggregate surface ionization, with a corresponding increase in the magnitude of the negative surface potential. Particles with higher surface potentials, would repel each other more strongly, allowing the electrostatic double layer repulsion to overcome the attractive van der Waals forces thereby favoring a non aggregated dispersion. That would give rise to the observed increase in the sample conductivity and decrease in the intensity of light scattering at T_m (Fig. 1). In the present work, the migration of the cationic spin label to the DMPG aggregates surface above T_m , (Fig. 4) would be in accord with the increase of the magnitude of the surface potential at T_m .

4.1 - Two sites partition model. To estimate the DMPG aggregate surface potential (Ψ_0) a simple calculation can be carried out, based on the experimental partition ratio, as shown in Materials and Methods (Eq. 1). Table 1 shows the measured dCAT1 partition ratios in different systems, in the lipid liquid-crystal phase: 10 mM DMPG in water, 10 mM DMPG in 10 mM Hepes buffer pH 7.4, at several ionic strengths, and 12.1 mM SDS in water. (Due to the inaccuracy of the spectral subtractions, no surface potential calculations were attempted for DMPG below T_m). Ψ_0 was calculated assuming an area per lipid headgroup $A = 60 \text{ \AA}^2$ (Marsh, 1974), a shell thickness where the so called bound labels reside of $h = 5 \text{ \AA}$, $T = 303 \text{ K}$, and the total number of lipids N calculated for a certain V_{total} of 10 mM DMPG. Although less reliable, the same area per lipid headgroup was used for DMPG in water. For SDS, 4.1 mM was calculated (Quina et al., 1995) to form micelles, with an aggregation number of 50.6 and a diameter of 44 \AA^2 , yielding an area per lipid headgroup of 120 \AA^2 . The shell thickness was also assumed to be 5 \AA (Cabane et al., 1985).

Table 1

DMPG aggregate surface potential (Ψ_o) calculated from Eq 1, using the partition ratio (P = bound label moles / total label moles) of dCAT1 in lipid suspensions at different ionic strengths (n).

System	n (mM)	P	Ψ_o (mV)
DMPG in			
water	0.1	0.95	-242
buffer	4.0	0.75	-194
+ 2 mM NaCl	6.0	0.60	-176
+ 5 mM NaCl	9.0	0.40	-154
+ 10 mM NaCl	14.0	0.25	-136
SDS		0.90	-225

It is interesting to point out that the Ψ_o value obtained for SDS micelle is similar to those obtained for DMPG in low ionic strength, and rather higher than the values obtained for SDS micelles with fluorescent probes, around -150 mV (Griser and Drummond, 1988). One has to take into account that the fluorescent probes used were anchored into the SDS micelle, due to their hydrophobic chain, perhaps probing a different region of the micelle as compared to dCAT1, although the estimated dielectric constant by fluorescence, $\epsilon \approx 50$ (Griser and Drummond, 1988), was similar to the one calculated with dCAT1 ($\epsilon = 49$). On the other hand, the fluorescent probes could be perturbing the original SDS aggregate as they partition inside it, unlike dCAT1 which is likely to reside on the micelle's surface. It has also to be considered that micelles have a rather rough surface, where a single surface potential might not apply.

As expected, there is a decrease in the magnitude of the DMPG surface potential with the increase of the ionic strength. It is important to note that the methodology used here is restricted to partition ratios in the experimentally measurable interval of 0.10 to 0.95. For 10 mM DMPG, in the liquid-crystalline phase, it corresponds to $108 \text{ mV} < |\Psi_o| < 242 \text{ mV}$. That limitation is clearly seen in the case of DMPG with 100 mM NaCl, where $P \approx 0$, which could correspond to a surface potential around -100 mV, as suggested before (Cevc et al., 1980; Riske et al., 1997).

Although we have assumed that the variation in the partition ratio, P, at T_m is caused by a change in the surface potential only, it can be seen in Eq. 1 that an increase in the area available for label binding would also induce an increase in the partition ratio P, even for constant surface potential. However, a rough estimation of a possible variation in the available area at T_m tends to exclude that last hypothesis, as follows. The expected increase in area upon the main phase transition (48 to 60 Å²) would not increase the partition rate more than 10 %. On the other hand, if we consider the molecular weights calculated by the Zimm plot for the DMPG aggregates, below and above T_m , 60 and 15 MDa, respectively (Riske et al., 1997), we may estimate that an aggregate of around 4 vesicles fall apart at T_m . Considering the close packing of four spheres, and considering that each one has around 60° of solid angle not available for external binding not more than 1/15 of each vesicle area would be inaccessible to the label. This estimate is an upper limit since it supposes that the rather small dCAT1 could not access any area inside the contact points. Even this upper limit in the change in area would not affect P more than about 7 %. Perhaps other structures for the DMPG aggregates decrease the accessible area

upon aggregation to an extend that can not be neglected.

4.2 - Gouy-Chapman-Stern model. The Ψ_0 values obtained for DMPG can be compared to those calculated by the Gouy-Chapman-Stern model (Eq. 3 in Material and Methods), here called Ψ_0^{GCS} , where the area per lipid headgroup was the same one used before, namely $A = 60 \text{ \AA}^2$, and ϵ was assumed to be 80, as the model assumes the same dielectric constant up to the membrane surface. Fig. 10 shows the dependence of Ψ_0 with the sample ionic strength, and compares its variation with two theoretical curves ($|\Psi_0^{\text{GCS}}|$, dashed lines) calculated for two different K_{Na} values, 0.13 M^{-1} and 0.62 M^{-1} , which correspond to α values 0.55 and 0.37, respectively². It is evident that there is no constant value of K_{Na} which yields good agreement with the surface potential values calculated from the experimental data. Whereas the magnitude of the potentials yielded by the two methodologies is not very different, the experimental decrease of the surface potential with ionic strength is steeper than that predicted by the model. This could possibly be attributed to the various approximations in the Gouy-Chapman-Stern model, like the uniform charge distribution over a planar surface, the point character of the charged particles, and the sharp discontinuity of the dielectric constant at the aggregate surface, although some of them were found rather good for highly charged surfaces (Peitzsch et al., 1995). On the other hand, it is important to note that the different behavior of the two methodologies could possibly be relevant only in the low ionic strength range used here, where the interaction between charged monolayers, either from the same vesicle or from neighboring aggregates, cannot be completely dismissed. About the surface dielectric constant, it is interesting to note that, though some theoretical models assume the sharp discontinuity of ϵ at the bilayer surface, and/or that ions do not penetrate the membrane polar region, it is shown here that the bulky ion dCAT1 (or at least its NO group) resides in a region of $\epsilon \approx 60$.

The Gouy-Chapman-Stern model presented here includes the binding of sodium ions to the phosphate groups of DMPG aggregates. The K_{Na} values, 0.13 M^{-1} and 0.62 M^{-1} although very different, are in the range of the sodium binding constants proposed in the literature (references in Riske et al., 1997). Although many authors do not consider the binding of Na^+ to DMPG aggregates surface, and keep $\alpha = 1$, the consideration of $K_{\text{Na}} \neq 0$ may be rather relevant³. As suggested before (Riske et al., 1997), the lower value of K_{Na} for DMPG in the liquid-crystal phase, as compared to the gel phase, would explain the higher surface potential and higher repulsion among the lipid aggregates, and, consequently, the lower intensity of light scattering for temperatures above T_m .

4.3 - DMPG in water. In the absence of added salt, multi-angle light scattering experiment indicated a strong interparticle correlation for DMPG in pure water (Riske et al., 1997). That would be in accord with the Gouy-Chapman-Stern model ($n = 0.0025 \text{ mM}$, due to the protons in solution, only), which yields an $\alpha = 0.14$, and $\Psi_0^{\text{GCS}} = -317$

² K_H was assumed to be 15.8 M^{-1} according to Toko and Yamafugi, 1980, or calculated from Watts et al., 1978. Although α is a function of the ionic strength (Eq. 4), for the pH and n values used here $[\text{H}^+]_\infty \ll n$, and $[\text{Na}^+]_\infty \approx n$, therefore α is effectively independent of n .

³ For instance, the necessity to overestimate the area per lipid molecule (120 \AA^2 as compared to 48 \AA^2 determined by X-ray diffraction) in the fitting of the experimentally measured electrostatic potential of DMPG in the gel phase (Khramtsov et al., 1992), could be overcome by the use of $\alpha = 0.4$, which would correspond to $K_{\text{Na}} = 0.46 \text{ M}^{-1}$.

mV. However, in the present work, the 0.1 mM concentration of the charged dCAT1 has to be considered (for the other DMPG samples the concentration of dCAT1 was negligible compared to the other ions in solution). By solving Eq. 4 (in Materials and Methods), considering $[Na^+]_\infty = 0$, and $n = 0.1$ mM, an α value of 0.39 was found, which corresponds to $\Psi_0^{GCS} = -276$ mV, to be compared with -240 mV, obtained from the partition ratio. That difference could possibly be due to the sharp dependence of Ψ_0^{GCS} with the ionic strength, for very low n values, and, in the present case, the coarse Gouy-Chapman approximations of considering dCAT1 as a point charge and non-interacting charged layers.

It is interesting to point out that DMPG in pure water has been shown to present some properties different from the lipid in buffered medium (Epand and Hui, 1986; Riske et al., 1997). For instance, in water DMPG does not show a sharp lipid thermal transition, though spin labels intercalated in the hydrocarbon chains monitor regions of similar microviscosities, both at low (15 °C, the gel phase) and high temperatures (40 °C, the liquid-crystal phase), for all DMPG samples. As for the aggregate surface monitored here, the a_0 values of dCAT1 in DMPG in buffer and in SDS micelles remain rather constant for higher temperatures, whereas there is a clear decrease of the a_0 value, and consequently of the dielectric constant of the region where dCAT1 resides in DMPG in pure water (Fig. 7). That could indicate structural changes in the aggregate provoked by increasing the temperature, allowing a deeper penetration of the label. On the other hand, that possible variation on the aggregate structure is not reflected in the measurements of the label microenvironment viscosity, as the bound dCAT1 τ_{\parallel} and τ_{\perp} values remain rather constant above T_m , and very similar for all the DMPG samples, either in water or in buffer (Fig. 8).

4.4 - No evidence of membrane fusion. To test whether there was vesicle fusion at either T_m or T_{post} , the following experiment was carried out. A phospholipid spin label (16-PCSL), which shows negligible partition into the aqueous medium, incorporated in 10 mM DMPG dispersion was used in a concentration high enough to yield a spectrum broadened by spin exchange (3 % of the lipid concentration, in moles). One volume of that dispersion was mixed with three volumes of a DMPG sample in the same concentration, but without the spin label. Therefore, if fusion occurred, a significant linewidth decrease would be expected, corresponding to the dilution of the spin label. No decrease in the spin exchange was observed during and after the following temperature cycle: 1 h at 25 °C, 1 h at 40 °C, 1 h at 17 °C and back to 25 °C. That experiment indicated that the spin labeled phospholipid could not spread out through the DMPG aggregates added afterwards, which would be expected if fusion had occurred.

5. Conclusions

The present work shows evidences of an increase in the DMPG aggregate surface potential at the lipid gel-liquid crystal transition, with accompanying penetration of the aqueous soluble cationic spin label dCAT1 into the surface shell, to a region of dielectric constant about 60. Although there were modifications in the ESR spectra of dCAT1 close to the DMPG aggregates at T_{post} , no simple conclusion could be drawn due to the complexity of the signal. The bound component spectra obtained for temperatures above T_{post} (Fig. 6) could be possibly attributed to more than one site at the aggregate surface, or different aggregate structures present in the dispersion.

The spin label dCAT1 seems a rather promising probe in the general study of surface electrical potential of anionic amphiphilic aggregates. Its aqueous soluble character together with its positive charge, are likely to allow the probing of the surface without altering much the original structure of the aggregates. The decomposition of the dCAT1 ESR spectra into two signals, one more restricted (bound) and one free, allows not only the estimation of the surface potential, based on the two sites model used here, but also an analysis of the bound signal, providing information about the surface packing and local dielectric constant. That methodology could be extended to the study of the binding of small molecules, like biological relevant peptides, to lipid bilayers. It would be interesting to see how they alter the membrane surface potential and packing, and, based on these alterations, discuss partition coefficients of charged drugs to anionic or neutral surfaces.

Acknowledgments

This work was supported by USP, FAPESP, CNPq and FINEP. CNPq fellowships for K.A.R., M.T.L.F. (research) and O.R.N. (research) are acknowledged. B.L.B., M.T.L.F. and O.R.N thank USP and FAPESP for traveling support. B.L.B. was supported by the NIH S06 GM/HD48680-03.

References

- Bales, B.L. 1989. Inhomogeneously broadened spin-label spectra. *In Biological Magnetic Resonance*, vol. 8, edited by Berliner, L.J., Reuben, J. Plenum Publishing Corporation. 77-129.
- Bales, B.L., M. Peric, and M.T. Lamy-Freund. 1998. Contributions to the gaussian line broadening of the proxyl spin probe EPR spectrum due to magnetic-field modulation and unresolved proton hyperfine structure. *J. Magn. Reson.* In press.
- Biaggi, M.H., K.A. Riske, and M.T. Lamy-Freund. 1997. Melanotropic peptides - lipid bilayer interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog. *Biophys. Chem.* 67:139-149.
- Cabane, B., R. Duplessix, and T. Zemb. 1985. High resolution neutron scattering on ionic surfactant micelles: SDS in water. *J. Physique* 46: 2161-2178.
- Castle, J.D., and W.L. Hubbell. 1976. Estimation of membrane surface potential and charge density from the phase equilibrium of a paramagnetic amphiphile. *Biochemistry* 15:4818-4831.
- Cevc, G., A. Watts, and D. Marsh. 1980. Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered-fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers. *FEBS Letters* 120:267-270.
- Epand, R.F., R. Kraayenhof, G.J. Sterk, H.W.W.F. Sang, and R.M. Epand. 1996. Fluorescent probes of membrane surface properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1284:191-195.
- Epand, R.M. and S.W. Hui. 1986. Effect of electrostatic repulsion on the morphology and thermotropic transitions of anionic phospholipids. *FEBS Letters* 209:257-260.
- Epand, R.M., B. Gabel, R.F. Epand, A. Sen, and S.W. Hui. 1992. Formation of a new stable phase of phosphatidylglycerol. *Biophys. J.* 63:327-332.
- Evans, D.F., and H. Wennerstöm. 1994. Electrostatic interactions in colloidal systems. *In The colloidal domain, where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet.* VCH Publishers. 110-114.

- Franklin, J.C., D.S. Cafiso, R.F. Flewelling, and W.L. Hubbell. 1993. Probes of membrane electrostatics: synthesis and voltage-dependent partitioning of negative hydrophobic ion spin labels in lipid vesicles. *Biophys. J.* 64:642-653.
- Gennis, R.B. 1989. Biomembranes. Molecular Structure and Function. Springer-Verlag.
- Gershfeld, N.L., W.F. Stevens Jr, and R.J. Nossal. 1986. Equilibrium studies of phospholipids bilayer assembly. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:19-28.
- Griser, F., and C.J. Drummond. 1988. The physicochemical properties of self-assembled surfactant aggregates as determined by some molecular spectroscopic probe technique. *J. Phys. Chem.* 92:5580-5593.
- Halpern, H.J., M. Peric, C. Yu, and B. Bales. 1993. Rapid quantitation of parameters from inhomogeneously broadened EPR spectra. *J. Magn. Reson.* 103:13-22.
- Hartsel, S.C., and D.S. Cafiso. 1986. Test of discreteness-of-charge effects in phospholipid vesicles: measurements using paramagnetic amphiphiles. *Biochemistry* 25:8214-8219.
- Heimburg, T., and R.L. Biltonen. 1994. Thermotropic behavior of Dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33: 9477-9488.
- Khramstov, V.V., D. Marsh, L. Weiner, and V.A. Reznikov. 1992. The application of pH-sensitive spin labels to studies of surface potential and polarity of phospholipid membranes and proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1104:317-324.
- Kodama, M., T. Miyata, and T. Yokoyama. 1993. Crystalline cylindrical structures of Na^+ -bound dimyristoylphosphatidylglycerol as revealed by microcalorimetry and electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1168:243-248.
- Krasnowska, E.K., E. Gratton, and T. Parasassi. 1998. Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. *Biophys. J.* 74: 1984-1993.
- Marsh, D. 1989. Experimental methods in spin-label spectral analysis. In Biological Magnetic Resonance, vol. 8, edited by Berliner, L.J., Reuben, J. Plenum Publishing Corporation. 255-303.
- Marsh, D. 1974. An interaction spin label study of lateral expansion in dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 363:373-386.
- Mukerjee, P., C. Ramachandran, and R.A. Pyter. 1982. Solvent effects on the visible spectra of nitroxides and relation to nitrogen hyperfine splitting constants. Nonempirical polarity scales for aprotic and hydroxylic solvents. *J. Phys. Chem.* 86: 3189-3197
- Peitzsch, R.M., M. Eisenberg, K.A. Sharp, and S. McLaughlin. 1995. Calculations of the electrostatic potential adjacent to model phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 68:729-738.
- Quina, F.H., P.M. Nassar, J.B.S. Bonilha, and B.L. Bales. 1995. Growth of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles with Detergent Concentration. *J. Phys. Chem.* 99, 17028-17031.
- Riske, K.A., M.J. Politi, W.F. Reed, and M.T. Lamy-Freund. 1997. Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPC dispersions. *Chem. Phys. Lipids* 89:31-44.
- Salonen, I.S., K.K. Eklund, J.A. Virtanen, and P.K.J. Kinnunen. 1989. Comparison of the effects of NaCl on the thermotropic behaviour of *sn*-1' and *sn*-3' stereoisomers of 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta* 982:205-215.
- Seelig, J., P.M. MacDonald, and P.G. Scherer. 1987. Phospholipid head groups as

- sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry* 26: 7535-7541.
- Toko, K. and K. Yamafuji. 1980. Influence of monovalent and divalent cations on the surface area of phosphatidylglycerol monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 26:79-99.
- Watts, A., K. Harlos, W. Maschke, and D. Marsh. 1978. Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. *Biochim. Biophys. Acta* 510:63-74.
- Watts, A., and D. Marsh. 1981. Saturation transfer ESR studies of molecular motion in phosphatidylglycerol bilayers in the gel phase: effects of pretransition and pH titration. *Biochim. Biophys. Acta*. 642:321-241.
- Zhang, Y.P., R.N.A.H. Lewis, and R.N. McElhaney. 1997. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behaviour of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* 72:779-793.

Figure Captions

Fig. 1 - Temperature dependence of 90° light scattering of 10 mM DMPG in different ionic strengths: (□) pure water, (○) buffer (10 mM Hepes pH 7.4), buffer + (▲) 2 mM, (▽) 5 mM, (*) 10 mM and (●) 100 mM NaCl. All samples contain 0.1 mM dCAT1.

Fig. 2 - ESR spectra of 0.1 mM dCAT1 (showed in the top left) free in solution (dashed lines) and in the presence of 10 mM DMPG (full lines), at three different temperatures, in two different media: pure water (top) and 10 mM Hepes + 2 mM NaCl (bottom). The total spectrum width is 50 G.

Fig. 3 - A typical ESR spectra subtraction: (top) 0.1 mM dCAT1 in 10 mM DMPG in buffer; (middle) 0.1 mM dCAT1 free in buffer, (bottom) top minus middle spectrum. The free and bound components spectra are shown with the real relative intensities that they appear in the composite signal (top). Total spectra width 50 G, T = 30 °C.

Fig. 4 - Partition ratios (bound label moles / total label moles) calculated from the second integral ratio between the bound and the composite spectra. (●) 12.1 mM SDS in water, 10 mM DMPG in (□) pure water, (○) buffer (10 mM Hepes pH 7.4), buffer + (▲) 2 mM, (▽) 5 mM, and (*) 10 mM NaCl.

Fig. 5 - SDS spectra subtraction: (top) 0.04 mM dCAT1 in 12.1 mM SDS in pure water; (middle) dCAT1 free in buffer; (bottom) top minus middle. The free and bound components spectra are shown with the real relative intensities that they appear in the composite signal (top). Total spectra width 50 G, T = 25 °C.

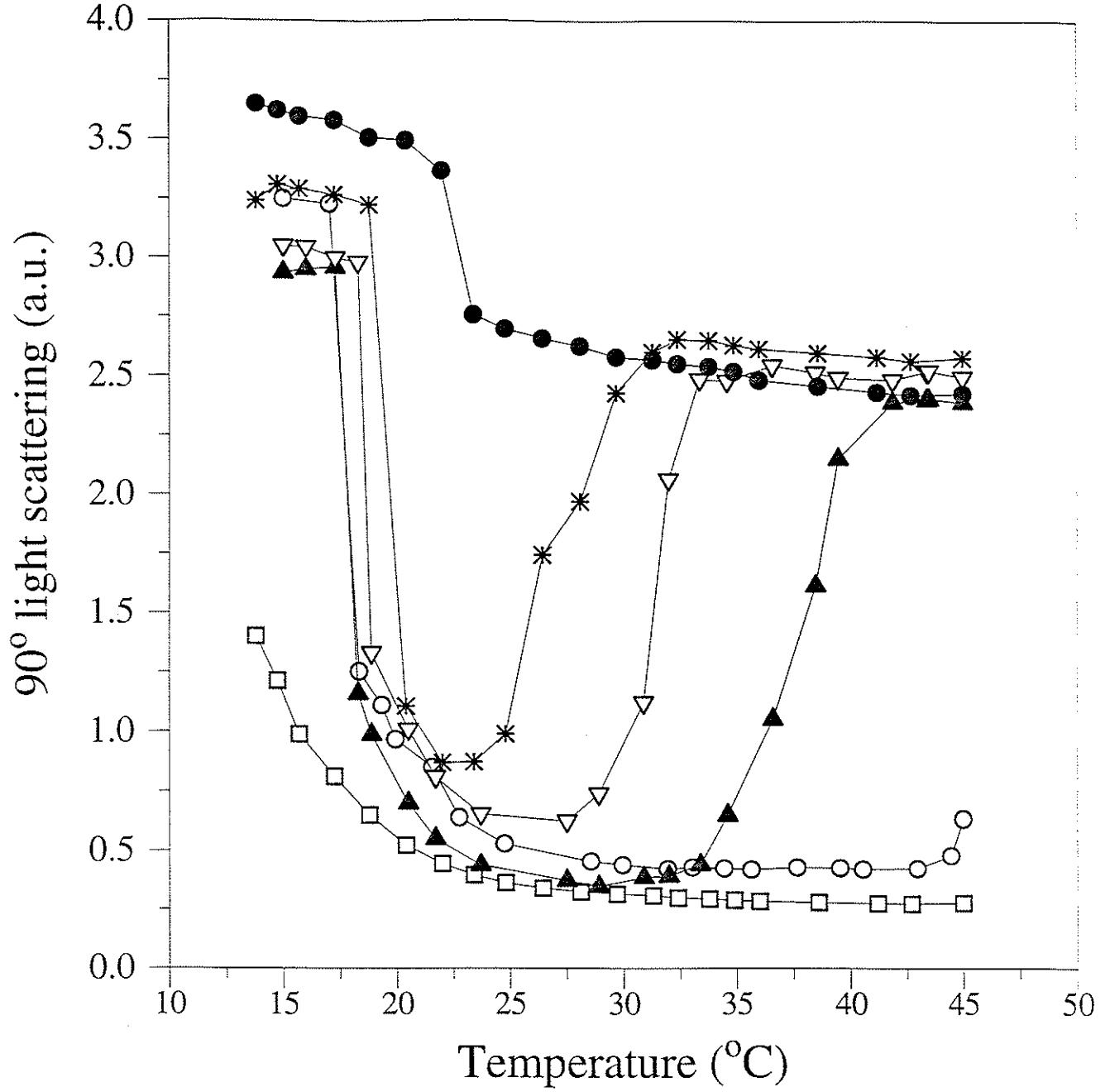
Fig. 6 - ESR spectra of the bound component of 0.1 mM dCAT1 in the presence of 10 mM DMPG in different media at 35 °C (top), and 40 °C (bottom). Total spectra width 50 G.

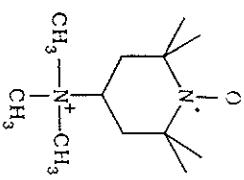
Fig. 7 - Temperature dependence of the isotropic hyperfine splitting values (a_0) yielded by the bound component spectra of 0.1 mM dCAT1: (■) free in buffer, in the presence of 10 mM DMPG in (□) pure water, (○) buffer (10 mM Hepes pH 7.4), buffer + (▲) 2 mM, (▽) 5 mM, and (*) 10 mM NaCl. (●) 0.04 mM dCAT1 in 12.1 mM SDS in pure water.

Fig. 8 - Temperature dependence of the perpendicular correlation time (τ_{\perp}) calculated from the line heights and linewidths of the ESR spectra of 0.1 mM dCAT1 (■) free in buffer, or from the bound component of dCAT1 in the presence of 10 mM DMPG in (□) pure water, (○) buffer (10 mM Hepes pH 7.4), buffer + (▲) 2 mM, (▽) 5 mM, and (*) 10 mM NaCl. (●) 0.04 mM dCAT1 in 12.1 mM SDS in pure water.

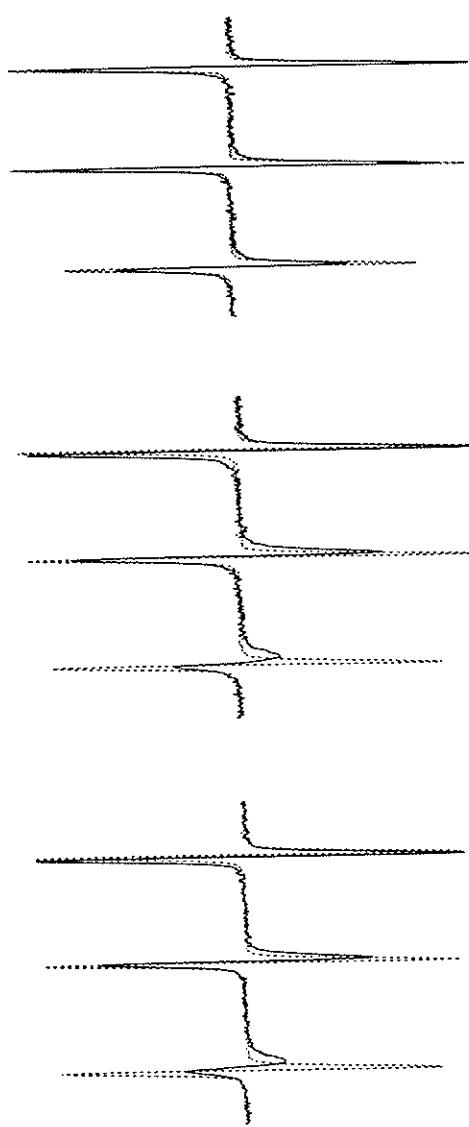
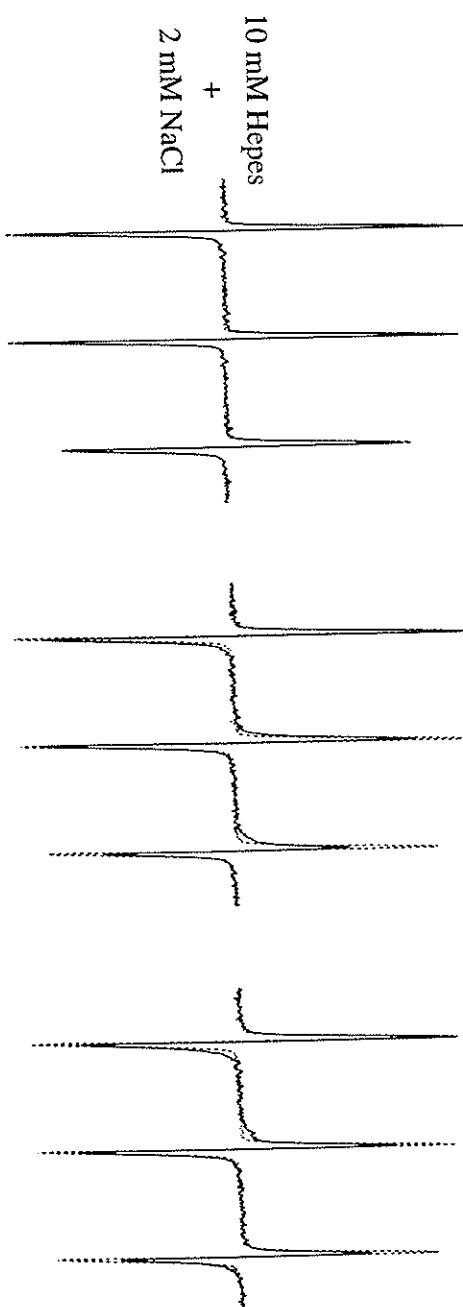
Fig. 9 - The isotropic hyperfine splitting values (a_0) of dCAT1 as a function of the medium polarity index H (see text) calculated for different mixtures of methanol/water, T = 25 °C.

Fig. 10 - Ionic strength dependence of the electrostatic surface potential: (■) experimental values calculated from the partition ratios; (dashed lines) theoretical values predicted by the Gouy-Chapman-Stern model for two different $\text{PG}^- \text{-Na}^+$ binding constants.

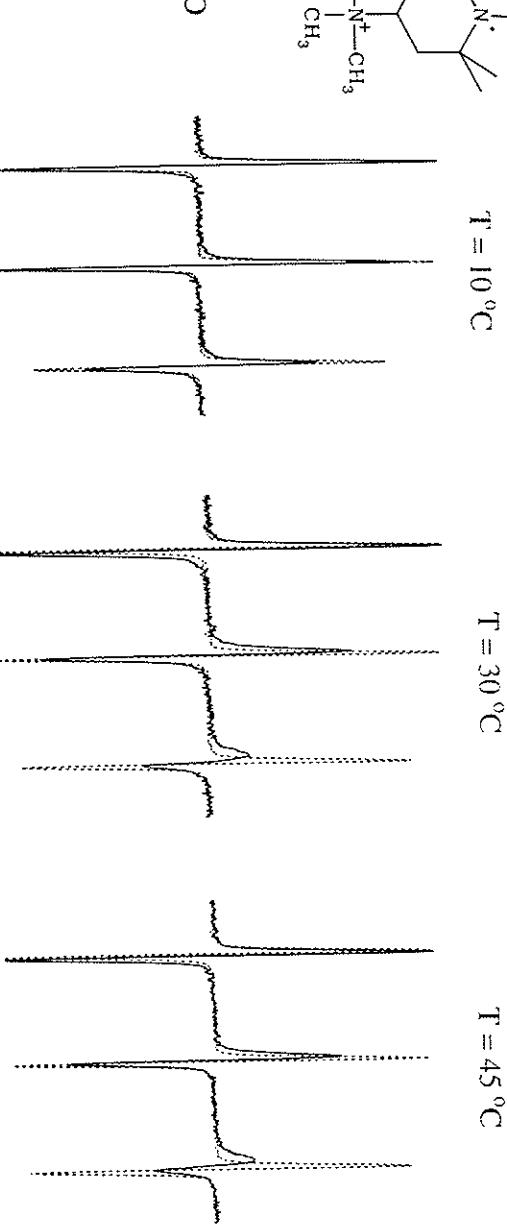




T = 10 °C

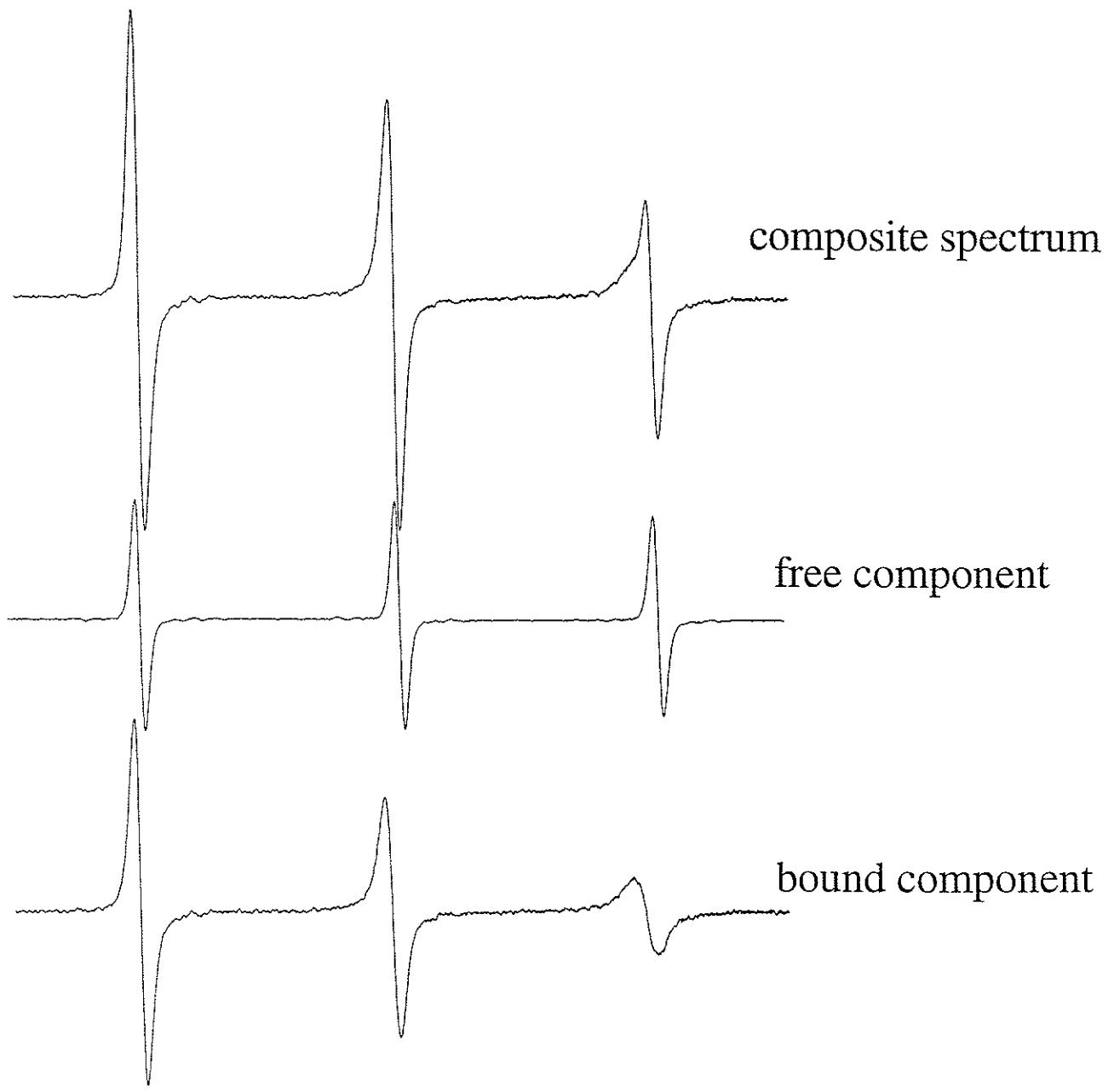


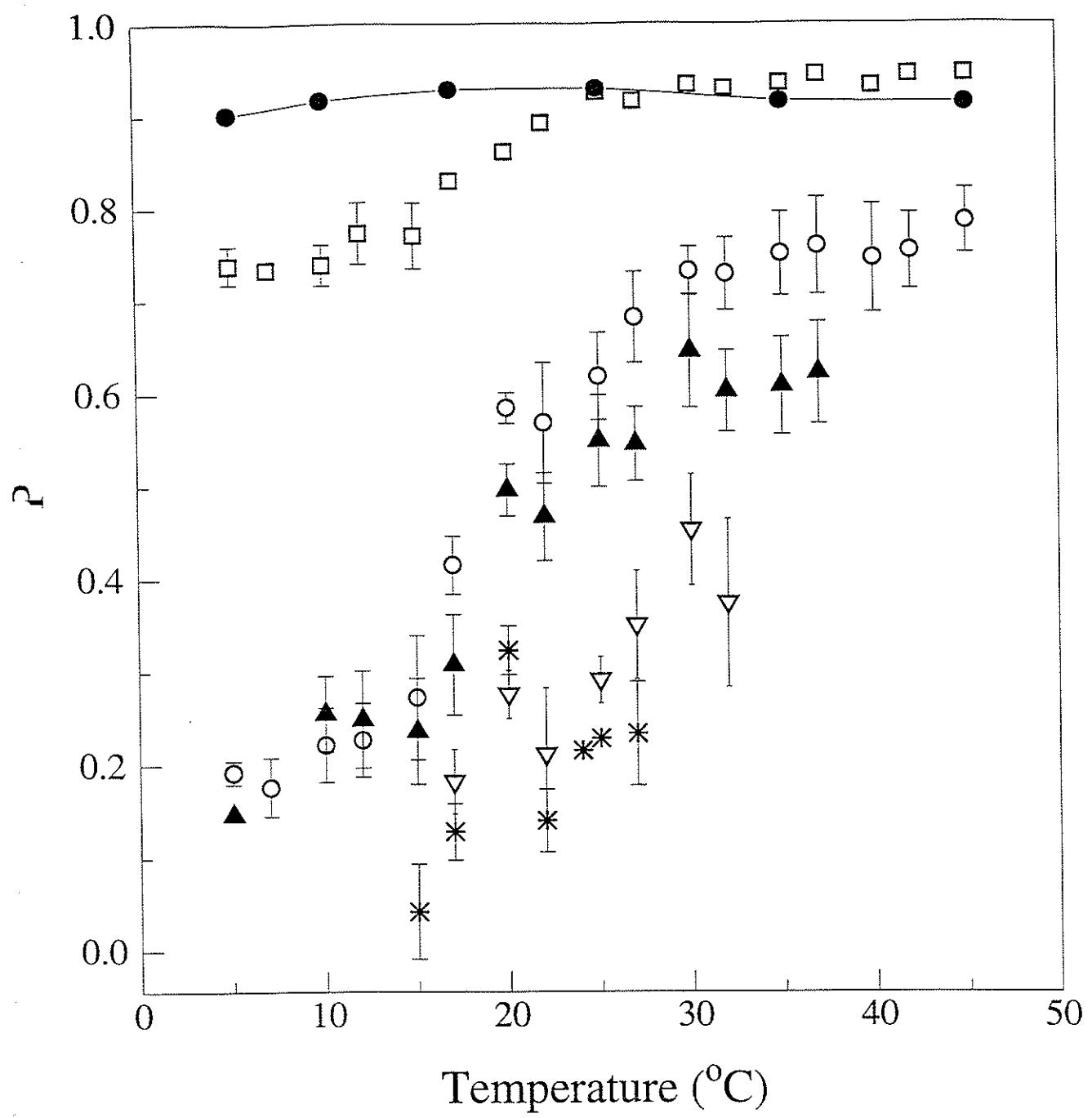
T = 30 °C



T = 45 °C

F1970





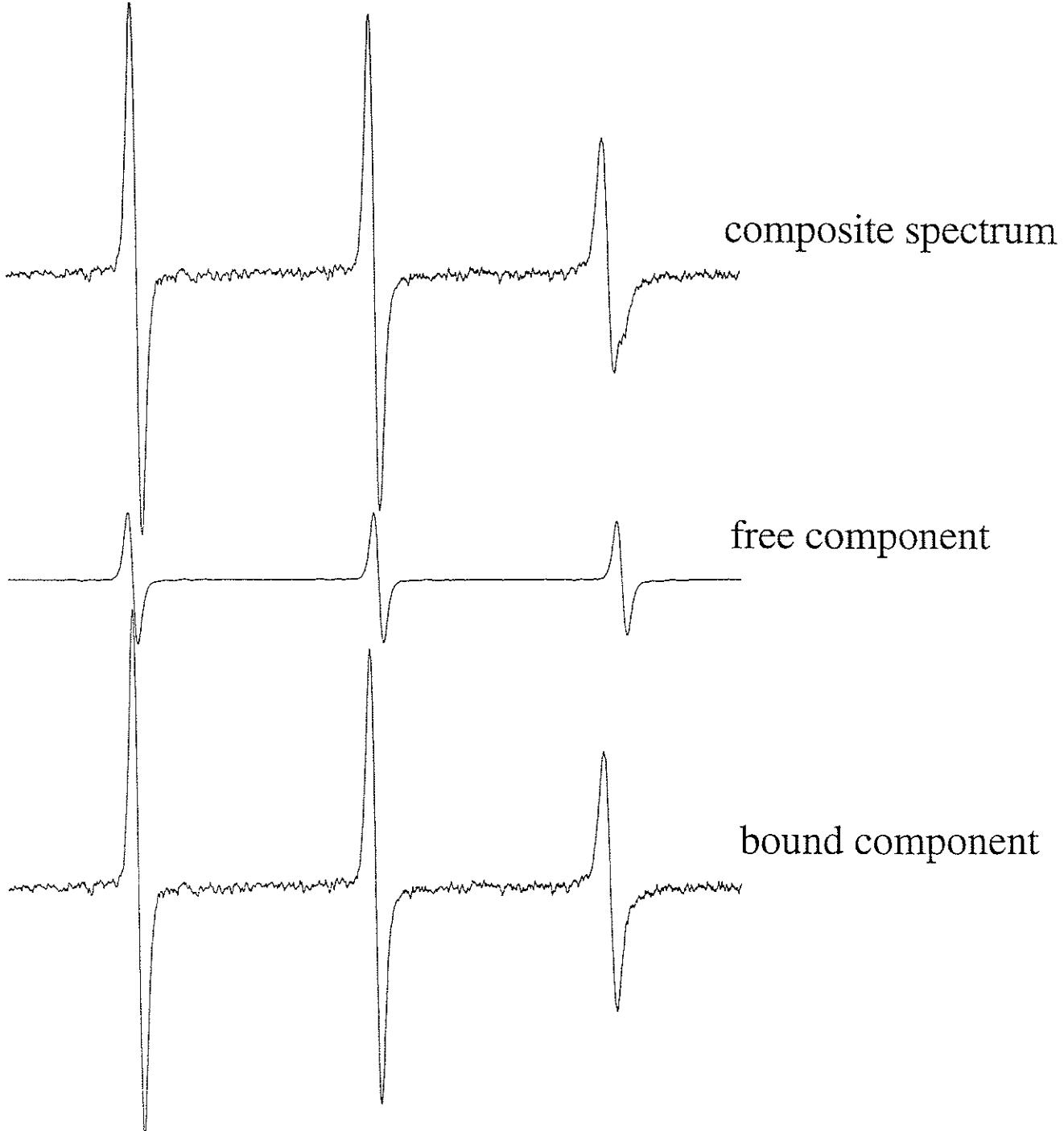
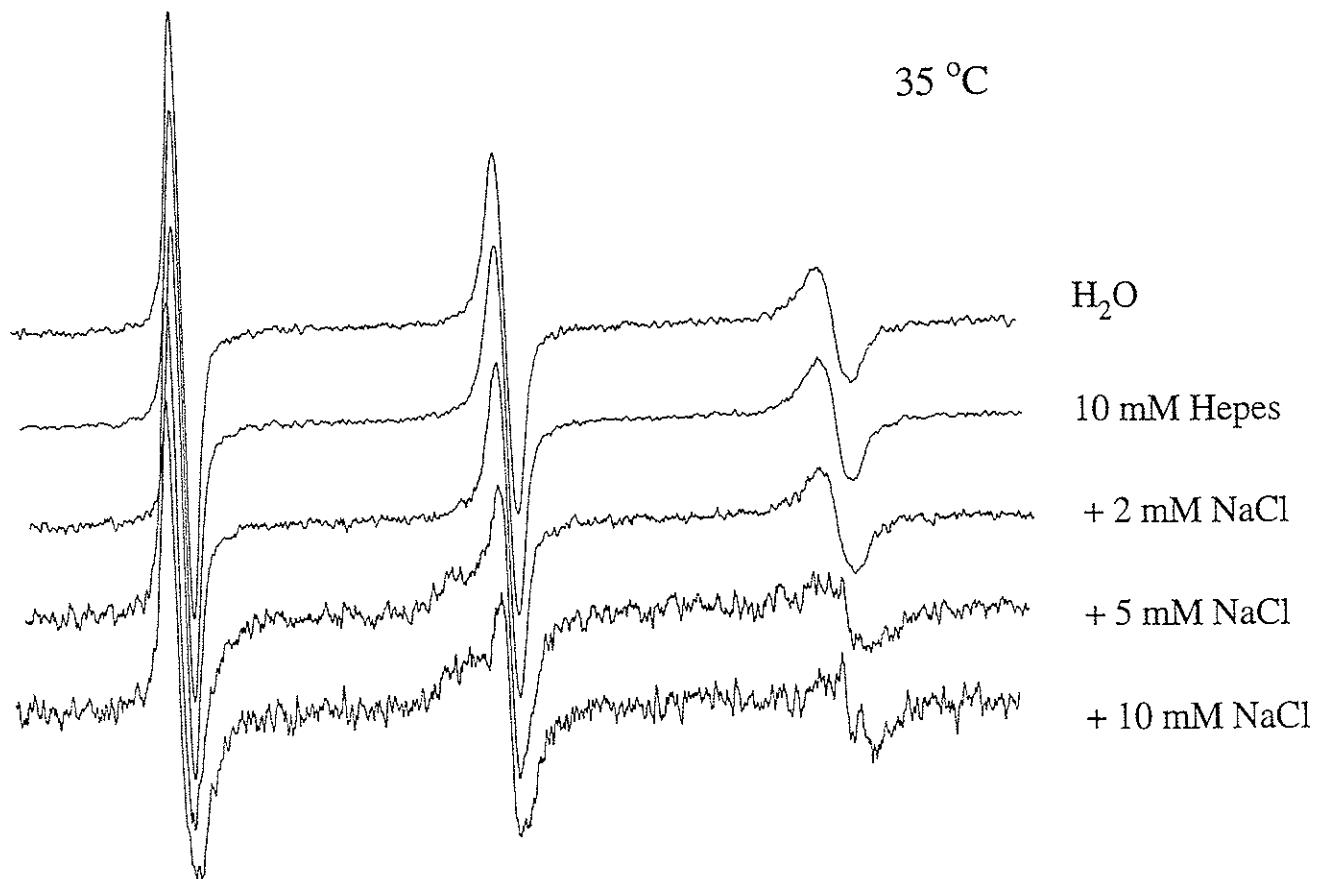


Fig 3

35 °C



40 °C

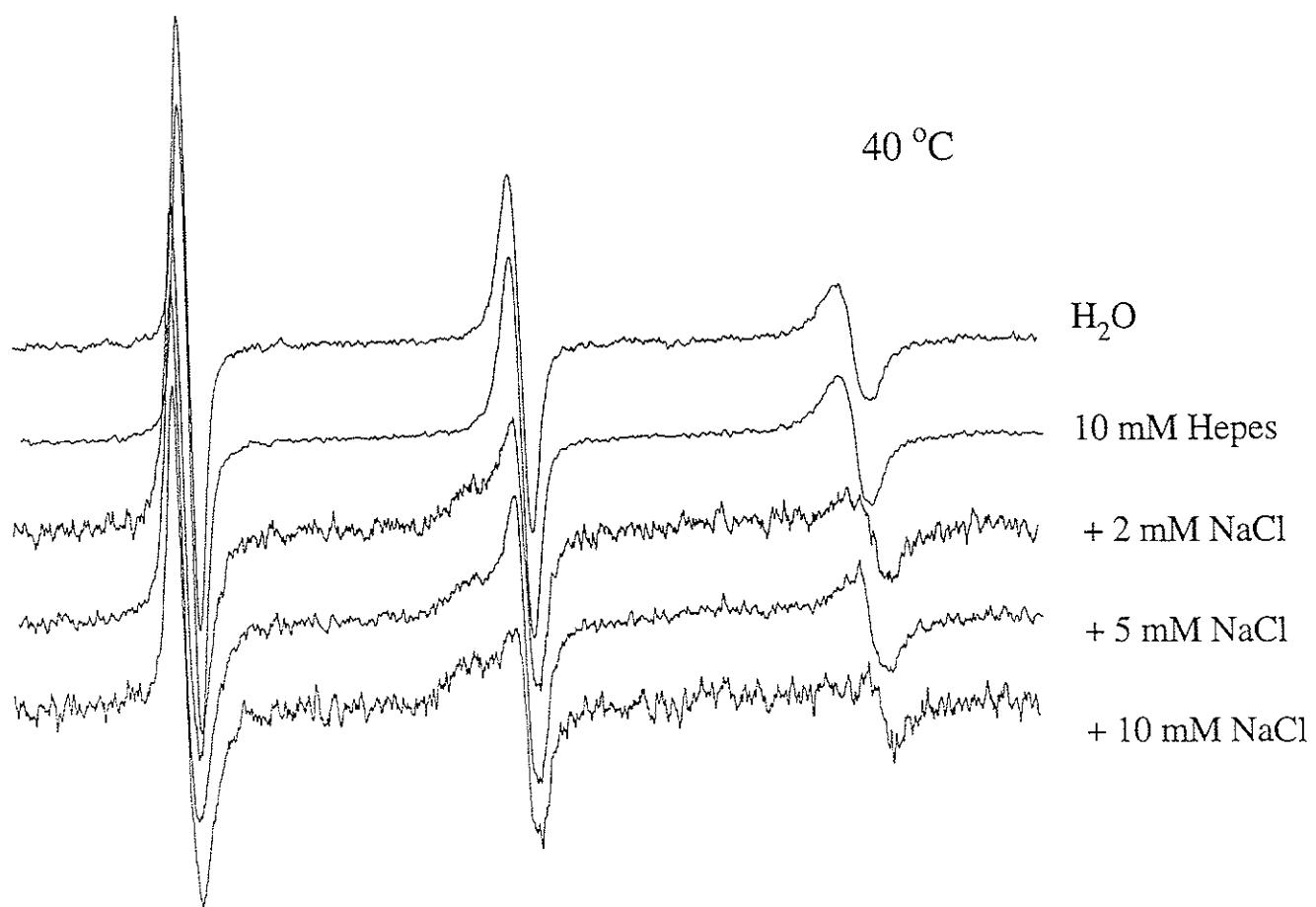
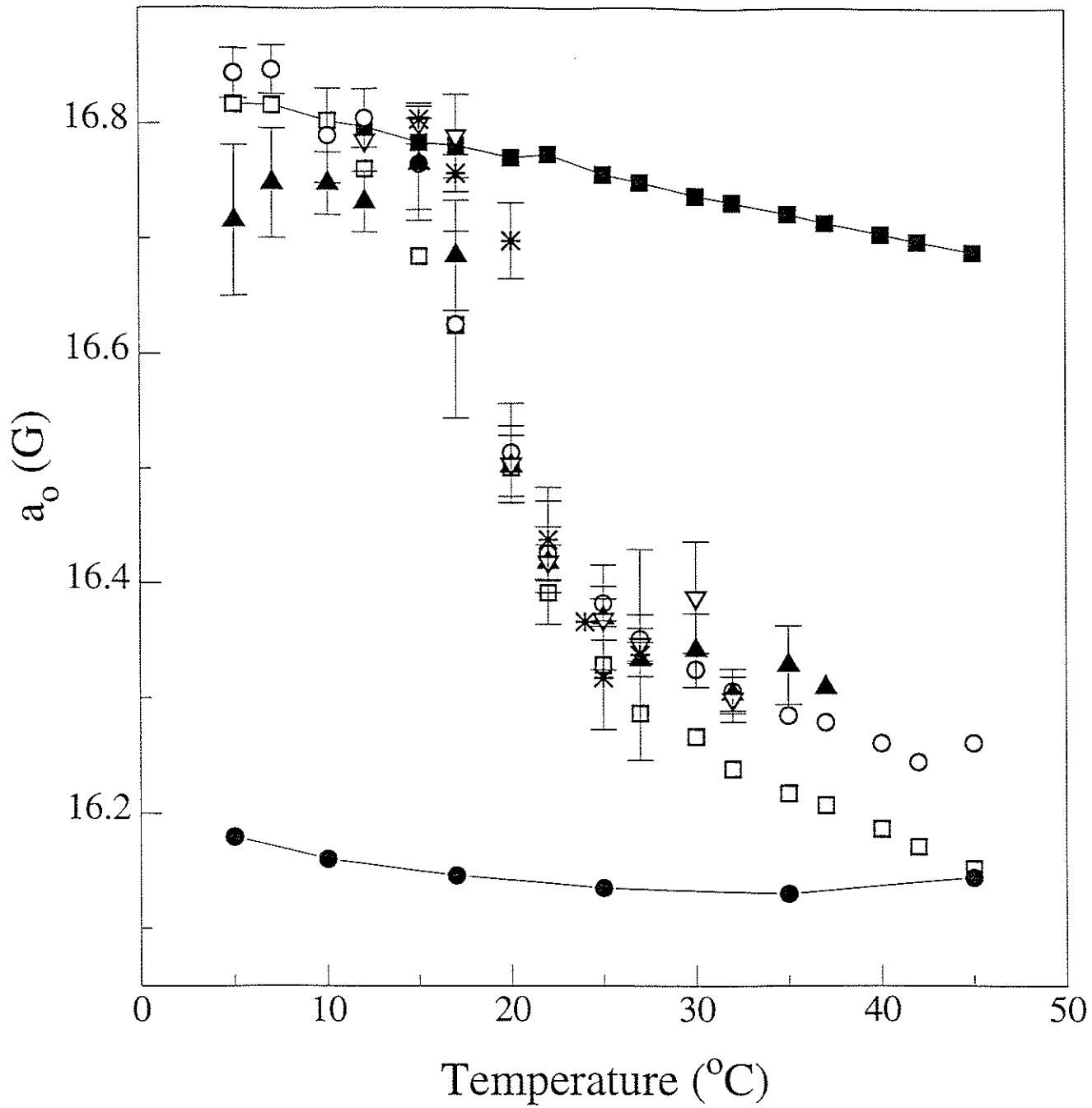
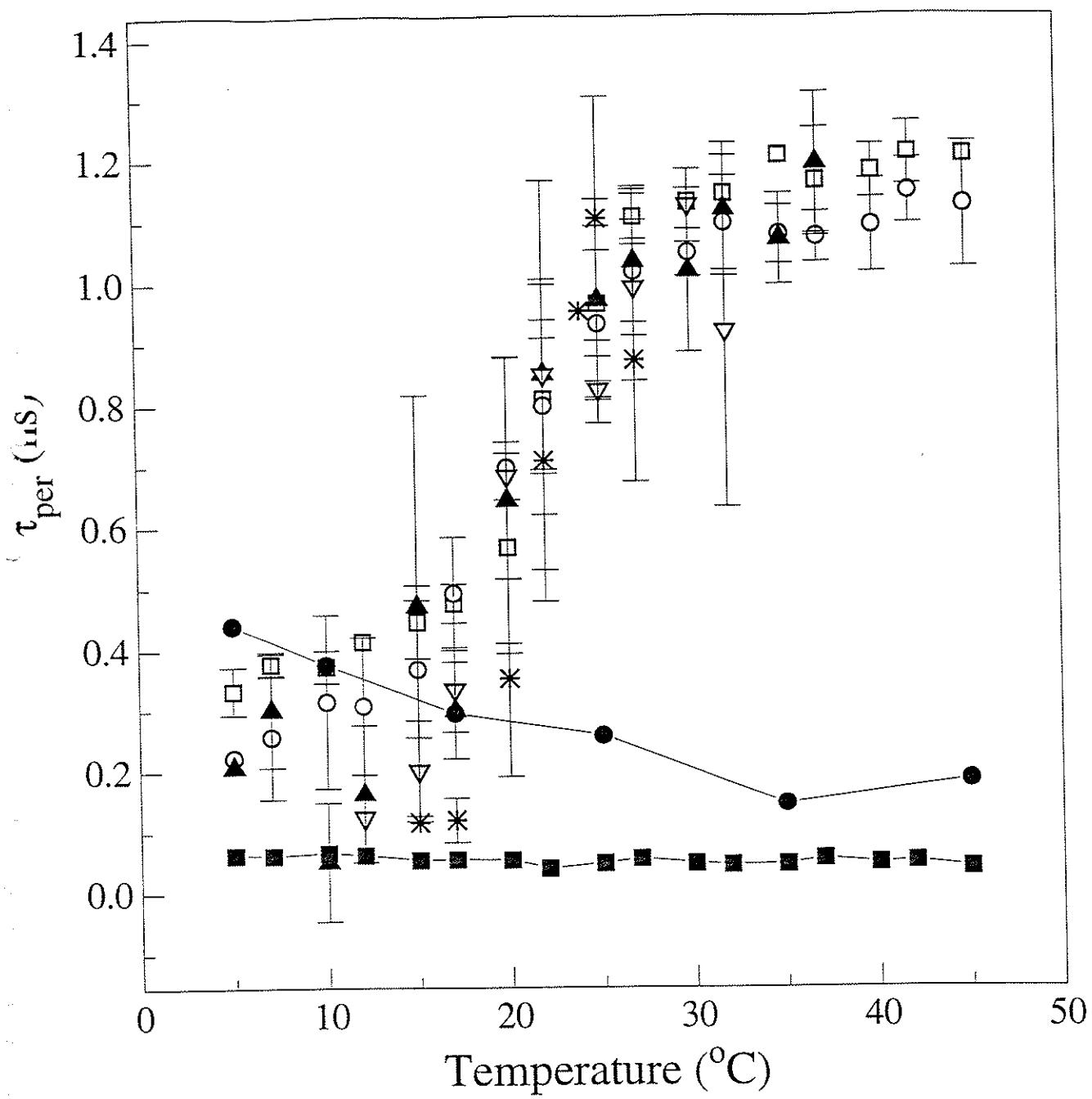
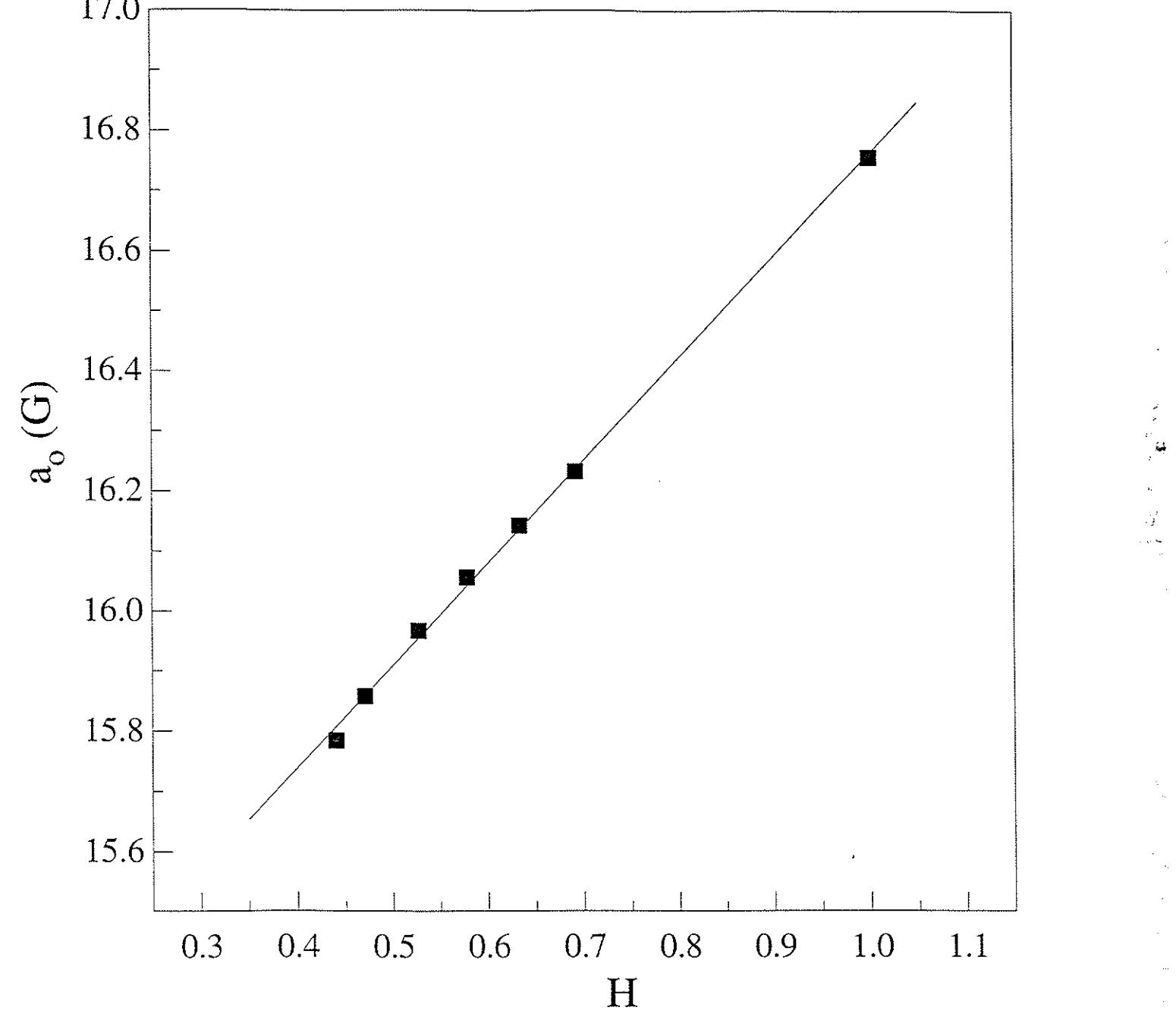


Fig. 5







F12 2

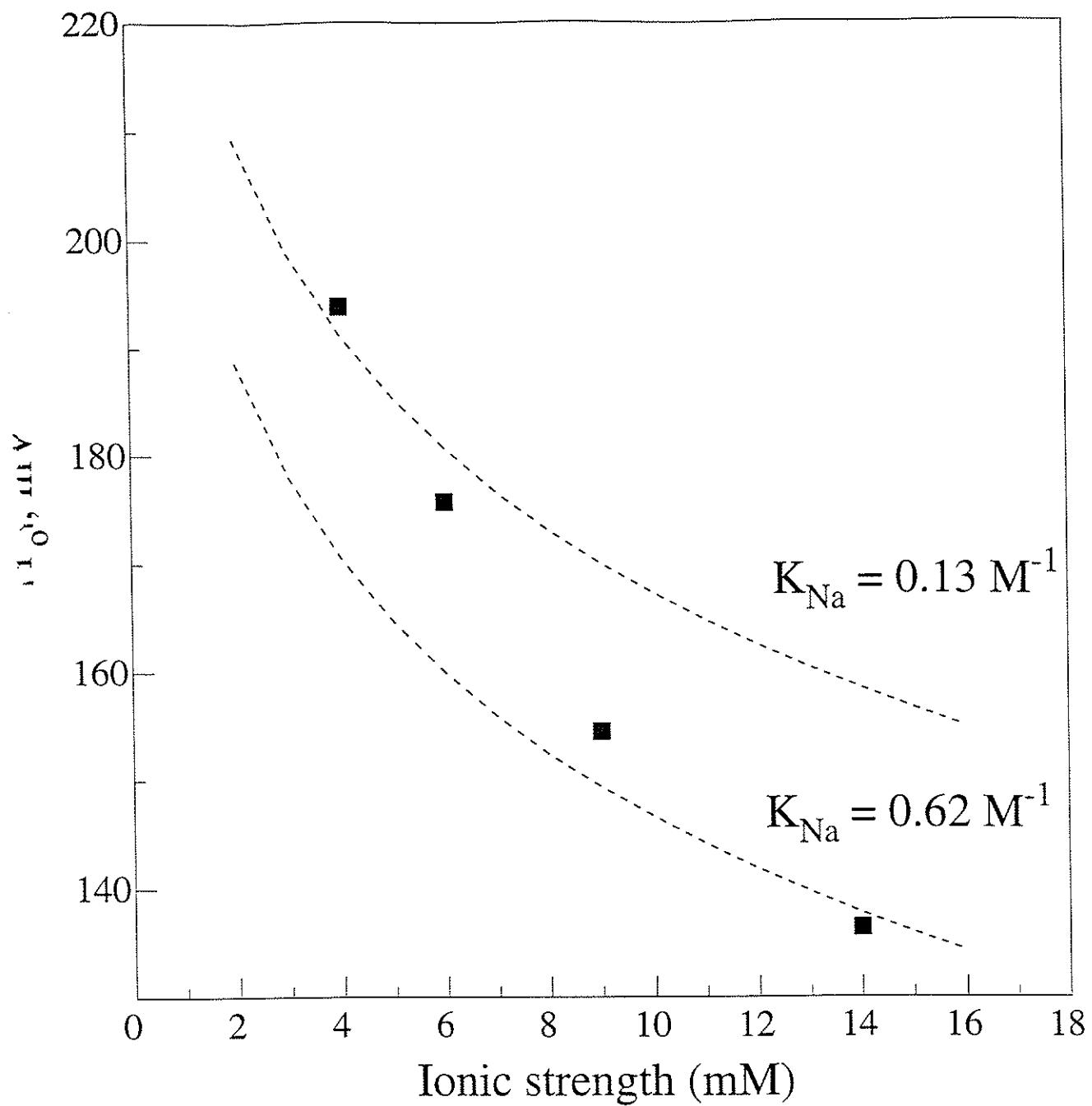


Fig. 10