



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios fisicoquímicos de las construcciones tetraméricas de las secuencias peptídicas (11-25) de la proteína VP1 y (110-121) de la proteína VP3 del virus de la hepatitis A con modelos de membrana

Alba Ortiz Rodrigo



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**

Tesis Doctoral

**ESTUDIOS FISICOQUIMICOS DE LAS CONSTRUCCIONES
TETRAMERICAS, DE LAS SECUENCIAS PEPTIDICAS (11-25) DE
LA PROTEINA VP1 Y (110-121) DE LA PROTEINA VP3 DEL
VIRUS DE LA HEPATITIS A, CON MODELOS DE MEMBRANA.**

Alba Ortiz Rodrigo

Departamento de Fisicoquímica.
Facultad de Farmacia. División de Ciencias de la Salud.
Universidad de Barcelona.



U
UNIVERSITAT DE BARCELONA



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701098027

Memoria presentada por:

Maria Alba Ortiz Rodrigo

para optar al grado de DOCTOR en FARMACIA
por la UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Alba Ortiz Rodrigo

Revisada por:

Dra. M.Asunción Alsina Esteller

Dra. Yolanda Cajal Visa

Barcelona, Abril 2002

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
A_{lim}	Area límite por molécula o residuo
Aa	Aminoácido(s)
AAA	Análisis de aminoácidos
Ac	Anticuerpo(s)
ACN	Acetonitrilo
AFM	Microscopio de fuerzas atómicas
Ag	Antígeno(s)
α	Parámetro de interacción
ANS	Acido 8-anilino-1-naftalensulfónico
CF	Carboxifluoresceína
CL	Cardiolipina
Cl_3CH	Cloroformo
C_a^{-1}	Módulo de compresibilidad de superficie
ΔG_M^E	Incremento de energía de la mezcla en exceso
ΔH	Entalpía
$\Delta\pi$	Incremento de presión superficial
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
DPPE	Dipalmitoil fosfatidil etanolamina
DPPG	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry)
ES-MS	Espectrometría de masas por Electrospray
F	Fluorescencia
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
Fmoc-AA	Aminoácido N-prottegido con el grupo Fmoc
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
K'	Tiempo de retención
λ	Longitud de onda
LB	Película de Langmuir-Blodgett
lps	Liposomas
MAP	"Multiple antigenic peptide"
MLV	Liposomas multilaminares
N	Número de Avogadro
N-NBD-PE	1,2-dioleoil- α -glicerofosfoetanolamina-N-(7-nitro-2- 1,3-benzoxadiazol-4-ilo)
N-Rh-PE	L- α -fosfatidil etanolamina-N-(lisamina-rodamina- β - sulfonilo)
P	Polarización de fluorescencia
PBS	Solución tampón fosfato (pH= 7.4)
PG	Fosfatidil glicerol

Abreviaturas

PF	Fracción empaquetada
PI	Fosfatidil inositol
Pip	Piperidina
PL	Fosfolípido(s)
PM	Peso molecular
π	Presión superficial
π_m	Presión superficial máxima o de saturación
R	Constante de los gases
RET	“Resonance energy transfer”
RMN	Resonancia magnética nuclear
SA	Estearilamina
SUV	Liposomas unilaminares
T	Temperatura
t	Tiempo
TAC	Solución de acetato sódico (pH= 7.4)
Tc	Temperatura de transición de fase de gel a cristal líquido
TFA	Acido trifluoroacético
Tris	Solución tampón de hidroximetil-aminometano (pH=7.4)
UV	Ultravioleta
VHA	Virus de la hepatitis A
Z	Número de coordinación

AMINOACIDOS

A	Ala	Alanina
D	Asp	Acido aspártico
E	Glu	Acido glutámico
F	phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
L	Leu	Leucina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptófano

INTRODUCCION

1	HEPATITIS A	1
1.1	ETIOLOGIA	1
1.2	EPIDEMIOLOGIA	1
1.3	CLINICA	2
2	PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS A	2
2.1	MEDIDAS GENERALES	2
2.2	MEDIDAS ESPECIFICAS	2
2.3	PERSPECTIVAS	3
3	VACUNAS PEPTIDICAS SINTETICAS	3
3.1	SELECCION DE ANTIGENOS PEPTIDICOS	3
3.2	PROTEINAS VP1 Y VP3	4
4	ADYUVANTES: POTENCIACION INMUNITARIA	4
4.1	VISION GENERAL	4
4.2	DESCRIPCION LIPOSOMAS	7
4.2.1	Composición química	8
4.2.2	Propiedades termotrópicas de los lípidos	11
4.2.3	Métodos de preparación de liposomas	13
4.2.4	Caracterización de los liposomas	14
4.2.5	Interacciones liposomas-células "in vitro"	14
4.2.6	Aplicaciones de los liposomas	16
5	EL PAPEL DE LA MEMBRANA LIPIDICA EN LA INTERACCION PEPTIDO-LIPIDO. MODELOS DE MEMBRANA	17
5.1	LA MEMBRANA LIPIDICA	17
5.2	VISION ACTUAL DE LAS INTERACCIONES PEPTIDO-LIPIDO	17
5.3	MODELOS DE MEMBRANA: CAPAS LIPIDICAS MONOMOLECULARES	19
5.3.1	Presión superficial	20
5.3.2	Estabilidad de las monocapas	22
5.3.3	Estados de las capas monomoleculares	22
5.3.4	Estudios en monocapas mixtas	25
5.3.5	Cálculos termodinámicos	26
6	LA FLUORESCENCIA EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCION PEPTIDO-LIPIDO	28

6.1	FLUIDEZ DE LA MEMBRANA DETERMINADA POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA	30
6.2	INTEGRIDAD Y PERMEABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS (ESTABILIDAD)	31
6.3	ESTUDIOS DE FUSION	32
7	MICROSCOPIO DE FUERZAS ATOMICAS (AFM) EN EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE MEMBRANAS	34
7.1	TECNICA DE AFM: FUNDAMENTO	34
7.2	MODOS DE OPERACION EN AFM	35
	<u>OBJETIVOS</u>	37
	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	39
A	MATERIALES	
1	INSTRUMENTACION	39
2	REACTIVOS Y DISOLVENTES	41
3	LIPIDOS	42
4	SOLUCIONES	42
B	METODOS	
1	OBTENCION DE LOS SISTEMAS MAPS	43
1.1	SISTEMA MAP ₄ VP1 (11-25)	43
1.2	SISTEMA MAP ₄ VP3 (110-121)	43
2	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN MONOCAPAS	43
2.1	TECNICA INSTRUMENTAL EMPLEADA EN MONOCAPAS	44
2.1.1	Elección del disolvente	44
2.1.2	Instrumento de medida de diseño propio	44
2.1.2.1	<u>Isotermas de compresión</u>	45
2.1.2.2	<u>Cinéticas de penetración a área constante</u>	46
2.1.3	Balanza de Langmuir-Blodgett	46
2.1.3.1	<u>Isotermas de compresión</u>	47
2.2	TECNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA EN EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATOMICAS (AFM)	48
2.2.1	Preparación de la película de langmuir-Blodgett (LB), para la transferencia	48
2.2.1.1	<u>Factores que determinan la calidad de una película</u>	48

2.2.1.2	<u>Método de preparación de las películas</u>	48
3	ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS	49
3.1	CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS	49
3.1.1	Determinación cuantitativa del fosfolípido	49
3.1.2	Determinación del tamaño de los liposomas	50
3.2	TECNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA. INTERACCION DE LOS PEPTIDOS CON BICAPAS LIPIDICAS	50
3.2.1	Fluorescencia del cromóforo interno triptófano	51
3.2.1.1	<u>Preparación de los liposomas SUV</u>	51
3.2.1.2	<u>Determinación de Fluorescencia del triptófano</u>	51
3.2.2	Ensayos de unión del péptido a las bicapas lipídicas	52
3.2.3	Ensayos de microviscosidad de las bicapas	52
3.2.3.1	<u>Preparación de liposomas SUVs</u>	52
3.2.3.2	<u>Marcaje de los liposomas</u>	53
3.2.3.3	<u>Determinación de polarización de fluorescencia</u>	53
3.2.4	Ensayos de fusión de membranas	54
3.2.5	Estudio de la estabilidad de las bicapas	54
3.2.5.1	<u>Liberación de carboxifluoresceína (CF)</u>	54
3.2.5.1.1	<i>Purificación de carboxifluoresceína</i>	55
3.2.5.1.2	<i>Preparación de liposomas SUV con CF</i>	55
3.2.5.1.3	<i>Purificación de los SUV</i>	55
	1) <u>Cromatografía sobre gel de Sephadex^R</u>	55
	2) <u>Diálisis</u>	56
	3) <u>"Basket centrifugation"</u>	56
3.2.5.1.4	<i>Determinación de la fluorescencia de CF</i>	56
3.2.5.2	<u>Determinación de la permeabilidad de los liposomas por reducción de NBD</u>	57
	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	59
I	MISCIBILIDAD	59
1	MISCIBILIDAD DE LOS LIPIDOS UTILIZADOS EN LAS MEMBRANAS MODELO	61
1.1	ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE DPPC-PI	61
1.2	ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE DPPC-SA	64
1.3	MEZCLAS SELECCIONADAS COMO MODELO DE MEMBRANA PARA LOS ESTUDIOS DE INTERACCION LIPIDO-PEPTIDO	67

1.4	IMAGENES DE LAS CAPAS MONOMOLECULARES CON LA TECNICA DE AFM	70
II	CARACTERIZACION	77
2	CARACTERIZACION DE LA SINTESIS PEPTIDICA	77
2.1	SINTESIS DE LA ESTRUCTURA PEPTIDICA MAP ₄ VP3 (110-121)	77
2.2	SINTESIS DE LA ESTRUCTURA PEPTIDICA MAP ₄ VP1 (11-25)	78
III	INTERACCION DE LOS PEPTIDOS EN MONOCAPAS	80
3	CINETICAS DE PENETRACION	83
3.1	ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE MAP ₄ VP3 (110-121)	83
3.2	CINETICAS DE PENETRACION A AREA CONSTANTE	84
3.3	ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE MAP ₄ VP1 (11-25)	89
3.4	CINETICAS DE PENETRACION DE MAP ₄ VP1 A AREA CONSTANTE EN MONOCAPAS DE UN COMPONENTE	92
3.5	CINETICAS DE PENETRACION A AREA CONSTANTE DE MAP ₄ VP1 EN MONOCAPAS DE DOS COMPONENTES	100
4	ISOTERMAS DE COMPRESION	107
4.1	ISOTERMA DE COMPRESION DEL PEPTIDO MAP ₄ VP3 (110-121)	107
4.2	MISCIBILIDAD DE MAP ₄ VP3 CON LIPIDOS EN MONOCAPAS MIXTAS	108
4.2.1	Miscibilidad de MAP ₄ VP3 con DPPC	108
4.2.2	Miscibilidad de MAP ₄ VP3 con DPPC-PI (9:1)	110
4.2.3	Miscibilidad de MAP ₄ VP3 con DPPC-SA(9:1)	111
4.3	ISOTERMA DE COMPRESION DEL PEPTIDO MAP ₄ VP1 (11-25)	114
4.4	MISCIBILIDAD DE MAP ₄ VP1 (11-25) CON LIPIDOS EN MONOCAPAS MIXTAS	115
4.4.1	Miscibilidad de MAP ₄ VP1 con DPPC	115
4.4.2	Miscibilidad de MAP ₄ VP1 con DPPC-PI (9:1)	117
4.4.3	Miscibilidad de MAP ₄ VP1 con DPPC-SA(9:1)	118
4.5	ESTUDIOS DE INCORPORACION DE LAS ESTRUCTURAS PEPTIDICAS A MONOCAPAS	122
4.5.1	Isotermas de compresión de un componente, sobre una subfase que contiene MAP ₄ VP1	122
4.5.2	Isotermas de compresión de dos componentes, sobre una subfase que contiene MAP ₄ VP1	125
4.5.3	Interacción del MAP ₄ VP1 con monocapas de dos componentes. Isotermas de compresión de monocapas mixtas	126

4.5.3.1	<u>DPPC-DPPG subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP₄VP1</u>	126
4.5.3.2	<u>DPPC-DPPE subfase PBS y subfase PBS adicionado MAP₄VP1</u>	129
4.5.3.3	<u>DPPC-CL subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP₄VP1</u>	132
4.5.4	Isotermas de compresión de mezclas de lípidos, sobre una subfase que contiene MAP ₄ VP3	134
IV	INTERACCION DE LOS PEPTIDOS CON BICAPAS LIPIDICAS (LIPOSOMAS)	135
5	INTERACCION DE MAP ₄ VP3 (110-121) CON BICAPAS LIPIDICAS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	135
5.1	FLUORESCENCIA INTRINSECA DEL TRIPTOFANO	135
5.2	ESTEQUIOMETRIA DE UNION LIPIDO-PEPTIDO	137
5.3	CAMBIOS DE FLUIDEZ DE LA MEMBRANA POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA	138
5.3.1	Interacción de MAP ₄ VP3 con liposomas DPPC	139
5.3.2	Interacción de MAP ₄ VP3 con liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5)	141
5.3.3	Interacción de MAP ₄ VP3 con liposomas de DPPC-PI (9:1)	144
5.4	INTEGRIDAD DE LAS VESICULAS EN PRESENCIA DE MAP ₄ VP3	146
5.4.1	Liberación de Carboxifluoresceína encapsulada en el interior de las vesículas	146
5.4.2	Accesibilidad de fosfolípidos de la monocapa interna	147
5.5	MEZCLA DE LIPIDOS ENTRE VESICULAS DETERMINADA POR TRANSFERENCIA DE ENERGIA RESONANTE (T.E.R)	148
6	INTERACCION DEL MAP ₄ VP1 (11-25) CON BICAPAS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	151
6.1	CAMBIOS DE FLUIDEZ DE LA MEMBRANA POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA	151
6.1.1	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC	151
6.1.2	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC-PI (9:1)	153
6.1.3	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5)	155
6.1.4	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC-PG (9:1)	158
6.1.5	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC-DPPE (9:1)	161
6.1.6	Interacción de MAP ₄ VP1 con liposomas de DPPC-CL (9:1)	162
6.2	INTEGRIDAD DE LAS VESICULAS EN PRESENCIA DE MAP ₄ VP1	164
6.2.1	Liberación de carboxifluoresceína (CF) encapsulada en el interior de las vesículas	164

6.2.2	Accesibilidad de los fosfolípidos de la monocapa interna	165
6.3	MEZCLA DE LIPIDOS ENTRE VESICULAS DETERMINADA POR TRANSFERENCIA DE ENERGIA POR RESONANCIA (T.E.R)	166
	<u>CONCLUSIONES</u>	170
	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	173
	<u>ANEXO.PUBLICACIONES</u>	

Introducción

INTRODUCCION

1. HEPATITIS A

1.1 ETIOLOGIA

La hepatitis A es una enfermedad infecciosa transmisible, de declaración obligatoria en España, producida por un virus hepatotrópico clasificado como género Hepatovirus, dentro de la familia Picornaviridae (Murphy, 1995 y Francki, 1991).

El virus de la hepatitis A es un virus sin envoltura, formado por una cápside esférica de 27 nm de diámetro, constituida por 4 proteínas que se disponen en 32 capsómeros, dando una simetría isocáedrica. En el interior se encuentra el genoma lineal de ARN monocatenario de 2200 kDa. Sólo se ha descrito una clase antigénica con respuesta humoral.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

La transmisión de la hepatitis A es de tipo fecal-oral, además está comprobada su transmisión por el agua y alimentos, habiéndose sugerido alguna forma de transmisión no fecal (lavados nasofaríngeos, orina), de transmisión percutánea (agujas), y también a través de relaciones sexuales, siendo la más común el contacto persona-persona infectada. El virus de la hepatitis A (VHA) es estable en medio ácido y resistente al cloroformo y al éter. Es relativamente resistente al calor, manteniéndose estable a 60°C durante 1h e inactivándose parcialmente en 10-12 h. Mantiene su infectividad al menos 30 días cuando se conserva a 25°C y una humedad del 40% y durante años cuando se mantiene en congelación a -20°C. También puede sobrevivir durante días o meses y por períodos relativamente largos en agua dulce, agua salada, suelo y sedimentos marinos, así como en heces desecadas o en superficies de poliestireno, lo que explica su gran difusión. Se inactiva en autoclave a 120°C durante 20 min o por radiación UV, formalina, betapropiolactona, permanganato potásico, yodo y cloro o compuestos clorados, pero no por cloraminas o por ácido percloroacético.

Se puede detectar el virus en las heces de los enfermos y de pacientes asintomáticos, así como anticuerpos específicos anti-VHA en el suero de los mismos. Se ha hallado un posible reservorio en cierto tipo de simios.

La hepatitis A es una causa importante de morbilidad y ocasional mortalidad, endémica en muchas zonas del mundo (principalmente en países en vías de desarrollo, Asia, Africa y Europa del Este) y epidémica en otras (básicamente en naciones industrializadas), siendo su prevalencia especialmente remarcable en la cuenca mediterránea, donde entre el 75 y el 100% de la población adulta posee anticuerpos anti-VHA, evidencia de haber sido infectado por el virus. Este porcentaje contrasta con las cifras inferiores que corresponden a naciones como Estados Unidos (50%), Australia (55%) o los países escandinavos (13%), por citar unos ejemplos. De esto se podría concluir que en los países donde se han mejorado las condiciones sociales, la sanidad y la higiene en general son más correctas, la enfermedad ve reducidos sus niveles de prevalencia (Zuckerman, 1996 y Saenz González, 1991).

1.3 CLINICA

El VHA es el responsable de más de una tercera parte de los casos descritos de hepatitis víricas (Sobsey,1988).

En una proporción elevada de los casos, generalmente en edad infantil, se da una infección subclínica o anictérica sin sintomatología o con síntomas difusos de afección gripal. En adultos jóvenes, aproximadamente un 10% de los infectados, se produce un cuadro hepático agudo, de rápida evolución, buen pronóstico y escasas complicaciones o tendencia a cronicidad. Por lo que hace referencia a la sintomatología, tras un período de incubación de unas 2-6 semanas, sigue un período preictérico caracterizado por anorexia, náuseas y vómitos, dolores abdominales (epigástrico), fatiga, cefalea, febrícula de 37-38⁰C, artralgias,... Luego aparece la típica ictericia, con orinas colúricas y heces hipopigmentadas; los síntomas gastrointestinales persisten y se añade hepatomegalia, acompañada o no de esplenomegalia. Finalmente, el cuadro evoluciona favorablemente hacia las 6-7 semanas en la práctica totalidad de los casos, sin necesidad de tratamiento, con tan sólo medidas sintomáticas, dietéticas y medicamentosas (Piédrola-Angulo,1991). A pesar de que no se han descrito casos de cronicidad, la Hepatitis A puede presentar complicaciones que lleguen a provocar un desenlace fatal, especialmente en personas de edad avanzada y cuando existe concomitancia con otras patologías. Actualmente, los niveles de mortalidad se sitúan en un 0.7% (Frosner,1983). Cabe reseñar el hecho de que se conservan títulos de anticuerpos protectores durante muchos años.

2. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS A

2.1 MEDIDAS GENERALES

Para evitar la enorme capacidad de difusión de la hepatitis A puede llevarse a cabo una profilaxis a nivel del mecanismo de transmisión mediante una correcta desinfección, higiene individual, en definitiva, una mejora del saneamiento en general.

2.2 MEDIDAS ESPECIFICAS

La profilaxis con inmunoglobulinas humanas constituía, hasta no hace mucho, el único método utilizado contra la enfermedad, debiéndose administrar durante el período de incubación o, como mucho, hasta 6 días después del comienzo de la ictericia, lo que supone un inconveniente en la terapia. Si bien en la mayoría de los casos la previene, en el resto sólo atenúa la infección. Este efecto se atribuye a la probable reducción de los niveles de viremia provocada por los anticuerpos neutralizantes presentes en la gammaglobulina.

La primera vacuna a base de virus de la cepa HM-175 inactivados con formalina (Just,1992), fue introducida en el mercado por la firma Smith-Kline (Harvix®, *Smith-Kline Beecham Biologicals*). Esta vacuna es altamente inmunogénica como lo demuestra el hecho

de que los niveles de anticuerpos anti-VHA detectados en el suero humano tras la vacunación son del orden de 100 veces mayores que en el caso de las inyecciones de inmunoglobulinas. En la actualidad se dispone de otras 4 vacunas inactivadas más, (*Vaqta*®, *Merck and Co*; *Epaxal*®, *Swiss Serum and Vaccine Inst.*; *Avixam*®, *Pasteur Merieux Serums and Vaccines*; *Aimmugen*®, *Kakatsuken*). Estas vacunas contienen partículas víricas inactivadas con formalina, y se producen en cultivos de fibroblastos humanos. Todas ellas comparten procedimientos de producción y de control, pero difieren en el método de purificación.

Por desgracia, la principal desventaja de trabajar con el VHA es su lenta replicación en cultivos celulares (Cromeans,1987;Provost,1984), con la consiguiente dificultad en la preparación de vacunas ya sea inactivadas o atenuadas, y los elevados costes de producción que de ello se derivan. Así pues, las recientes vacunas inactivadas contra la hepatitis A representan un avance considerable en el control de la infección por el VHA en los países desarrollados pero no en las sociedades menos aventajadas donde la Hepatitis A continúa siendo un grave problema de salud pública.

2.3 PERSPECTIVAS

Una alternativa a considerar para la producción de una vacuna de menor coste es el uso de nuevas estrategias basadas en la obtención de péptidos sintéticos que incluyan determinantes antigénicos capaces de inducir una respuesta inmune eficaz (Emini,1985;Wheeler,1986). Otra alternativa, más reciente, basada en sistemas recombinantes eucariotas, se fundamenta en la expresión de proteínas de la cápside vírica ensambladas con el fin de producir partículas inmunogénicas.

Las vacunas peptídicas sintéticas han sido consideradas como un avance en vacunación ya que son seguras, baratas, fáciles de conservar y a diferencia de las vacunas clásicas, pueden ser dirigidas al lugar de acción específico (Meloan, 1995). Además, los péptidos sintéticos que representan regiones específicas de proteínas virales pueden inducir respuestas inmune humoral y celular específica contra partículas víricas (Milich,1989 ; Steward,1987).

Por otra parte, la utilización de vacunas basadas en péptidos sintéticos evita los efectos adversos derivados del empleo de productos biológicos. Sin embargo, una limitación al empleo de estas moléculas es su corta semivida en suero, ya que son rápidamente degradadas por enzimas proteolíticos. Esta desventaja se puede subsanar utilizando liposomas como transportadores de péptidos.

3. VACUNAS PEPTIDICAS SINTETICAS

3.1 SELECCION DE ANTIGENOS PEPTIDICOS

A fin de desarrollar una vacuna sintética efectiva contra el VHA, es fundamental la identificación en las proteínas estructurales del VHA de secuencias específicas que constituyan determinantes antigénicos con capacidad neutralizante de la capacidad infecciosa

del virus.

Como la superficie proteica del virión, denominada cápside, es el medio por el que el VHA interacciona con sus receptores y con los anticuerpos en el organismo al que infecta, resulta de una gran validez el conocimiento primario de la estructura de los polipéptidos expuestos en la superficie en el diseño de las vacunas sintéticas.

En este sentido, la cápside del VHA consta fundamentalmente de 3 proteínas estructurales:

- VP1 (300 aminoácidos)
- VP2 (222 aminoácidos)
- VP3 (246 aminoácidos)

siendo la VP1 la que se halla predominantemente expuesta en la superficie vírica. También se ha descrito, basándose en la secuencia genómica, una cuarta proteína VP4, de peso molecular muy inferior al resto de las citadas, pero que hasta el momento no ha sido identificada en los viriones (Melnick,1992; Lemon, 1993).

3.2 PROTEINAS VP1 Y VP3

En el presente trabajo se estudian las secuencias peptídicas VP1 (11-25) y VP3 (110-121) de la cápside viral del VHA. Estos fragmentos se seleccionaron atendiendo al perfil de hidrofilia obtenido aplicando el método de Hopp y Woods (Hopp & Woods,1981) y también, al hecho que inducían anticuerpos neutralizantes contra el virus (Emini y col. 1985; Wheeler,1986).

La secuencia peptídica 110-121 de la proteína VP3 es la única que contiene el tripéptido RGD. Este tripéptido arginina-glicina-aspártico es responsable de la adhesión celular de una gran variedad de proteínas (Ruoslahti, 1987) y además, está involucrado en la región de unión celular específica de varios virus como el de la fiebre aftosa (Fox,1989).

4. ADYUVANTES: POTENCIACION INMUNITARIA

4.1 VISION GENERAL

A pesar de las nuevas perspectivas abiertas por las vacunas sintéticas, se sabe con certeza que los péptidos sintéticos inducen respuestas inmunitarias sensiblemente inferiores a las conseguidas mediante proteínas o virus intactos. Uno de los principales problemas a resolver en el campo de las vacunas sintéticas es la potenciación inmunitaria, es decir, conseguir vacunas suficientemente inmunogénicas. En este sentido, se han utilizado diferentes adyuvantes para aumentar la respuesta inmune frente a antígenos de procedencia sintética (Van Regenmortel,1988). Además, mediante el empleo de adyuvantes se precisa de menor cantidad de antígeno, con la consecuente reducción de los costes de producción de la vacuna.

La metodología convencional para obtener anticuerpos peptídicos se centra en lograr una inmunización con el péptido conjugado a una proteína conocida o a un portador polimérico sintético, mediante el empleo de un agente de condensación adecuado, con el fin de obtener una estructura macromolecular capaz de desencadenar la respuesta inmune (Bittle,1982). También es un sistema eficaz la inmunización con el péptido sin conjugar, administrado con adyuvante completo de Freund, en el caso de que la longitud del péptido sea de unos 12-20 aminoácidos. Además de las moléculas portadoras clásicas como la seroalbúmina bovina (BSA), la ovoalbúmina (OVA) y la hemocianina de molusco (KLH), existen otras sustancias como la dipalmitoil-lisina y la tripalmitoil-S-gliceril-cisteinil serina que, una vez unidas covalentemente a un péptido, aumentan considerablemente su antigenicidad (Wiesmuller,1992). Recientemente, se han utilizado en estudios en humanos las toxinas diftérica y tetánica (Lussow,1991), y el derivado purificado de la proteína tuberculina PPD (Sela,1980a). Sin embargo, todas estas múltiples aproximaciones convencionales que buscan preparar anticuerpos antipéptidos mediante la conjugación de un péptido a una proteína conocida o a un portador polimérico sintético para aumentar la baja inmunogenicidad de los primeros (Sela,1980b) presentan ciertos inconvenientes.

Aunque estos materiales son efectivos para producir anticuerpos de localización específicos en animales, son ambiguos en cuanto a composición y estructura. Además, en muchas ocasiones pueden producir efectos indeseables, lo que los hace inadmisibles para ser empleados en una vacuna humana. Por otro lado, el péptido antigénico representa una pequeña proporción del complejo péptido-conjugado, por lo que la inmunidad humoral estaría dirigida fundamentalmente contra otras localizaciones antigénicas del complejo. El exceso molecular del portador puede suprimir también la respuesta de las células B hacia el epitopo de interés (Schutze,1985). Además, la unión al portador puede alterar radicalmente los determinantes inmunogénicos del péptido (Briand,1985).

Por todo ello, es preferible diseñar un sistema químico alternativo de los péptidos sintéticos, con estructura unívoca y que evite la conjugación a proteínas portadoras. Recientemente han sido descritos métodos basados en la polimerización de antígenos peptídicos sintéticos (Di Marchi,1986) y otro método especialmente relevante lo constituyen los sistemas "Multiple Antigenic Peptides" (MAP), los cuales fueron inicialmente descritos por Tam (1988).

Los sistemas MAP consisten en un pequeño e inmunológicamente inerte (Posnett,1988) núcleo ramificado y oligomérico de lisinas (Lys), usualmente formado por 3 ó 7 Lys (tetra u octaméricos, respectivamente), y 4 ó 8 brazos dendríticos de péptidos antigénicos unidos al núcleo central de lisinas por grupos α - y γ - amino de este último. Dependiendo de si la secuencia introducida es única o se incorporan dos péptidos diferentes se obtendrán MAPs homogéneos o heterogéneos (ver estructura en la figura 1).

Como cada cadena de péptido puede constar de 10 a más de 20 aminoácidos, la apariencia global del sistema MAP es una macromolécula con una elevada densidad de antígenos peptídicos en la superficie y un peso molecular que puede exceder de 10000, rodeando a un armazón central de Lys de peso molecular inferior a 800. De esta forma, el contenido antigénico del MAP es muy elevado (cercano al 90%), gracias a la notable amplificación resultante de las múltiples copias peptídicas distribuidas a modo de brazos arborescentes. Además, los MAPs son estables en solución de $2 \leq \text{pH} \leq 9$, y pueden ser

guardados como polvo liofilizado (Tam, 1996).

Los MAP se obtienen anexionando los diferentes péptidos antigénicos sobre la misma macromolécula, permitiendo así estudiar el efecto que la disposición y estequiometría de los múltiples epítomos tiene sobre la inmunogenicidad de todo el complejo, y son lo suficientemente inmunogénicos como para proporcionar títulos elevados de anticuerpos (Nardelli,1995), es decir superiores a los obtenidos a partir de los mismos péptidos anclados covalentemente a la KLH como portador (Tam,1988) , o como péptidos lineales.

De las numerosas ventajas que presentan los MAPs cabe destacar que, la estructura ramificada que genera su núcleo de Lys facilita el empaquetamiento de los antígenos sintéticos que lo forman, dando lugar a una mayor estabilización de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas. Además, el extremo terminal del antígeno peptídico que está alejado del núcleo de lisinas, se encuentra más expuesto y es más flexible que el extremo próximo al núcleo (Tam, 1996).

Los MAP se han usado para preparar vacunas experimentales contra la hepatitis (Tam,1989), malaria (Tam,1990) y fiebre aftosa (Francis,1991).

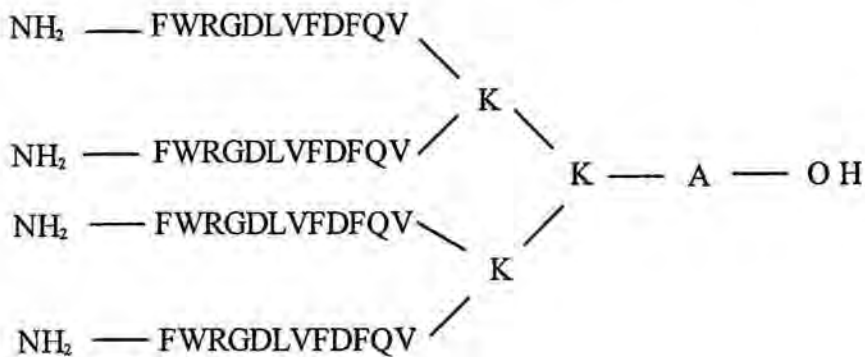


Figura 1 Estructura del sistema MAP₄-VPI (11-25) sintetizado.

A pesar de todas las ventajas que presentan los péptidos en la preparación de vacunas sintéticas, la principal limitación de su uso en forma libre radica en su rápida degradación en los fluidos biológicos por acción de enzimas biológicos. Con el fin de resolver estos problemas se han desarrollado una gran variedad de sistemas de administración ("delivery systems"): nanopartículas, microesferas, liposomas, polímeros. De todos ellos, los liposomas son los más empleados por su baja toxicidad, fácil obtención y la posibilidad de poder encapsular fármacos (ya sea atrapados en su interior ó unidos covalentemente a ellos). Además, se ha demostrado que un antígeno puede ser más inmunogénico cuando se presenta en forma coloidal, por ejemplo incorporado en micelas. Así pues, los liposomas se utilizan como formas de presentación coloidales multiméricas, simulando la situación natural del entorno anfifílico de las membranas (Kersten,1995). Los liposomas presentan también capacidad como inmunoadyuvantes de diversos péptidos antigénicos ante una gran variedad de infecciones bacterianas (Allison,1974; Davis,1989), víricas (Alving,1991), protozoicas (Hui,1991), así como para antígenos de tumores (Ullrich,1992).

En definitiva la versatilidad de los métodos de obtención de los liposomas junto con sus propiedades inmunoadyuvantes y su capacidad para transportar agentes terapéuticos, convierten a los liposomas en un sistema ideal para inducir respuesta inmunológica (Galvin,1999).

4.2 LIPOSOMAS : DESCRIPCION Y CARACTERISTICAS

Los liposomas fueron descritos por primera vez por Bangham y Horne (Bangham et al.,1964) al observar por microscopía electrónica que una suspensión de fosfolípidos de origen celular aislados y purificados formaban vesículas de manera espontánea. Así pues, los liposomas se definen como vesículas lipídicas formadas por una o varias bicapas concéntricas que contienen un espacio acuoso en su interior. Generalmente, se clasifican en función de su tamaño, tal y como se muestra en la figura 2, en:

- Liposomas Grandes:

* Unilaminares (LUV). Son vesículas constituidas por una única bicapa con un diámetro que va desde 100 nm hasta varias micras. La principal ventaja es su elevado espacio acuoso interno, así son adecuados para encapsular macromoléculas, virus o sustancias hidrófilas.

* Multilaminares (MLV). Los liposomas pertenecientes a este grupo constan de cinco a veinte bicapas concéntricas; si tienen menos de cinco se denominan liposomas oligolamelares. El tamaño de estas vesículas queda comprendido entre 100 y 1000 nm. Como variante de estos liposomas se describen los liposomas multivesiculares, MVV, en los cuales los compartimentos no son concéntricos, sino contiguos. También, dentro de este grupo se incluyen los liposomas “dried reconstituted vesicles”, DRV, formados a partir de ciclos de deshidratación-rehidratación. Se trata de liposomas unilaminares grandes, LUV, de tamaño inferior o igual a 1000 nm. Estas vesículas proporcionan elevados porcentajes de encapsulación.

- Liposomas Pequeños:

* Unilaminares (SUV). Este tipo de liposomas consiste en una única bicapa de lípido que envuelve el compartimento acuoso, de tamaño inferior a 100nm. Se obtienen por sonicación o extrusión a partir de liposomas MLVs, originados por procesos de dispersión mecánica del lípido. La utilidad de estos liposomas queda limitada por su baja capacidad de encapsulación y su poca estabilidad (Regen,1997).



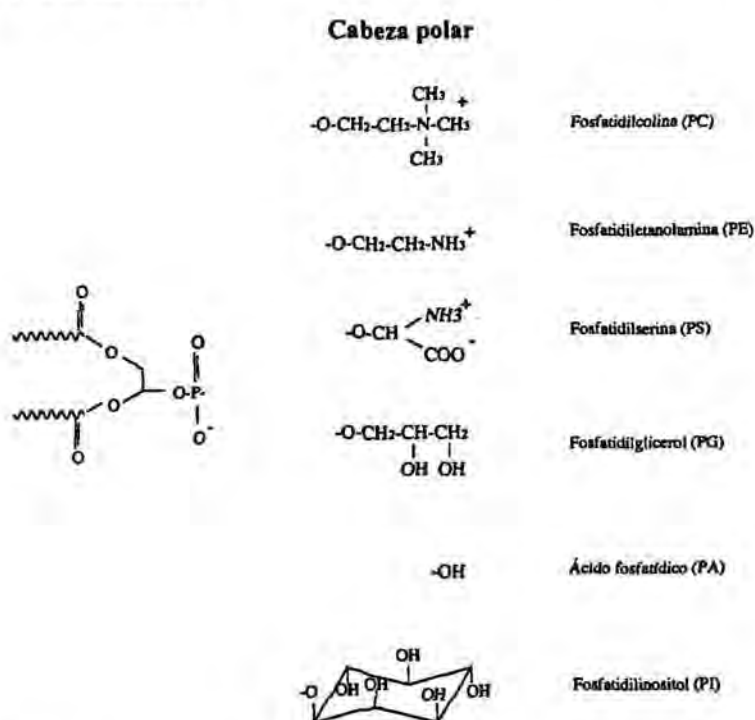
Figura 2 Representación esquemática de varios tipos de liposomas. liposomas unilaminares pequeños (SUV), unilaminares grandes (LUV), liposomas oligolaminares (OLV), liposomas multilaminares (MLV) y liposomas multivesiculares (MVV).

El tipo de liposoma más adecuado para llevar a cabo los diferentes ensayos se selecciona en cada caso en función de las características del estudio.

4.2.1 Composición química

Los liposomas se pueden preparar a partir de una gran variedad de lípidos anfifílicos ó mezclas de lípidos de origen natural o sintético siempre que se hidraten con exceso de agua, siendo los fosfolípidos los más empleados (ver figura 3). No obstante, no todos los lípidos anfifílicos pueden formar liposomas, sino que ha de existir un equilibrio óptimo entre las partes hidrófoba e hidrófila de la molécula. Para aumentar la estabilidad de las preparaciones se suele incorporar un cierto porcentaje de colesterol (ver figura 3).

(a) FOSFOLÍPIDOS



(b) COLESTEROL

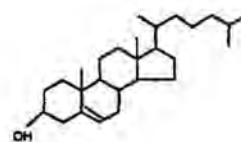


Figura 3 Principales componentes de los liposomas.

Tradicionalmente, los componentes de las membranas de los liposomas han sido los fosfolípidos, y en particular la fosfatidilcolina (PC), en parte por ser ésta un sillar de las membranas naturales tanto de eucariotas como de algunos procariotas (Dowhan, 1997) y por ser un lípido lamelar (formador de bicapas) en cualquier condición, sin requerir la ayuda de otros componentes.

Los fosfolípidos puros tienen una temperatura de transición típica (T_c) y presentan diferentes estados físicos por encima o por debajo de esta temperatura, llamados estado de cristal líquido o de gel, respectivamente. Así, estas sustancias tienen una estructura rígida y ordenada cuando están por debajo de la T_c , mientras que por encima de la misma presentan

una estructura fluida. También, una de las características más importantes de las membranas es la transición de fase gel (estado ordenado) a cristal líquido (estado desordenado o fluido), y generalmente nos referimos a ella como la transición principal.

Los fosfolípidos de las membranas naturales están constituidos por combinaciones de cadenas saturadas e insaturadas, dando una transición de fase en un intervalo de temperaturas. En cambio los fosfolípidos sintéticos, tal como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) cuya parte hidrófoba la constituye una única especie material, están bien caracterizados por una temperatura de transición de fase (T_c) fija (LIPIDAT,1995).

Los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares suelen tener una longitud de 16 hasta 24 átomos de carbono. Los lípidos con cadenas de menor número de átomos de carbono no suelen formar bicapas estables. La insaturaciones de las cadenas de los ácidos grasos suelen presentar configuración en *cis*, la cuál rompe con la linealidad de la cadena y evita el empaquetamiento rígido de la bicapa lipídica.

Si formamos liposomas con un 100% de lípidos insaturados, éstos forman bicapas permeables y susceptibles de oxidarse o bien romperse. Además, trabajar con ellos resulta más fácil, ya que son más solubles en disolventes orgánicos, se hidratan con más facilidad y al ser fluidos a temperatura ambiente se facilita la eliminación de los defectos de empaquetamiento. Por contra, los fosfolípidos saturados forman liposomas más estables, si bien para evitar los defectos de empaquetamiento se han de preparar por encima de la temperatura de transición (T_c) de los fosfolípidos.

Las membranas celulares, así como las de los diferentes orgánulos intracelulares tienen proporciones variables de carga negativa además de ser sus bicapas asimétricas. Estas características son importantes para las diferentes funciones fisiológicas de las membranas como son la translocación de proteínas (vanKlombenburgh,1998), el transporte de iones o sustancias a su través y la transducción de señales de diferentes procesos (reacción inmune, transmisión sináptica, producción hormonal, etc..).

La inclusión en las bicapas de los liposomas de fosfolípidos que presentan carga neta a pH fisiológico, como fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) y también los lípidos positivos, como estearilamina (SA), tiende a mejorar la estabilidad de los mismos. Si se incrementa la densidad de carga superficial se origina una repulsión electrostática entre las vesículas y por tanto, disminuye la posibilidad de agregación entre ellas. La incorporación de un 10 % molar de los lípidos con carga, ya es suficiente para disminuir las interacciones intermembrana.

Las membranas naturales no presentan en su composición lípidos de carga positiva. Sin embargo, éstos se utilizan habitualmente en la preparación de membranas sintéticas, con una doble finalidad. Por una parte, membranas catiónicas son modelos de membrana que tienen en cuenta las cargas positivas que muchas veces presentan las membranas celulares debido a polímeros catiónicos, cuya función es facilitar la entrada a la célula de moléculas de carga negativa como ADN (Leventis,1990). Por otra parte, liposomas con lípidos catiónicos se utilizan en la terapia de genética, ya que facilitan la transferencia de material encapsulado (ADN) al interior de las células (Felgner,1987; Gao,1991). Como lípidos catiónicos más habituales se encuentran ácidos grasos como la estearilamina (SA),

y lípidos sintéticos como dioleoilxypropiltrimetilamonium (DOTMA) y dioleoiltrimetilaminopropano (DOTAP) (Lemetri, 1987).

Los esteroides se encuentran en las membranas de vegetales y animales, siendo el colesterol el más común. Se trata de una molécula plana con una región hidrófoba y otra hidrófila (figura 3). El colesterol no es capaz de formar bicapas por sí sólo pero sí de incorporarse a una membrana fosfolipídica (figura 4); por su carácter anfipático orienta el grupo hidroxilo hacia la superficie acuosa e intercala el resto de la molécula entre las cadenas de ácido graso en el interior de la bicapa.

Al incorporar colesterol a las bicapas fosfolipídicas se reduce considerablemente la permeabilidad, ya que provoca una desaparición gradual de la transición de fase (Szoka,1980a). Por debajo de la T_c el colesterol tiene un efecto fluidificante débil, y por encima de la T_c disminuye la fluidez. Además reduce la posibilidad de penetración de ciertas proteínas, lo que supone un incremento en la estabilidad de los liposomas, tanto "in vitro" en presencia de plasma (Damen,1982) como "in vivo" tras inyección intravenosa (Senior,1983).

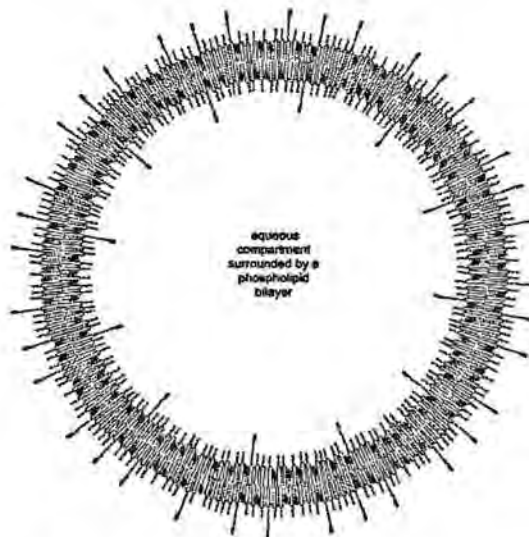


Figura 4 Estructura de la bicapa lipídica de un liposoma Posición del colesterol (negro) y de los fosfolípidos (gris) en la bicapa lipídica.

La PC es el fosfolípido mayoritario en las membranas naturales. Esta molécula de carácter anfipático consta de un esqueleto de glicerol al que se unen dos ácidos grasos en posición *sn*-1 (R_1) y *sn*-2 (R_2), y un grupo fosforilcolina en *sn*-3 (R_3). A pH fisiológico, la carga positiva permanente de la colina contrarresta la carga negativa del fosfato y se tiene así una parte polar neutra (zwitterion) muy hidrófila. En las PC naturales, aproximadamente la mitad de los ácidos grasos son saturados, siendo R_1 predominantemente 16:0 (cadena hidrocarbonada de 16 carbonos y sin insaturaciones) y R_2 una cadena de 16:1 (cadena hidrocarbonada con 16 carbonos con una insaturación).

La fosfatidiletanolamina (PE) tiene un grupo polar más pequeño que la PC. La PE es una molécula zwitteriónica a pH fisiológico. La presencia de átomos de hidrógeno unidos directamente al nitrógeno de la etanolamina permite que se produzcan interacciones tipo

punto de hidrógeno con las moléculas adyacentes de la membrana. Normalmente, la PE natural tiene como cadena saturada R_1 al ácido esteárico, y varios grupos poliélicos en la cadena insaturada R_2 .

A pH fisiológico, el fosfatidilglicerol (PG) como el fosfatidilinositol (PI) y la cardiolipina (CL) poseen carga negativa. En la mayoría de las membranas celulares éstos lípidos se sitúan en la monocapa interna de la bicapa lipídica (Voorst,2000). En las células eucariotas, CL y PG se encuentran mayoritariamente en las membranas de las mitocondrias. Normalmente, la cardiolipina es un lípido formador de bicapas, pero cuando su grupo polar se compleja con cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+}) contribuye a la formación de fase hexagonal inversa de la membrana (Dowhan,1997). La parte polar de PI, es un anillo con grupos hidroxilo que pueden formar puentes de hidrógeno y su parte apolar la constituyen ácidos grasos insaturados de 18 carbonos, sobre todo la procedente de los vegetales.

4.2.2 Propiedades termotrópicas de los lípidos

Los lípidos presentan transiciones de fase reversibles dependientes de la temperatura, en las que las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido sufren una transformación desde un estado denominado gel (bajas temperaturas) a uno más desordenado ó fluido, llamado cristal líquido (temperaturas elevadas) o mesomórfico. Este cambio es un proceso endotérmico que tiene lugar en un intervalo estrecho de temperatura alrededor de una temperatura característica denominada temperatura de transición (T_c), que viene determinada por la naturaleza de las cadenas de ácido graso (de la longitud de las cadenas y de la presencia o no de insaturaciones) y de la cabeza polar del fosfolípido (ver tabla 1).

Durante la transición, al aumentar la temperatura, las cadenas hidrocarbonadas de ácido graso pasan de una configuración "trans" ($L\beta$), donde su libertad de movimiento está restringida, a una isomerización rotacional "trans-gauche" ($L\alpha$) a lo largo de las cadenas de ácido graso, que son móviles.

La condición de estado fluido se debe a varios tipos de movimientos de las moléculas que incluyen la flexión de la cadena hidrocarbonada como consecuencia de la rotación de los enlaces carbono-carbono, el movimiento de oscilación de toda la molécula así como su desplazamiento lateral. Las cabezas polares conservan fuertes interacciones entre ellas. La combinación del tipo de grupo y cadena da lugar a la forma del lípido. Así, los fosfolípidos cuya cabeza polar presenta un área similar a la de las cadenas de ácido graso, en sección transversal, tienden a organizarse en bicapas (por ejemplo las fosfatidilcolinas) . Por otra parte, los lípidos cuya cabeza polar tiene un área superior a las cadenas hidrófobas tienden a organizarse en micelas y los detergentes son un ejemplo de ellos. Estos constan de una sola cadena alquílica, un grupo polar y tienen forma cónica que al agregarse adoptarán una estructura micelar esférica. Ahora bien, si el grupo polar es pequeño, el lípido tiene forma de cono invertido y se organizarán en una estructura tubular, llamada fase hexagonal inversa H_{II} (ejemplo es la fosfatidil etanolamina, PE), donde las moléculas que la forman dirigen sus grupos polares hacia el centro (Eppand,1998).

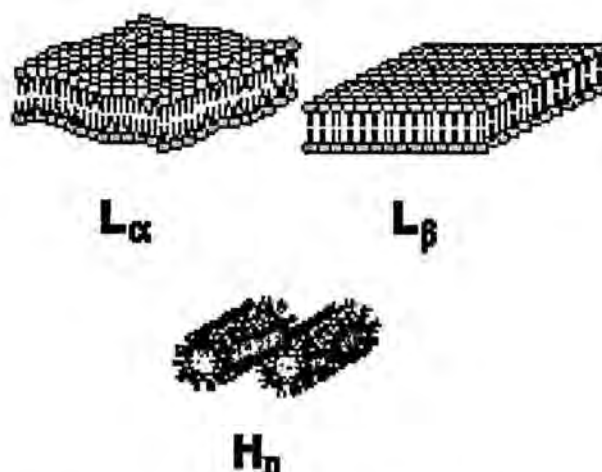


Figura 5 Distintas formas de organización de los fosfolípidos. Arriba, bicapas lipídicas por encima de la T_c (L_{α}) y por debajo de la T_c (L_{β}). Debajo, la fase hexagonal inversa H_{II} . Transición de fase en una bicapa fosfolipídica. Cambios en la fluidez de la bicapa y en la disposición de las cadenas de ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos.

En la figura 5 en la parte superior, se muestran los sistemas lamelares que forman los fosfolípidos en las bicapas de los liposomas en función de la temperatura. Cuando una bicapa lipídica en estado gel (orden) se calienta por encima de la temperatura de transición característica experimenta un cambio de fase, denominado de orden-desorden y pasa al estado cristal líquido (desorden). El resultado de este fenómeno, es una disminución del espesor de la bicapa, ya que aumenta el área por molécula de fosfolípido. Este efecto viene acompañado por una expansión lateral de la misma (transición del estado L_{β} al estado L_{α}). La temperatura de transición es característica de la membrana y depende de su composición, la fuerza iónica y pH del medio, además de la presencia de varios iones o moléculas.

Tabla 1 Carga de los lípidos y ac.graso (SA) empleados en el presente trabajo. Valores de T_c de los fosfolípidos.

TIPO DE LÍPIDO	ABREVIATURA	CARGA	T_c (°C)
Dipalmitoil fosfatidil Colina	DPPC	0	41
Dipalmitoil fosfatidil Etanolamina	DPPE	0	60
Estearilamina	SA	+1	--
Cardiolipina	CL	-2	--
Fosfatidilinositol	PI	-1	--
Dipalmitoil fosfatidil Glicerol	DPPG	-1	41

Durante la preparación de los liposomas es muy importante que la hidratación de los lípidos se haga a una temperatura superior a la T_c del lípido ó mezcla con la que se trabaja, puesto que por debajo de ésta las vesículas presentan una baja capacidad para

encapsular. Asimismo, la movilidad de las cadenas de ácidos grasos es necesaria a fin de que los lípidos se compacten y ordenen correctamente en el momento de formar la bicapa del liposoma. En caso contrario se podrían obtener liposomas con defectos estructurales que pueden influir en su estabilidad.

Por tanto, el comportamiento de los lípidos en este proceso de cambio de fase determina importantes propiedades de permeabilidad, fusión, agregación y unión a proteínas que afectan a la estabilidad de liposomas y a su comportamiento en sistemas biológicos (Hoekstra, 1995).

4.2.3 Métodos de preparación de liposomas

En la bibliografía existen numerosos métodos de obtención de liposomas, pudiendo agruparse en tres grandes grupos:

- Métodos basados en la dispersión mecánica del lípido, que consisten en la disolución de los lípidos en los disolventes orgánicos y posterior evaporación de los mismos. La película formada se hidrata con una solución acuosa mediante agitación mecánica. Este método da lugar a una población heterogénea de liposomas multilaminares (MLV) ($1\mu\text{m}$). A continuación por diversos procesos se obtendrán liposomas de tamaño y número de bicapas deseados: ciclos de congelación y descongelación (Mayer,1985), deshidratación y rehidratación (Kirby,1984), fusión inducida por calcio (Paphadjopoulos,1975), microencapsulación (Mayhew,1984), sonicación en sonda o baño de ultrasonidos (Huang,1969), extrusión por una "Fresh Press" (Barenholz,1979), o a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro determinado (Olson,1979).

- Métodos basados en la dispersión del solvente. Los lípidos se disuelven primero en una solución orgánica. La solución acuosa que contiene los materiales a encapsular, se pone en contacto con la solución de lípidos; posteriormente se elimina la fase orgánica por evaporación. La selección adecuada de la proporción fase acuosa –fase orgánica determina que se formen liposomas unilaminares grandes (LUV) o bien MLVs. Dentro de este grupo encontramos los métodos de inyección de etanol (Batzri,1979), vaporización de éter (Deamer,1976), doble emulsión (Kim,1981) o evaporación en fase reversa (Szoka,1980b). Estos métodos son apropiados para preparar liposomas utilizados en inmunoensayos, dado que su eficacia en encapsulación es alta.

- Métodos basados en la eliminación del detergente. Normalmente por dialisis, de mezclas de detergentes y fosfolípidos (Kagarwa,1971; Zumbuehl,1981). Estos métodos son apropiados para incorporar proteínas a las membranas liposómicas.

El último paso en los tres casos, es la eliminación del material no encapsulado por centrifugación, diálisis o cromatografía.

En este trabajo se han utilizado liposomas unilaminares pequeños (SUV) obtenidos por sonicación, fundamentalmente por el elevado grado de homogeneidad, así como por el pequeño tamaño de las poblaciones obtenidas. Estas propiedades los hacían óptimos, para estudios espectroscópicos por los escasos problemas de turbidez. En los liposomas

preparados con sonda se estudió, la fluorescencia y la polarización de fluorescencia.

4.2.4 Caracterización de los liposomas

Una vez preparados los liposomas y purificados mediante la separación del material no encapsulado (cromatografía de gel-filtración, diálisis, centrifugación,...) se procede a su caracterización. Son factores esenciales para el empleo de los liposomas "in vivo" e "in vitro" su tamaño, homogeneidad, porcentaje de encapsulación, eficacia de encapsulación, volumen interno y estabilidad.

El tamaño y la homogeneidad de las preparaciones se determinan por microscopia electrónica (Szoka,1980a) y por técnicas espectroscópicas de dispersión de la luz, como la espectroscopía de correlación fotónica (*quasi-elastic laser light scattering*) (Wu,1981). Esta es una de las técnicas más utilizadas para tal fin, debido a que cubre una amplia gama de tamaños (3nm-3 μ m) y además, no perturba el sistema en estudio.

El porcentaje de encapsulación se refiere a la cantidad de producto encapsulado respecto a la cantidad inicial empleada y se determina, generalmente, por técnicas cromatográficas.

La eficacia de la encapsulación viene dada por la relación moles de producto encapsulados a moles de fosfolípido en los liposomas. El contenido en fosfolípidos se determina a partir del análisis de fosfato de las muestras (Steward, 1980). Éste es un dato importante, puesto que durante la elaboración de los liposomas se producen inevitablemente pérdidas.

El volumen interno se expresa en litros por mol de fosfolípido y da una idea de la capacidad de encapsulación de cada tipo de liposoma. La mejor manera para calcular el volumen interno es medir la cantidad de agua directamente, lo cual se puede hacer bastante convenientemente reemplazando el medio externo por un fluido inerte espectroscópicamente y midiendo a continuación la señal del agua, por ejemplo, mediante RMN (Pidgeon,1986).

La estabilidad se refiere básicamente a aspectos físicos tales como la agregación, la sedimentación y la pérdida de producto encapsulado, y usualmente se determina midiendo la liberación de un marcador fluorescente soluble en agua (carboxifluoresceína, calceína, fluoresceína, fluoresceína-dextrano, por ejemplo) del interior de los liposomas.

4.2.5 Interacciones liposomas-células "in vitro"

El estudio de la interacción liposoma-célula es un modelo que puede aportar mucha información sobre ciertos procesos biológicos, a la vez que permite orientar sobre su aplicabilidad como transportadores de fármacos. Se han propuesto 4 tipos de mecanismos (ver figura 6):

- a)- Intercambio lipídico: se produce una transferencia entre las moléculas lipídicas

individuales de los liposomas y las de toda la superficie celular, sin que haya contacto entre el citoplasma de la célula y el contenido liposomal. Se ha comprobado que el colesterol de los liposomas se intercambia rápidamente con el de las membranas plasmáticas.

b)- Fusión: consiste en la unión de los liposomas a la bicapa de la membrana plasmática y la subsecuente liberación del contenido de las vesículas al espacio citoplasmático. La evidencia más convincente que refuerza este mecanismo es el hecho de que sustancias biológicamente activas e impermeables a membranas celulares pueden ser introducidas en el citoplasma celular cuando son encapsuladas en liposomas.

c)- Adsorción: asume la asociación estable de liposomas intactos con la superficie celular de manera que no pueden ser eliminados de ahí por lavados sucesivos. Es bastante sencillo, pero difícil de cuantificar. La adsorción máxima de liposomas de DPPC se produce cerca de la Tc de estos lípidos.

d)- Endocitosis / Fagocitosis: se basa en la ingestión de liposomas intactos en vesículas endocíticas, produciéndose a continuación su liberación en el aparato lisosomal.

Una vez vistos los diferentes procesos planteados, parece obvio que el empleo de liposomas como transportadores de fármacos asegura una eficaz y completa distribución de los mismos hacia los destinos propuestos.

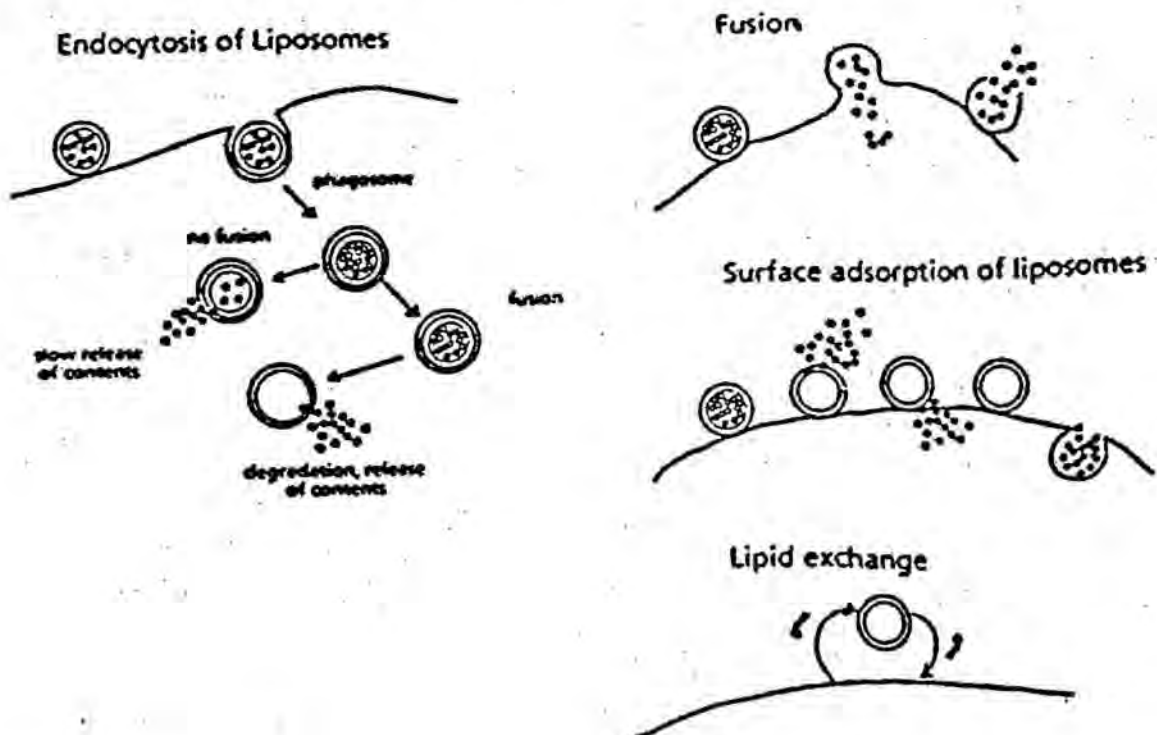


Figura 6 Mecanismos propuestos de interacción liposoma-célula.

4.2.6 Aplicaciones de los liposomas

La investigación actual en el campo de los liposomas se fundamenta en sus dos aplicaciones mayoritarias, por un lado su estudio como modelos de membrana dada su similitud con las membranas biológicas y por otro, en el campo de la farmacología como sistemas de transporte.

Los liposomas son vesículas lipídicas que al estar formadas por materiales biocompatibles y biodegradables se emplean como sistemas de transporte de fármacos. Estos pueden influir en la distribución y metabolismo de muy variados principios activos. Actualmente, el principal objetivo consiste en buscar un diseño que controle la velocidad de llegada de una molécula activa a un compartimento concreto del organismo, su distribución y localización, y la persistencia o velocidad de metabolismo de la misma. Con ello se pretende reducir o eliminar los efectos secundarios de los fármacos por disminución de su nivel en sangre, por la reducción de la dosis evitando la inactivación y excreción prematura y por dirección de los mismos hacia zonas anatómicas o celulares concretas (Gregoriadis,1993).

Un principio activo encapsulado en liposomas queda físicamente separado del exterior mientras el liposoma permanezca intacto y por tanto presentará una serie de ventajas respecto a su uso en forma convencional:

* Prolongación de su vida media: los liposomas permanecen en circulación durante un tiempo mucho más largo que la mayoría de principios activos en forma libre. Su vida media "in vivo" varía de pocos minutos a varios días (Machy, 1987).

* Posibilidad de dirigirlos específicamente al lugar de acción. Este direccionamiento se clasifica en anatómico (basándose en el nivel de selectividad y especificidad hacia un órgano, célula o lugar subcelular) y mecánico (ya sea pasivo, donde el sistema retículo endotelial capta de forma natural los liposomas (Alving,1978), o activo, el cual supone la alteración de los liposomas por una unión con anticuerpos monoclonales, azúcares, glicolípidos, proteínas,... cambiando la composición o tamaño de manera que alcancen lugares de acción predeterminados (Poste,1983).

* Posibilidad de utilizarlos como vehículos de moléculas poco solubles o con problemas de absorción; es posible encapsular en liposomas principios activos que normalmente no pueden penetrar en células y que, consecuentemente, tienen una actividad reducida. Al administrarlos con liposomas varía su biodisponibilidad y perfil farmacocinético.

* Protección de sustancias lábiles: la encapsulación puede proteger el contenido de los liposomas de la respuesta inmunológica o del ataque enzimático por parte del organismo, tal es el caso de fármacos peptídicos (insulina, LH-RH, interferon).

*Reducción de la toxicidad en los tejidos: se previene la acción tóxica de ciertos fármacos antes de que lleguen al lugar de acción. Así, reducen las reacciones de hipersensibilidad en individuos inmunizados con ciertas proteínas. Además los liposomas no se acumulan en corazón y riñones, como hacen ciertos fármacos (Adriamicina,

Doxorrubicina) (Olson,1982) o agentes nefrotóxicos (Anfotericina B) (Forseen,1979), respectivamente. En la actualidad existe para la anfotericina B una formulación basada en liposomas autorizada para su uso clínico.

*Posibilidad de usar los liposomas como mimetizantes de la acción de ciertas estructuras celulares. Como ejemplo puede destacarse el empleo de liposomas con hemoglobina encapsulada para el tratamiento de ciertos casos de anemia.

*Efecto adyuvante de los liposomas: se pueden incorporar antígenos con la configuración apropiada a la superficie de los liposomas, incrementándose su poder antigénico y produciéndose una mayor respuesta inmune (Gregoriadis,1989). Estos antígenos unidos a su superficie pueden unirse a múltiples receptores en células B o ser endocitados rápidamente por macrófagos que induzcan una proliferación celular y mayor producción de anticuerpos. Tal es el caso de la vacuna contra el virus de la hepatitis A (HVA) con virus inactivados, una formulación basada en liposomas para uso clínico.

5. EL PAPEL DE LA MEMBRANA LIPIDICA EN LA INTERACCION PEPTIDO- LIPIDO. MODELOS DE MEMBRANA

5.1 LA MEMBRANA LIPIDICA

La asociación de fosfolípidos con proteínas, péptidos y aminoácidos determina cambios en la conformación y capacidad de asociación de estas moléculas, lo que conduce muchas veces a una modificación de su actividad biológica. Un estudio profundo de estas interacciones puede ser de gran ayuda para la comprensión de muchos de los procesos que tienen lugar en bioquímica, biofísica, medicina, biología, biotecnología, etc.

Sargent y Schwyzer (Sargent,1986) propusieron un modelo de interacción de un péptido biológicamente activo con la membrana como paso previo a la unión al receptor. Según estos autores, la membrana lipídica de las células diana actúa como "catalizador" de la unión del péptido con su receptor específico. Ambos postulan, además, que el receptor reaccionará predominantemente con las moléculas de péptido que se encuentren asociadas a la membrana, en lugar de unirse a las que se encuentran libres en solución. En definitiva, según este modelo, la unión péptido-receptor tiene lugar en etapas, y la energía total de unión es el resultado de las energías de unión correspondientes a cada etapa en concreto.

Por ejemplo, la interacción de péptidos antigénicos con lípidos de membrana de las células del sistema inmune es fundamental en el desencadenamiento de la respuesta inmune. Así, determinados adyuvantes, como los liposomas, actúan favoreciendo la correcta presentación del antígeno a las células T.

5.2 VISIÓN ACTUAL DE LAS INTERACCIONES PEPTIDO-LIPIDO

El estudio de las interacciones entre péptidos o proteínas y lípidos ha experimentado un desarrollo considerable en los últimos años, coincidiendo con la puesta a

punto de nuevos métodos fisicoquímicos. Además, cuando se estudian las interacciones existentes entre los péptidos o proteínas y las membranas naturales, observamos que sólo es posible investigar fenómenos globales puesto que éstas son entidades muy complejas. Ahora bien, si utilizamos modelos de membrana éstos nos permitirán estudiar fenómenos concretos, gracias a su mayor simplicidad y a la posibilidad de controlar sus propiedades fisicoquímicas.

Los modelos de membrana los clasificamos:

* Monocapas: En la técnica de las monocapas podemos escoger la naturaleza de los lípidos, su grado de empaquetamiento, la temperatura de transición de fase y otras variables. Así pues, las capas monomoleculares son sistemas homogéneos, estables y geométricos, donde las moléculas tienen una orientación específica, con lo cuál originan un sistema bidimensional bien definido que posibilita cálculos termodinámicos rigurosos.

* Bicapas planas (BLM): Estas se usan para estudiar los procesos de transporte de iones a través de membranas.

* Liposomas: se utilizan preferentemente en estudios de permeabilidad. Son fáciles de preparar y los podemos usar con técnicas de espectroscopía. Sin embargo, presentan una serie de desventajas puesto que no siempre es posible prepararlos, la variabilidad en cuanto a tamaño y la curvatura rígida de los mismos.

Los péptidos biológicamente activos de un modo general presentan una estructura anfifílica. Asimismo estos péptidos adoptan una estructura secundaria diferente según el medio en que encuentren (Kaiser, 1984; Epanand, 1993). La determinación de su estructura secundaria se puede comprobar mediante técnicas indirectas tales como la asociación a liposomas o la formación de monocapas en la interfase aire-agua (Kroon, 1978). Además existen otros métodos directos como son el dicroísmo circular (Kuwajima, 1995; Venyaminov, 1996), la RMN o la dispersión rotatoria óptica.

Las interacciones que se establecen entre péptidos y lípidos pueden ser de carácter hidrófobo, hidrófilo o mixto, dependiendo de la fuerza de asociación del grupo polar del fosfolípido, de la longitud y/o grado de saturación de las cadenas (Cserháti, 1992)

Así el estudio de interacción entre lípidos y péptidos, utilizando como modelo de membrana los liposomas, se puede llevar a cabo atendiendo diferentes puntos de vista:

*Las alteraciones que produce la bicapa lipídica sobre las propiedades de los péptidos, como por ejemplo la variación de la estructura secundaria de éstos.

*Las alteraciones que producen los péptidos sobre la membrana, como pueden ser cambios en la fluidez de la misma, la creación de poros, o la formación de estructuras de tipo no bicapa.

Dentro de la técnica de monocapas existen numerosas técnicas complementarias como las espectroscópicas, que nos van a permitir una observación directa del comportamiento de fases de péptidos y lípidos durante la compresión de la monocapa, tal

es el caso de la epifluorescencia y el ángulo brewster. Otras como la espectroscopia de infrarrojo nos permite determinar la estructura y la orientación del péptido en la interfase (Brockman,1999). Además, ésta técnica nos permite transferir la película formada a un soporte sólido donde será posible estudiarla por el microscopio de fuerzas atómicas, difracción de rayos X, etc.

5.3 MODELOS DE MEMBRANA:CAPAS LIPIDICAS MONOMOLECULARES

Como ha quedado patente en apartados previos, un gran número de procesos biológicos transcurren en interfases, constituídas básicamente por lípidos y proteínas, teniendo mucho interés en el funcionamiento de las membranas biológicas y en otros procesos como la digestión de grasa en el intestino, el metabolismo de las lipoproteínas y la respuesta humoral, entre otros (Verger,1982).

La bicapa lipídica que constituye la membrana celular juega un destacado papel como superficie que favorece o posibilita la acción de diversas moléculas biológicamente activas (hormonas, enzimas, péptidos opiáceos,...) (Jacobs,1989;Kimura,1992).

Para conocer el funcionamiento de estos procesos tan complejos se han desarrollado diversos sistemas modelo, de los cuales pueden ser destacados especialmente los liposomas o vesículas lipídicas (apartado 4.2.) y las capas lipídicas monomoleculares (monocapas). Estas últimas constituyen un modelo de membrana sencillo, profusamente utilizado para el estudio del comportamiento de los lípidos entre sí o con otras moléculas biológicamente activas. En particular los experimentos de penetración en monocapas, permiten determinar las interacciones existentes entre monocapas lipídicas y péptidos y/o proteínas, proporcionando información que puede ser extrapolable a las interacciones que acontecerían entre estos péptidos o proteínas con bicapas lipídicas, como los liposomas y las membranas celulares (Williams,1989).

Las experiencias realizadas en la interfase aire-agua nos informan sobre la flexibilidad y el carácter tensioactivo de las moléculas objeto del estudio. Este modelo de membrana presenta una ventaja destacable sobre los otros dos existentes (bicapas planas y liposomas), la cual radica en la posibilidad de controlar de forma sencilla la ordenación de las moléculas, cambiando el área molecular y la presión superficial de la monocapa. Los datos obtenidos a partir de la variación de estas medidas dan una información básica acerca de las interacciones lípido-lípido, lípido-subfase o lípido-molécula activa (Verger,1982).

Según la naturaleza de las sustancias se pueden formar dos tipos de monocapas:

a)- Monocapas de adsorción

Muchas sustancias presentan la característica de adsorberse en la interfase aire-agua produciendo un descenso en la tensión superficial del solvente. Este tipo de monocapa se da básicamente en moléculas claramente anfifílicas.

La relación entre la concentración de la sustancia en la interfase (o exceso superficial = Γ) y en el seno del líquido (c) viene dada por la ecuación de la isoterma de adsorción de Gibbs:

$$\Gamma = \frac{-c \cdot d\gamma}{RT \cdot dc} \quad \text{Ec.1}$$

siendo $d\gamma$ la variación de la tensión superficial, dc la variación de la concentración, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Partiendo de esta ecuación, Langmuir (Langmuir,1917) concluyó que las moléculas adsorbidas en la interfase aire-agua se comportan, de alguna manera, como las moléculas de los gases perfectos y adquieren un cierto grado de orientación.

b)- Monocapas de extensión (monocapas de Langmuir)

Al extender sobre una solución soporte una sustancia insoluble en él y no volátil (bien depositándola en forma pura o en solución diluida con un disolvente volátil fácilmente eliminable), se forma una película superficial con un espesor equivalente a una molécula, llamada monocapa de extensión.

Al depositar una gota de un líquido A sobre la superficie de otro B, siendo ambos inmiscibles entre sí, puede ocurrir que la gota se extienda espontáneamente sobre la superficie del líquido o que permanezca en la superficie en forma de gota. En el primer caso, el trabajo de adhesión entre los dos líquidos ($W_{A,B}$) es superior al de cohesión entre las moléculas del líquido (W_C). La diferencia entre estos dos valores se denomina coeficiente de extensión de A sobre B (K), el cual se define termodinámicamente como la relación entre la disminución de la entalpía libre del sistema (G) y el aumento del área de la monocapa (S) a presión (P) y temperatura (T) constantes:

$$K = W_{A,B} - W_C = - \left[\frac{\delta G}{\delta S} \right]_{P,T} \quad \text{Ec.2}$$

Los trabajos de adhesión y cohesión de los líquidos están estrechamente relacionados con las energías superficiales de los mismos. Se producirá la extensión cuando la tensión superficial del líquido soporte B sea elevada y la correspondiente al líquido a extender A sea baja. La monocapa que así se ha formado será estable si existe un equilibrio adecuado entre los grupos hidrófobo e hidrófilo en las moléculas que la forman, de manera que las características de uno sean suficientes para contrarrestar la atracción que experimenta el otro hacia el soporte acuoso, respectivamente.

5.3.1 Presión superficial

Las monocapas o capas monomoleculares presentan una tendencia innata a ocupar la mayor superficie posible, razón por la cual ejercen una fuerza determinada sobre cualquier obstáculo que se oponga a su expansión. Primeramente, a esta fuerza se le asignó un origen similar al que ocasiona la presión gaseosa, considerándose como el resultado de la agitación térmica de las moléculas que forman la monocapa. Al chocar con una barrera

que se oponga a su expansión, estas moléculas ejercen una determinada presión sobre la misma. De aquí deriva el concepto de presión superficial, que se define como la relación entre la fuerza de empuje y la longitud de la barrera.

La presión superficial es un parámetro relacionado en gran medida con la tensión superficial. Si tenemos una cubeta con un líquido soporte, dividida en dos compartimentos separados entre sí por una barrera móvil, y se extiende en uno de ellos una monocapa, ésta realizará una fuerza contra la barrera. Si hacemos avanzar la barrera de forma que se comprima la monocapa, a presión y temperatura constantes, se producirá una variación del potencial termodinámico de Gibbs o entalpía libre (dG), la cual viene dada por la ecuación:

$$dG = \left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{P,T} \cdot dS_m + \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{P,T} \cdot dS_a \quad \text{Ec.3}$$

donde dS_m y dS_a son las variaciones de la superficie ocupada y la superficie libre, respectivamente. Debido a que la superficie total se mantiene constante, es lógico que:

$$dS_a = -dS_m \quad \text{Ec.4}$$

Sustituyendo la ecuación (4) en la (3) obtenemos:

$$dG = \left(\left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{P,T} - \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{P,T} \right) \cdot dS_m \quad \text{Ec.5}$$

En el transcurso de esta variación, la presión superficial ha efectuado un trabajo, por lo que la variación de entalpía libre, calculada a partir del trabajo realizado por el sistema, se puede expresar:

$$dG = -\pi \cdot dS_m \quad \text{Ec.6}$$

Igualando las expresiones (5) y (6) resulta:

$$\pi = \left[\frac{\delta G}{\delta S_a} \right]_{P,T} - \left[\frac{\delta G}{\delta S_m} \right]_{P,T} \quad \text{Ec.7}$$

Teniendo en cuenta que la tensión superficial es, por definición, la variación de entalpía libre por unidad de superficie a presión y temperatura constantes, la expresión anterior puede transformarse en:

$$\pi = \gamma_a - \gamma_m \quad \text{Ec.8}$$

en la que γ_a es la tensión superficial del agua y γ_m es la tensión superficial de ésta tras haber extendido la monocapa.

Concluyendo este razonamiento termodinámico, la presión superficial se puede considerar como la variación de la tensión superficial que se produce en el líquido soporte al extender una capa monomolecular sobre el mismo.

5.3.2 Estabilidad de las monocapas

La estabilidad de una capa monomolecular viene condicionada por la presión de colapso (Lipp,1996) y por la disolución y evaporación de las moléculas que la constituyen.

Cuando comprimimos una monocapa mediante una barrera móvil, llega un momento en que se produce una expulsión considerable de moléculas de la misma. Si la presión se mantiene constante, el área de la monocapa disminuye, y si es el área lo que permanece constante, entonces desciende la presión: es lo que se conoce como punto de colapso, el cual varía con las condiciones experimentales.

Se define la presión de colapso como la mayor presión a la que se puede comprimir una monocapa sin que se produzca una expulsión manifiesta de las moléculas que la componen. También depende de las condiciones bajo las que se realiza la experiencia (temperatura, tipo de sustancia, velocidad de compresión,...). Cuando la presión en la monocapa sobrepasa este valor, la monocapa se destruye (Ries,1959).

A su vez, las moléculas que forman la monocapa de extensión son susceptibles de ser extraídas de la misma por disolución o por evaporación, con lo que la cinética del proceso total de pérdida de materia puede resultar muy compleja. En los sistemas formados por monocapas que no estén firmemente empaquetadas, la barrera de energía que impide que se produzca el fenómeno de disolución es pequeña, y la velocidad de destrucción de la monocapa viene determinada fundamentalmente por la difusión de las moléculas hacia el líquido soporte.

5.3.3 Estados de las capas monomoleculares

Una capa monomolecular puede presentar diversos estados de condensación, análogos a los tres estados de la materia: sólido, líquido y gaseoso (Devaux,1912). Estos estados muestran diferentes grados de libertad u ordenación molecular, dependientes de las fuerzas que actúan en la propia película y entre ésta y la subfase.

Así pues, se pueden definir monocapas en estado gaseoso, en estado líquido expandido, en estado líquido condensado y en estado sólido. En ellas, y por ese orden, las moléculas se encuentran cada vez más alineadas y empaquetadas (ver figura 7), siendo su área molecular cada vez más pequeña al ir comprimiendo, aumentando la fuerza de atracción entre ellas. También en orden creciente aumentan la viscosidad y la presión superficial.

En las representaciones gráficas de presión superficial (mN/m) respecto al área molecular ($\text{nm}^2/\text{molécula}$) a temperatura constante (lo que se conoce como isothermas de compresión) se observa cómo varía la presión superficial en función de la compresión de la

capa monomolecular a cargo de la barrera móvil. Esto es indicativo de la compresibilidad de la monocapa (figura 8). Por tanto las isotermas proporcionan información sobre los diversos estados físicos de las moléculas y sobre su empaquetamiento.

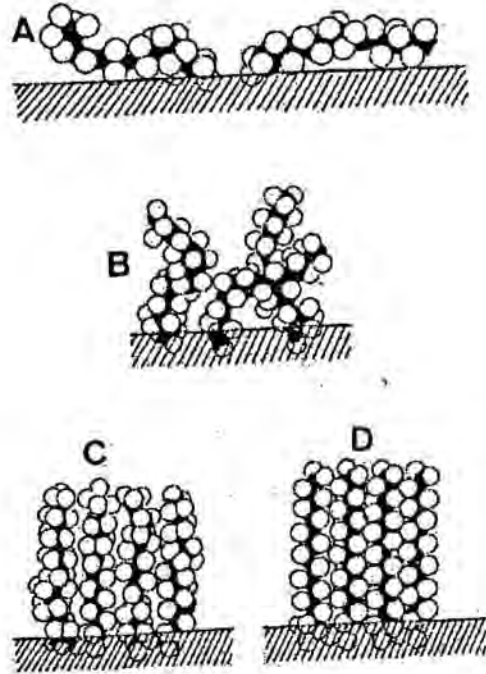


Figura 7 Disposición esquemática de las moléculas en los diferentes estados de agregación de una monocapa en la interfase líquido/gas A) estado gaseoso. B) estado líquido. C) estado líquido condensado. D) estado sólido condensado.

Monocapas en estado gaseoso. Las moléculas están suficientemente alejadas como para que las fuerzas de adhesión (Van der Waals) entre las cadenas hidrofóbicas sean despreciables, de manera que éstas descansan paralelas a la interfase aire-agua. Las cabezas polares se encuentran inmersas en la subfase. La viscosidad es muy baja, así como la presión superficial, que se acerca a cero a medida que aumenta la superficie ocupada por la monocapa. Por otra parte, el potencial de superficie permanece constante.

Monocapas en estado líquido, dentro de la fase líquida podemos considerar dos tipos de películas: la líquida expandida y la líquida condensada.

La fase líquida expandida (LE) posee elevada compresibilidad, y presenta una transición de primer orden a película gaseosa cuando la presión es baja. El interés de esta película radica en el hecho de que se corresponde con el estado cristal líquido $L\alpha$ de las bicapas (Benga, 1985). Si comprimimos la fase LE se pasa a un tipo de película llamada intermedia, de elevada compresibilidad. Es una región de dos fases, con cadenas hidrocarbonadas fluidas (cierto desorden) y otras con cadenas cristalinas. La compresión del tipo intermedio da lugar a una fase de baja compresibilidad. La película en este estado se denomina líquido condensado (LC).

En la fase líquida condensada (LC), las moléculas se encuentran alineadas y

fuertemente empaquetadas. En este tipo de película un incremento de la presión superficial va acompañada de una pequeña variación del área molecular, reflejando la existencia de fuertes interacciones entre los grupos hidrófobos de las moléculas. En las monocapas condensadas las moléculas se orientan con las cadenas cristalinas inclinadas hacia el exterior y los grupos polares permanecen en el soporte acuoso. Esta fase se corresponde con el estado gel de las bicapas ($L\beta$). De acuerdo con algunos autores (Dervichian, 1939) a este estado se le conoce como estado mesomorfo dada su similitud a los cristales líquidos.

Las monocapas en estado sólido (S), representan el estado de máxima compresión de las moléculas en una monocapa. Las cadenas hidrofóbicas se encuentran en conformación *trans*, muy cercanas y fuertemente adheridas por fuerzas de Van der Waals.

Características de las transiciones de fase:

Transición gas-líquido. Es una transición de primer orden, que aparece como un tramo horizontal en la isoterma de compresión. En la película se evidencian dominios de dos fases diferentes.

La transición de líquido expandido a líquido condensado se llama transición principal y se considera de primer orden. Sin embargo, en las isotermas, la transición no es completamente horizontal en la región de coexistencia. Se piensa que la pendiente es debida a la existencia de pequeños dominios microscópicos (unas 150 moléculas) (Albertch, 1978) que inducen una transición cooperativa o a pequeños niveles de impurezas, o a ambos.

Al comparar las transiciones de fase de las bicapas con las monocapas no se puede hacer una conexión directa puesto que la presión superficial es diferente entre ambas y también existe diferencia en la temperatura de transición entre gel-cristal líquido y la transición de LE a LC.

En la figura 8 observamos varios tipos de isotermas de compresión así como la diferente forma de la curva presión/área en cada estado de ordenación de las moléculas.

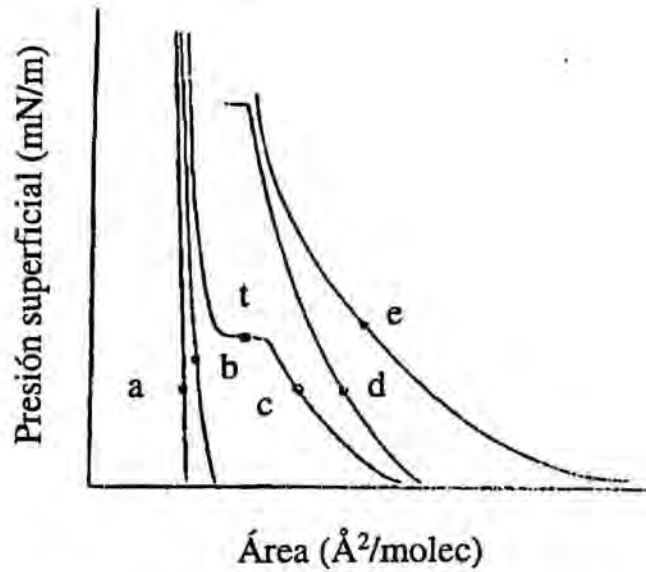


Figura 8 Trazado de isoterma de compresión en distintos estados: a) monocapa sólida, b) estado mesomorfo, c) monocapa que pasa de estado líquido a sólido por compresión, pasando por un estado de transformación t, d) monocapa en estado líquido, y e) monocapa en estado gaseoso.

5.3.4 Estudios en monocapas mixtas

Las monocapas mixtas, constituidas por dos o más componentes, representan un modelo muy válido para el estudio de las interacciones moleculares en un sistema bidimensional orientado debido a su gran analogía con las membranas biológicas.

En este tipo de sistemas se plantean tres alternativas:

- a)- Que los componentes constituyentes de la monocapa mixta sean completamente inmiscibles superficialmente.
- b)- Que sean totalmente miscibles superficialmente (solución superficial ideal) o
- c)- Que sean parcialmente miscibles superficialmente.

En el caso a), siempre que la monocapa esté formada por dos componentes, el sistema podrá ser tratado como si la monocapa mixta estuviera formada por dos monocapas en equilibrio. Si el objeto del estudio es el área ocupada por molécula, las películas monomoleculares formadas por dos componentes cumplen la regla de la aditividad, en los casos a) y b):

$$A_{1,2} = X_1 \cdot A_1 + X_2 \cdot A_2 \quad \text{Ec.9}$$

siendo $A_{1,2}$ el área molecular media de la monocapa mixta, X_1 y X_2 las fracciones molares de los dos componentes, y A_1 y A_2 las áreas moleculares de ambos componentes en estado puro. Esta regla también rige para el potencial de superficie y para la viscosidad

superficial.

Cualquier desviación del cumplimiento de esta regla se ha interpretado como un indicio de la presencia de interacciones específicas entre moléculas o miscibilidad no ideal de los componentes (Gaines,1966a).

5.3.5 Cálculos termodinámicos

Desarrollar un estudio termodinámico del sistema objeto del estudio puede ser útil para concluir si los componentes de una película monomolecular mixta presentan un comportamiento ideal desde la perspectiva de su miscibilidad. Como muestra describiremos el tratamiento de Goodrich (Goodrich,1957).

La variación de la energía libre de Gibbs de un sistema formado por una monocapa viene regida por la ecuación:

$$\gamma = \left[\frac{\partial G}{\partial S} \right]_{P,T,n} \quad \text{Ec.10}$$

siendo γ la tensión superficial y S el área de la interfase de separación de ambos medios. Por otro lado, la relación entre las variaciones de energía libre de Gibbs (∂G) y de la presión superficial ($d\pi$), a presión y temperatura constantes, es:

$$\partial G = -S \cdot d\pi \quad \text{Ec.11}$$

Centrémonos en el caso concreto de dos monocapas simples, constituidas por dos componentes distintos (1 y 2), sometidas a la misma presión superficial y separadas por una barrera móvil. Cuando levantamos la barrera de separación para favorecer el proceso de mezcla superficial, la variación de energía libre de Gibbs por mol a una presión determinada (ΔG_m^π) vendrá dada por la expresión:

$$\Delta G_m^\pi = G_{1,2}^\pi - X_1 \cdot G_1^\pi - X_2 \cdot G_2^\pi \quad \text{Ec.12}$$

donde $G_{1,2}$, G_1 y G_2 son los valores de energía de Gibbs en las películas mixta y formada por los componentes 1 y 2, respectivamente. A su vez, X_1 y X_2 son las fracciones molares de ambos componentes.

En el caso de que se forme una *monocapa mixta ideal*, el potencial químico de cada componente (μ_i) vendrá definido por:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \cdot \ln X_i \quad \text{Ec.13}$$

y el incremento de la energía libre por mol de la mezcla (ΔG_m^I) vendrá dado por:

$$\Delta G_m^I = RT \sum_i X_i \ln X_i \quad \text{Ec.14}$$

Si consideramos una monocapa mixta cualquiera formada por dos componentes, y asumimos que existe un valor de presión superficial suficientemente bajo ($\pi \rightarrow 0$) para el que tiene lugar la mezcla superficial "ideal", podemos afirmar que a esta presión superficial límite se cumple:

$$\Delta G_m^1 = RT \cdot (X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2) \quad \text{Ec.15}$$

Entonces se puede demostrar, según el citado autor que por debajo de la presión de extensión de equilibrio (ESP ó π^e), la ecuación anterior puede escribirse:

$$\Delta G_m^\pi = \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} (A_{1,2} - X_1 A_1 - X_2 A_2) \cdot d\pi + RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2) \quad \text{Ec.16}$$

donde A_1 y A_2 son las áreas moleculares de las dos capas monomoleculares puras y $A_{1,2}$ el área molecular media de la monocapa mixta. Esta ecuación permite calcular la energía libre de la mezcla a partir de las isothermas de compresión de los componentes en estado puro y en la monocapa mixta.

El exceso de energía libre de la mezcla por mol (ΔG_M^{Ex}) viene dado por:

$$\Delta G_M^{\text{Ex}} = G_M^\pi - G_M^1 = \int_0^\pi (A_{1,2} - X_1 A_1 - X_2 A_2) \cdot d\pi \quad \text{Ec.17}$$

Si la capa monomolecular mixta presenta un comportamiento ideal, se deberá cumplir la regla de la aditividad:

$$A_{1,2} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \quad \text{Ec.18}$$

Esta regla también se cumple si la monocapa está formada por componentes totalmente miscibles entre sí, en cuyo caso la $\Delta G_M^{\text{Ex}} = 0$, y la mezcla es ideal.

Ahora bien, si $\Delta G_M^{\text{Ex}} < 0$, significa que los componentes son miscibles y entre ellos existe una fuerte interacción. Cuando $\Delta G_M^{\text{Ex}} > 0$, las interacciones entre los dos componentes en la monocapa mixta son menores que las interacciones que se establecen entre los dos componentes puros, lo que da lugar a una monocapa con dominios de un solo componente.

A partir de las ideas de Joos et al. (Joos,1969), referentes al cálculo de los parámetros de interacción (α) en el punto de colapso, se llega a una expresión que relaciona el parámetro de interacción con el valor de la variable en exceso (ΔG_M^{Ex}) para una monocapa con una composición determinada. De este modo, para el caso de monocapas mixtas de dos componentes:

$$\alpha = \frac{\Delta G_M^{\text{Ex}}}{RT(X_1^2 X_2 + X_2^2 X_1)} \quad \text{Ec.19}$$

6. LA FLUORESCENCIA EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PEPTIDO-LÍPIDO

La fluorescencia es una técnica utilizada frecuentemente por su elevada sensibilidad para obtener información sobre el estado de ordenación de los fosfolípidos en las bicapas lipídicas, así como sobre la influencia que otras sustancias, como los péptidos, ejercen sobre aquellas. Para realizar este tipo de estudios es preciso la presencia en el sistema que se analiza, de un fluoróforo o marcador fluorescente, cuyas propiedades de fluorescencia dependen de su estructura y de las características del medio.

La estructura química de los fluoróforos se caracteriza por ser rígida y poseer un gran número de dobles enlaces conjugados, de manera que al incidir sobre ellas una radiación electromagnética son capaces de emitir fluorescencia.

En la actualidad existen gran variedad de marcadores fluorescentes, lo que permite una gran versatilidad de análisis, alguno de ellos están indicados en la figura 9. Estos fluoróforos se pueden clasificar en: intrínsecos o extrínsecos.

a-Fluoróforos intrínsecos

Un número importante de moléculas poseen un grupo cromóforo formando parte de su estructura. Entre ellas se encuentran los péptidos y las proteínas, entre cuyos constituyentes se encuentran los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano.

La importancia de la fluorescencia intrínseca de estas moléculas radica en la posibilidad de obtener información sobre su conformación espacial. Esto es posible gracias a que tanto la fluorescencia intrínseca del triptófano como de la tirosina son muy sensibles a la polaridad de su entorno y varía al interaccionar los péptidos con otras moléculas como los fosfolípidos que forman parte de los liposomas. En este caso los residuos de los aminoácidos pasan de un entorno polar a otro apolar, originando un desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia del triptófano hacia λ más cortas o *blue shift* (Cowgill,1967). Por otro lado, si estos residuos están más expuestos al medio polar (por ser más superficiales, por ejemplo al desnaturalizarse una proteína), el máximo de emisión se desplaza a λ mayores o *red shift*. Generalmente, los cambios λ máxima de emisión se acompañan con variaciones de la intensidad de fluorescencia, es decir, si se produce un desplazamiento a λ menores, la intensidad se incrementa, pero si aumenta conlleva a la disminución de su valor (Lakowicz,1983a)

b-Fluoróforos extrínsecos

En la mayoría de los experimentos realizados con técnicas fluorescentes para el estudio de la interacción péptido-lípido, se requiere incorporar sustancias ajenas al sistema investigado, llamados fluoróforos extrínsecos. En general, son moléculas aromáticas muy conjugadas que al ser utilizadas como marcadores deben cumplir varios requisitos:

1. El compuesto debe estar fuertemente enlazado a un solo lugar del sistema a estudiar. De este modo obtendremos información de una zona concreta de la bicapa.

2. La fluorescencia del compuesto debe ser sensible a las condiciones ambientales, es decir, ha de ser sensible a las propiedades de membrana que se miden.
3. No debe influir en las características del sistema a medir.
4. Su pureza debe ser elevada, y no sufrir cambios fotoquímicos (fotodegradación, fotodimerización) al ser excitados.
5. Deben ser moléculas altamente fluorescentes, y su espectro de emisión no debe solaparse con los correspondientes al sistema de membrana que se estudia

La incorporación de estos marcadores a la bicapa lipídica se realiza, o bien mezclándolos con los lípidos o por incubación de la sonda fluorescente con los liposomas formados, siempre por encima de la temperatura de transición, a la cuál los lípidos se encuentran en estado de cristal líquido.

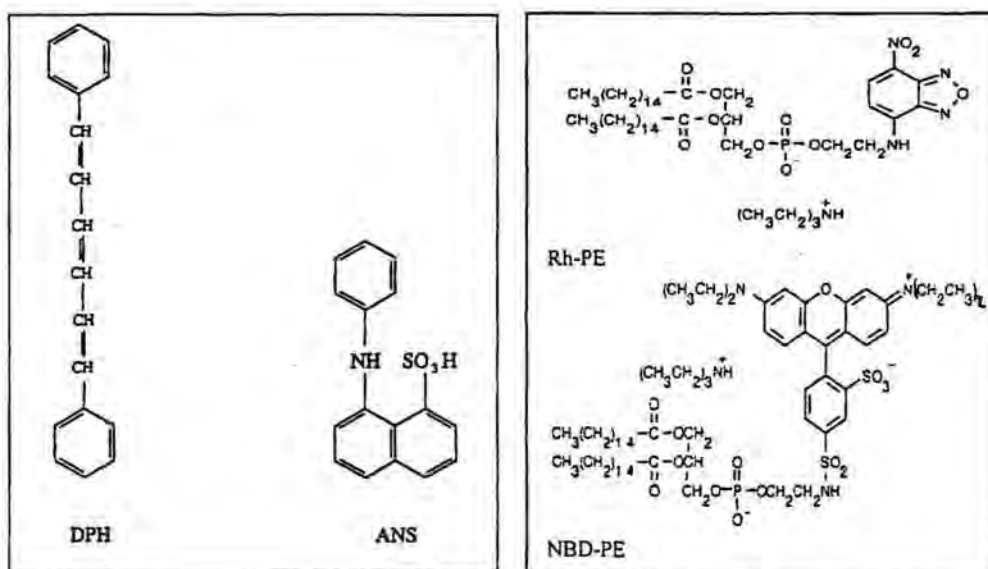


Figura 9 Estructura química de algunos marcadores fluorescentes extrínsecos.

En la parte experimental de este trabajo los fluoróforos extrínsecos empleados en el marcaje de los liposomas son de dos tipos:

1. Sondas que no presentan fluorescencia en disolución acuosa, pero son altamente fluorescentes cuando están unidas a liposomas o membranas lipídicas. Pueden ser sustancias fluorescentes no iónicas como el DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno), o aniónicas como el ANS (ácido 8-anilino-naftalensulfónico), o bien fosfolípidos fluorescentes cuyo grupo fluoróforo está incorporado a la cabeza polar del mismo, NBD-PE (1,2-dioleoil- α -glicerofosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) y Rh-PE (L- α -fosfatidiletanolamina-N-(lisamina-rodamina- β -sulfonilo)
2. Sondas polares que son solubles en agua y tienen una elevada fluorescencia en agua, como la CF (carboxifluoresceína).

6.1 FLUIDEZ DE LA MEMBRANA DETERMINADA POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

La polarización de fluorescencia, esquematizada en la figura 10, refleja la movilidad de las moléculas fluorescentes dentro de la membrana (Slavik,1982) y puede relacionarse con la fluidez del medio. Esta técnica es más simple y en algunos aspectos presenta ventajas sobre ESR (resonancia magnética de spin) o RMN (Shinitzky,1978).

La polarización se define como la diferencia de intensidad de fluorescencia observada cuando los polarizadores de excitación o de emisión están en paralelo, V_v , y en perpendicular, V_h , en el plano de polarización, dividido por la suma de estas dos intensidades:

$$P = \frac{I_{V_v} - I_{V_h}}{I_{V_v} + I_{V_h}} \quad \text{Ec.20}$$

En algunos instrumentos es necesario aplicar un factor de corrección ($G=I_{Hv}/ I_{Hh}$) para compensar la polarización causada por componentes como el monocromador o el espejo de emisión (Bashford,1976), aunque los equipos más avanzados ya llevan incorporado este cálculo.

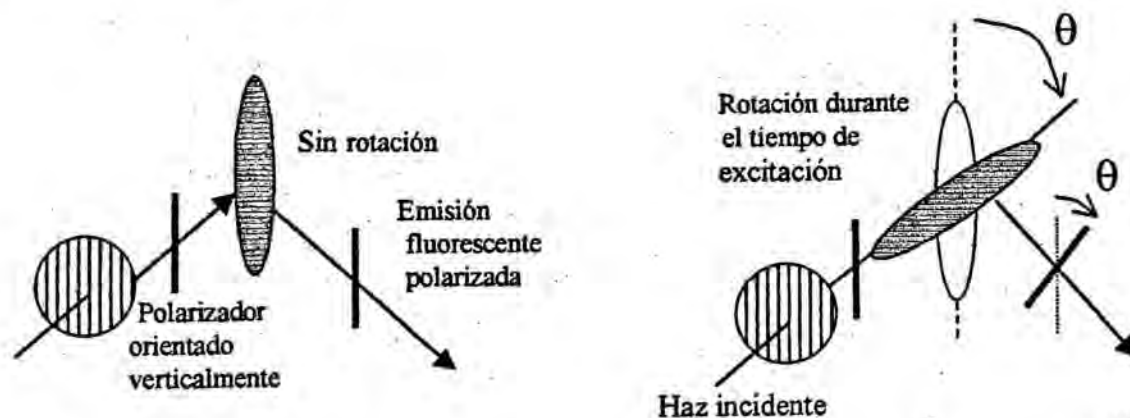


Figura 10 Principio de la espectroscopia de polarización de fluorescencia. Al excitar un fluoróforo con luz polarizada, si el fluoróforo permanece inmóvil en el estado excitado (10^{-8} seg), la emisión de fluorescencia estará también altamente polarizada (izquierda); si por el contrario, el fluoróforo excitado se encuentra en movimiento, la fluorescencia resultante estará menos polarizada (derecha).

La anisotropía de fluorescencia (r) está relacionada con la polarización (P) mediante la expresión :

$$A = \frac{2P}{3 - P} \quad \text{Ec.21}$$

Los fluoróforos empleados en este trabajo para el marcaje de los liposomas en los estudios de polarización han sido el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y el ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS), los cuáles no presentan fluorescencia en H_2O , pero son

altamente fluorescentes unidos a membranas lipídicas o liposomas (Shinitzky y Barenholz 1978; Slavik, 1982).

El DPH debido a su carácter hidrofóbico se sitúa específicamente en la zona apolar de los liposomas (figura 11) (Stillwell, 1992; Schwarz, 1992). Los cambios en la polarización de DPH reflejan cambios en la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos (Van Ginkel, 1989), permitiendo observar el comportamiento del cambio de fase, de gel a cristal líquido, y por lo tanto determinar la temperatura de transición. Cuando la bicapa se encuentra en estado gel hay menor movilidad de las bicapas y el DPH tiene menor libertad de movimiento durante el estado excitado, por tanto la polarización que emite es alta. A medida que la temperatura aumenta y se pasa al estado cristal líquido, la movilidad de las bicapas así como la oscilación del DPH también se incrementa, en consecuencia la polarización disminuye. Esta disminución es brusca alrededor de la temperatura de transición (Williams, 1990). El TMA-DPH es un derivado del DPH con un grupo polar que orienta el fluoróforo paralelo a las cadenas alquílicas de los fosfolípidos (Kaiser, 1998).

El ANS es un marcador fluorescente que interacciona con la región hidrófila de los liposomas (figura 11) (Slavik, 1982; Joshi, 1989) permitiendo evaluar los cambios de fluidez de la membrana, a nivel de la superficie de las cabezas polares de los fosfolípidos (Nam, 1989). La polarización de fluorescencia del ANS es dependiente de la temperatura, si bien el proceso de despolarización se produce de modo más suave y sin cambios bruscos alrededor de la T_c (Bashford, 1976). Esto se debe a su localización en la zona polar externa de la bicapa, que está inicialmente menos estructurada

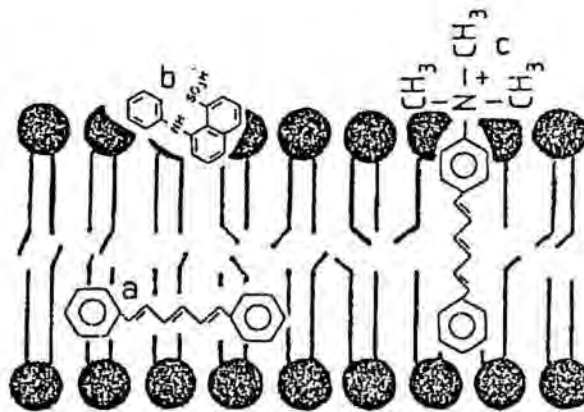


Figura 11 Disposición teórica de los marcadores fluorescentes en la bicapa lipídica utilizados en los estudios de polarización de fluorescencia. a) DPH b) ANS y c) TMA-DPH.

6.2 INTEGRIDAD Y PERMEABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS (ESTABILIDAD)

La detección de la liberación del contenido acuoso de los liposomas como resultado de la lisis, fusión o permeabilización de sus membranas causada por la interacción con péptidos y proteínas, se realiza con marcadores fluorescentes de bajo peso

molecular solubles en agua. Uno de los ensayos más utilizado, es el estudio de la liberación del marcador fluorescente carboxifluoresceína (CF) encapsulado en liposomas por acción de péptidos o proteínas (Weistein,1997). La carboxifluoresceína (figura 12) es un derivado de la fluoresceína, más fotoestable, menos sensible al pH, más fluorescente en agua y además, posee un grupo carboxílico suplementario. En realidad se trata de una mezcla de isómeros conocidos con el nombre de 5(6)-carboxifluoresceína.

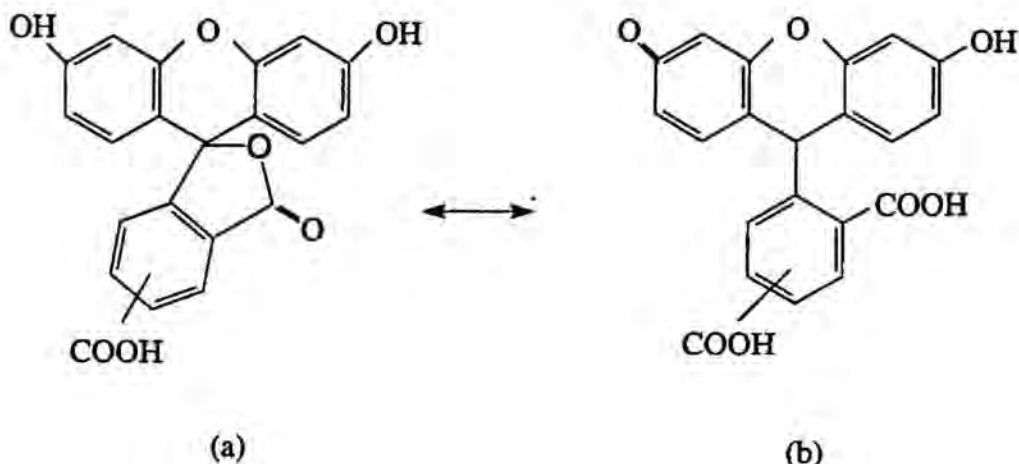


Figura 12 Estructura de la carboxifluoresceína (CF): a) en forma lactona; b) en forma abierta.

Esta molécula presenta las mismas propiedades espectrales que la fluoresceína (λ_{ex} =490 nm y λ_{em} =530 nm), sin embargo es más polar y menos permeable a través de las bicapas lipídicas. Así, la CF está incluida dentro del contenido acuoso de los liposomas y no asociada a las bicapas.

La CF sufre un fenómeno llamado de apantallamiento o *self-quenching*, que resulta útil para distinguir entre la cantidad de sonda fluorescente remanente en el liposoma de la que ha sido liberada de los mismos. En soluciones diluidas la intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína es proporcional al número de moléculas presentes, mientras que si la concentración aumenta por encima de 10 mM, la intensidad disminuye rápidamente debido a la interacción de las moléculas fluoróforas entre sí. De este modo, la intensidad de fluorescencia de los liposomas es muy débil, pero cuando el marcador es liberado del liposoma y se diluye en el medio, la fluorescencia se incrementa hasta más de 30 veces.

6.3 ESTUDIOS DE FUSION

Los liposomas constituyen un modelo simple para estudiar los mecanismos de fusión de membranas. La técnica de fluorescencia es utilizada para monitorizar dicho proceso por su sensibilidad y reproducibilidad.

Los procesos de fusión entre liposomas transcurren con una mezcla de los lípidos de membrana acompañada de la mezcla o liberación de sus contenidos acuosos. La mezcla de lípidos puede detectarse por la transferencia de energía entre dos marcadores fluorescentes. La energía absorbida por determinada molécula (dador) puede ser transferida a otra molécula fluorescente (aceptor) que se encuentra a cierta distancia. Este fenómeno se

conoce como transferencia de energía por resonancia (RET, *Resonance Energy Transfer*). Las condiciones necesarias son:

1. el espectro de emisión del dador debe solaparse parcialmente con el espectro de absorción (o excitación) del aceptor.
2. la distancia entre las dos moléculas debe ser pequeña, del orden de pocos Å. Cada par dador/aceptor presenta una distancia característica en la cuál la transferencia de energía por resonancia es del 50 % del máximo, conocida como distancia de Förster.
3. la transferencia será máxima cuando la orientación de los dipolos del dador y del aceptor están en paralelo.

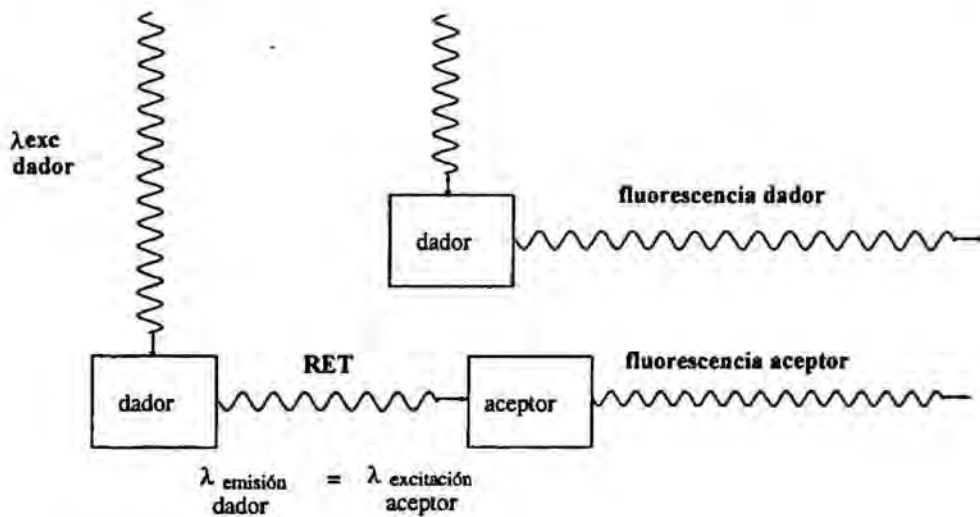


Figura 13 Principio de RET. El dador emite fluorescencia a una λ determinada, la proximidad con otro fluoróforo cuyo espectro de excitación se superpone con el de emisión del dador hace que el aceptor se excite con la energía emitida por el dador, emitiendo a su λ característica.

El ensayo de fusión de membranas por mezcla de lípidos se realiza incorporando en las vesículas fosfolípidos con marcadores fluorescentes unidos covalentemente. Uno de los pares dador/aceptor más frecuentemente utilizado es NBD-Rh (estructura en la figura 9), ambos marcadores unidos al grupo amino de la fosfatidiletanolamina. El ensayo se puede realizar de dos maneras. En el método de dilución los dos marcadores se incorporan inicialmente a una única población de vesículas. La fusión de estas vesículas con liposomas sin marcar da lugar a una dilución de los marcadores y por tanto una disminución de la transferencia de energía por resonancia entre NBD-PE y Rh-PE (figura 14). Una variación del método consiste en incorporar dador y aceptor en diferentes poblaciones de liposomas; si se produce mezcla de lípidos, la distancia entre dador y aceptor disminuirá al mezclarse en la membrana resultante, con lo cuál aumentará la eficacia de la transferencia de energía.

La mezcla de contenidos acuosos por fusión de liposomas es la medida más exacta para determinar si se produce fusión entre ellos, dado que los ensayos de mezcla de lípidos son sensibles también al fenómeno de semifusión dónde las monocapas exteriores se entremezclan sin comunicación de sus espacios acuosos.

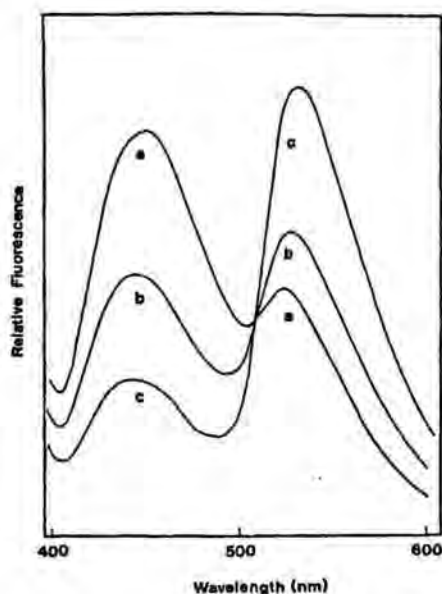


Figura 14 Espectro característico de RET utilizando la técnica de la dilución: a) 100% fusión, b) fusión intermedia y c) 0% fusión.

7. MICROSCOPIO DE FUERZAS ATOMICAS (AFM) EN EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE MEMBRANAS.

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM) se ha convertido en uno de los microscopios más utilizados de manera rutinaria para la obtención de imágenes con resolución atómica (Radmacher,1992). El modo de operación conocido como Modo Tapping (Tapping Mode)(Zhong,1993; Digital Instruments,1998) se ha utilizado ampliamente para la observación de muestras frágiles, blandas o que se verían dañadas de manera irreversible con otros modos de operación del AFM. Ejemplos de muestras biológicas no conductoras son: las proteínas, el ADN (Bustamante,1994; Hansma,1997), las células vivas (Obertleithner, 1995) y los modelos de membrana, como son las películas de Langmuir-Blodgett (LB) o las vesículas lipídicas (Mou,1994; Shibata-Seki,1996).

El estudio por AFM de las películas de Langmuir-Blodgett (películas formadas en la interfase aire-agua y transferidas a un sustrato sólido a una presión superficial determinada) ha suscitado gran interés a causa de sus posibles aplicaciones tecnológicas(Ulman,1991). En particular al hecho de ser utilizadas como modelos de membrana y mediante el empleo del AFM ha permitido estudiar la morfología de las películas con una resolución en el rango de sub- μm (Shinitzky, 1978). Además, se ha podido observar el orden superficial de las películas y el límite de los dominios existentes (Garnaes,1992), así como la separación de fases en sistemas multicomponentes (Solletti,1996)

7.1 TECNICA DE AFM: FUNDAMENTO

El microscopio de fuerzas atómicas se fundamenta en el uso de una sonda, que

resigue a modo de fonógrafo, la superficie de la muestra. La sonda consiste en una microplaca en cuyo extremo se encuentra una punta de dimensiones nanométricas, que es la que interacciona con la muestra. La magnitud que se mide en AFM es la fuerza que afecta a una punta localizada muy cerca de la superficie de la muestra. Para este propósito, la punta está unida al extremo de un cantilever cuya deformación puede ser controlada de varias maneras. La figura 15 muestra la manera más usual de controlar la deformación del cantilever: un haz de luz láser es reflejado en la parte posterior espejada del cantilever y es detectado por una matriz de fotodiodo sensible a la posición del laser. Esta configuración es capaz de medir separadamente la deformación del cantilever debido a las fuerzas de flexión y de torsión. La fuerza de flexión es la fuerza señal utilizada por el sistema de retroalimentación y es la que permite la obtención de las imágenes topográficas de la superficie, mientras que la fuerza de torsión informa sobre las fuerzas de fricción. El barrido en las direcciones x , y , z es efectuado por un piezoeléctrico. Las puntas utilizadas en AFM normalmente se hacen con silicio utilizando técnicas de microfabricación.

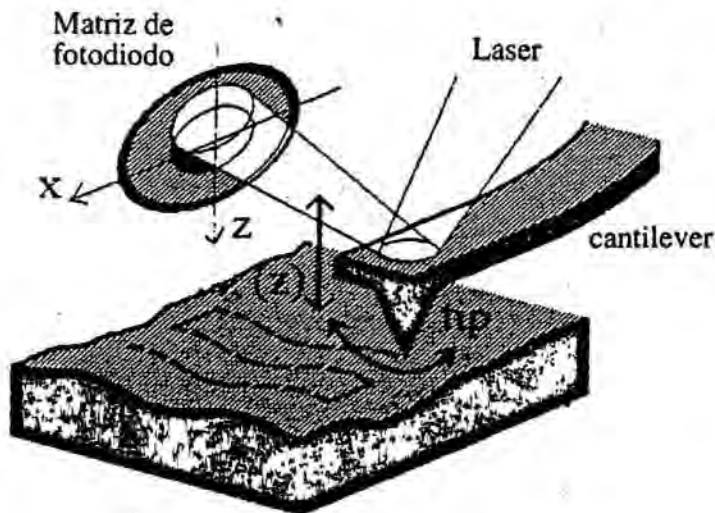


Figura 15 Principio de operación de AFM.

7.2 MODOS DE OPERACIÓN EN AFM

En AFM se pueden distinguir dos modos de operación según la distancia punta muestra a la que se trabaja: el modo atractivo y el repulsivo.

En el modo atractivo, también llamado modo de no contacto se opera en la región atractiva de la curva de fuerzas. El cantilever o la microplaca de AFM se encuentra curvada hacia la muestra.

La operación en la zona repulsiva se conoce como modo de contacto. En este caso, la microplaca se encuentra curvada hacia fuera de la muestra debido a las fuerzas repulsivas.

En una situación de contacto la interacción repulsiva entre punta y muestra se debe a la repulsión de corto alcance entre nubes electrónicas, mientras que en una situación de no-contacto la interacción atractiva se debe a las fuerzas de Van der Waals y las fuerzas

electrostáticas. Según la situación en que se encuentre la punta respecto a la muestra, el AFM puede operar en distintos modos (Gorostiza, 1994).

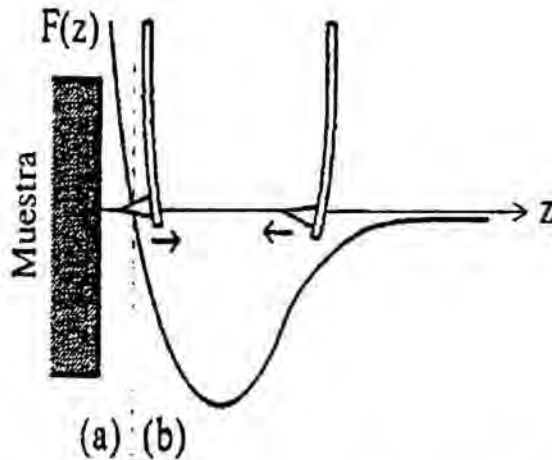


Figura 16 Fuerza experimentada por la punta en su aproximación a la superficie de la muestra.

*Modo contacto o repulsivo. Después de aproximar la punta hasta el contacto con la superficie de la muestra a un determinado valor de fuerza, el sistema de retroalimentación mantiene esta fuerza constante mediante la retracción o aproximación de la punta.

*Modo no contacto o atractivo. Se trabaja con valores de fuerza atractiva (mucho menores que en el modo de contacto). Para aumentar la sensibilidad del cantilever en este rango, el sistema hace que éste vibre próximo a su frecuencia de resonancia, entonces lo que se mide es su amplitud de vibración en lugar de su deformación. En esta situación, la fuerza externa sobre la punta (dependiente de la distancia) causa un desplazamiento en la frecuencia de resonancia o, equivalentemente, una variación en la amplitud de vibración. A partir de la medida de esta variación se puede calcular el gradiente de fuerza externa y así la distancia de la superficie.

*Modo tapping. En este modo de operación la amplitud de la vibración de la microplaca es mayor. La punta mantiene un contacto intermitente con la superficie de la muestra en cada ciclo. También como en el modo contacto, el sistema de retroalimentación se ajusta de manera que la amplitud de vibración de la microplaca se mantenga constante.

La mayoría de las muestras biológicas son muy suaves y elásticas, así que pueden ser deformadas por la punta en el AFM de contacto incluso cuando se emplea una mínima fuerza. Además si la muestra no está fuertemente adherida al sustrato, en el modo de contacto la punta puede fácilmente causar el desplazamiento de las moléculas. El AFM en el modo tapping disminuye significativamente este problema, pues en este caso la punta mantiene un contacto sólo transitorio con la muestra. Como en cada punto del barrido el contacto entre la punta y la muestra es sólo momentáneo, las fuerzas laterales que pueden dañar la muestra son mucho menores que en el modo de contacto. Por esto el modo tapping es actualmente el más utilizado en la microscopía de fuerza atómica de muestras biológicas (Shao, 1995).

Objetivos

OBJETIVOS

La hepatitis A es una enfermedad infecciosa aguda extendida a nivel mundial, y que a pesar de no ser grave, conlleva unos elevados gastos sanitarios y afecta anualmente a 1.4 millones de personas. Puesto que las vacunas existentes, basadas en virus inactivados, son muy caras, existe un elevado interés en el desarrollo de vacunas igualmente efectivas y seguras, pero de coste suficientemente bajo para hacerlas accesibles a los países subdesarrollados, donde la enfermedad se encuentra más extendida. Por otra parte, la mayoría de péptidos y proteínas con actividad biológica, incluyendo los antígenos peptídicos, adquieren su conformación bioactiva al interactuar con la membrana celular, concretamente con el entorno anfipático de la bicapa lipídica. Por ello, el estudio de la interacción péptido-lípido utilizando modelos sintéticos de membrana es de gran interés para determinar las bases estructurales que definen la actividad biológica. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se pretende establecer las bases para el desarrollo de una **vacuna sintética contra el virus de la hepatitis A** basada en péptidos sintéticos.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Sintetizar antígenos peptídicos múltiples (MAPs) basados en varias copias de una misma secuencia peptídica correspondiente a una proteína del virus de la hepatitis A. Se seleccionaran secuencias antigénicas de las proteínas VP1 y VP3 del cápside del virus, y se prepararán construcciones de cuatro de estas secuencias unidas por un núcleo ramificado de residuos de lisina. De esta manera, se persigue incrementar la capacidad antigénica de las secuencias peptídicas sin necesidad de administrarlas conjuntamente con proteínas u otras sustancias inmunoadyuvantes.
2. Estudiar la interacción de estos antígenos peptídicos múltiples con modelos sintéticos de membrana: monocapas en la interfase agua/aire y vesículas lipídicas unilaminares. A diferencia de las membranas biológicas, que presentan gran complejidad, los modelos sintéticos propuestos presentan importantes ventajas, como su simplicidad y la posibilidad de controlar variables como la composición, la curvatura, la presión lateral, etc., aspectos todos ellos de gran relevancia en la interacción de epítomos peptídicos con las membranas celulares. Se prepararán modelos de membrana de tres composiciones, con carga neta positiva, negativa o zwitterionica, a fin de elucidar los componentes electrostático e hidrofóbico en la interacción lípido-péptido.
 - 2.1. La miscibilidad de los componentes lipídicos de los modelos de membrana seleccionados se determinará mediante la técnica de la balanza de Langmuir.
 - 2.2. Monocapas extendidas en la interfase agua/aire: mediante la técnica de la balanza de Langmuir, nos proponemos caracterizar la interacción de los MAPs sintetizados realizando estudios de penetración en la interfase a diferentes presiones superficiales, así como isoterms de compresión de monocapas mixtas péptido/lípido.
 - 2.3. Vesículas lipídicas unilaminares (liposomas): se aplicará una batería de técnicas espectroscópicas para determinar la interacción de los

MAPs con liposomas de las mismas composiciones empleadas en la preparación de las monocapas. Concretamente, se realizarán estudios de fluorescencia intrínseca y extrínseca, de transferencia de energía por resonancia y de polarización de fluorescencia para determinar la unión de los péptidos a las membranas así como los posibles cambios en las propiedades fisicoquímicas de las mismas. La información obtenida podría aplicarse también al diseño de una vacuna sintética donde los MAPs se administrasen incorporados en liposomas, de manera que los epítomos adoptasen la conformación activa que facilitase su reconocimiento por las células del sistema inmune.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y METODOS

A MATERIALES

1. INSTRUMENTACION

La síntesis peptídica en fase sólida se realizó de forma manual en una jeringa estéril de polipropileno, que contenía la alcoxibencilresina.

Las muestras se pesaron en una balanza *Sartorius* con una precisión de 10^{-4} gramos, o bien, en una balanza *Mettler M3* con una precisión de 10^{-6} gramos.

La evaporación de los disolventes de las preparaciones liposómicas se llevó a cabo mediante un rotavapor de la marca *Eyela*, siendo eliminadas las trazas de disolvente en una bomba de alto vacío modelo *EDM 6 de Edwards High Vacuum (BOC Ltd.)*.

El agua utilizada se purificó por el sistema *Milli-Q (Millipore)* hasta una resistividad de $18 \text{ M}\Omega$, y se filtró posteriormente al vacío a través de una membrana *Millipore* con un diámetro de poro de $0.2 \text{ }\mu\text{m}$. Las soluciones tamponadas también se filtraron a través de esta membrana.

Las medidas de pH se hicieron en un pHímetro *Crison*, modelo *micropH 2001*, con célula *Ingold*.

Las agitaciones mecánica y magnética se realizaron mediante agitadores *Vibromixer Mixo-Tub modelo 30 (Gricel)* y *Heidolph MR 2002*, respectivamente, así como en un baño de ultrasonidos *Selecta*.

Las preparaciones liposómicas se sonicaron con una sonda de ultrasonidos *Vibracell modelo VC 300*, de 300 wátios de potencia, dotada de una punta de Ti de 13 mm de diámetro, o bien, se utilizó un baño de ultrasonidos de alta potencia (*Laboratory Supplies, Co*).

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga *Beckmann modelo J2-21* (refrigerado a 4°C), provista de un rotor *JA-20.1*. En el desanclaje del péptido de la resina se utilizó una centrifuga *Beckmann GP Centrifuge*.

Se utilizó una liofilizadora *Telstar* modelo *Lioalfa*, manteniendo durante el proceso una temperatura de -40°C y un vacío de 10^{-1} mbars.

Para las medidas de absorbancia al UV se usó un espectrofotómetro *Ultrospec II (LKB-Biochrom)*.

Los espectros de masas se llevaron a cabo en el Servicio de Espectrometría de Masas del CID, CSIC de Barcelona. Se empleó la técnica de Electrospray-MS, utilizando un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Finnigan (San Jose, CA) *TSQ 700*, equipado con una interfase Analytica of Branford (*Brandford, CT*).

Los análisis de aminoácidos se practicaron en el Servicio de Análisis de Aminoácidos del CID, CSIC de Barcelona, siguiendo la técnica Pico-TAGTM (Waters) y norleucina como estándar interno.

La cromatografía líquida de alta resolución se realizó en un sistema *Perkin-Elmer* consistente en una bomba binaria *LC 250*, un detector de fotodiodos *LC 235*, un integrador *LCI 100* y un inyector *Rheodyne 7125* con un "loop" de 20 μ l. También se empleó un sistema *Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump* con detector de UV *Merck L 4000* y provisto de un inyector *Rheodyne 7125*; el registro e integración de las señales cromatográficas se realizó por medio de un integrador cromatográfico *Merck-Hitachi D-2000*.

Para la cromatografía en columna de exclusión molecular se utilizaron columnas de vidrio de 30 x 2.5 cm.

Las diálisis de las preparaciones liposómicas se realizaron en membranas para diálisis *Visking, 2-18/32"* (*Medicell international*) de tamaño de poro 14000. Para las diálisis de los péptidos se utilizaron membranas *spectrum por 6 tubing MrCutoff 1000*.

Los tamaños de los liposomas fueron determinados por el método de dispersión de la luz (Dinamic light scatterig, DLS), en un *Autosizer IIc Malvern*, o bien, en un medidor de partículas *Coulter N4MD*.

Las incubaciones a distintas temperaturas se realizaron en un baño termostatzado *Tempette^R TE-8A (Techne)*.

La placa calefactora empleada en la determinación de fosfolípidos era una *Kowell T-1*.

Las medidas de fluorescencia y de polarización se leyeron en un espectrofluorímetro *Perkin Elmer LS 50* conectado a un ordenador *Epson PC A - 2*, provisto del programa *FL Data Manager*, o bien, en un espectrofluorímetro *SLM Aminco AB-2* informatizado (programa *SLM*) y con agitador magnético (*SLM-Aminco, Urbana, IL, USA*).

Los experimentos con monocapas se llevaron a cabo en un aparato diseñado en el laboratorio de Físico-Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona (Valls, 1981), según el modelo propuesto por Verger y De Haas (1973), y en un equipo de Langmuir Blodgett *KSV-5000* provisto de electrodo oscilante para la medición del potencial de superficie *KSV5000SP* (80-120 Hz) y de brazo articulado para hacer las extracciones de las monocapas.

Los estudios de AFM se llevaron a cabo en los Servicios Científico-Técnicos de la UB en un Equipo *Extended Multimode Nanoscope III* (Digital Instruments) en el modo de operación *Tapping* (modo amplitud constante) y las imágenes se han obtenido en condiciones ambientales de temperatura y humedad.

Las microjeringas utilizadas para los ensayos de monocapas, son de diversos volúmenes de *Hamilton*, Australia.

2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

El ácido acético y el éter dietílico, empleados para lavar y secar la resina, se adquirieron a *Merck*.

El ácido trifluoroacético (TFA) y el etanditiol utilizados para el desanclaje y desprotección de la resina fue suministrado por la casa (*Fluka*).

Los eluyentes para la cromatografía líquida de alta resolución fueron: acetonitrilo (ACN) para cromatografía (*Merk*) y ácido trifluoroacético (TFA) (*gradient grade*) de *Fluka*.

El agua desionizada fue purificada mediante un sistema Milli-Q (*Millipore*) hasta que su resistividad fue superior a 18 MΩcm.

El cloroformo utilizado para obtener los liposomas y las soluciones para la realización de cinéticas e isotermas fue de calidad analítica (*Panreac*). El tetrahidrofurano (THF) para solubilizar el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) fue de calidad para HPLC (*Merck*).

Los fluoróforos utilizados fueron 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) de *Fluka*, ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANS) de *Sigma*, carboxifluoresceína (CF) de *Eastman Kodak*, 1,2-dioleoil- α -glicerofosfoetanolamina-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) (N-NBD-PE) y L- α -fosfatidiletanolamina-N-(lisamina-rodamina- β -sulfonilo) (N-Rh-PE) de *Avanti Polar Lipids*.

Como detergente para romper los liposomas en los ensayos de latencia se empleó Tritón^R X-100 (*Fluka*), y en los ensayos de estabilidad o fusión se utilizó desoxicolato de sodio (*Fluka*)

Como agente reductor se utilizó hidrogenosulfito sódico (Ditionito, $S_2O_4^{2-}$), de *Fluka*.

Para la preparación de solución tamponada de fosfatos (PBS) se utilizó cloruro sódico para análisis, fosfato monosódico dihidrato purísimo y fosfato disódico dihidrato para análisis todos de *Panreac*. Acetato sódico anhidro para análisis (*Merck*), para la realización de la solución de acetato de sodio (TAC), y en la preparación del tampón Tris se empleó (hidroximetil)-aminometano (trometanol) para análisis (*Merk*).

En la determinación cuantitativa de fosfolípidos; para preparar la solución para la prueba de fosfatos se usaron hidrogenofosfato monosódico (*Merck*), molibdato amónico calidad reactivo especial (RS) (*Carlo Erba*), vitamina C o ácido ascórbico purísimo para análisis (*Fluka*), y ácido perclórico al 70% (para análisis) de *Panreac*.

Asimismo se utilizaron anhídrido acético purísimo, ácido acético glacial purísimo,

y urea para análisis (*Merck*). Las soluciones utilizadas para neutralizar el pH se prepararon a partir de hidróxido sódico (*Carlo Erba*) y el ácido clorhídrico fumante 37% (*Merk*).

3. LIPIDOS

Se emplearon los siguientes lípidos suministrados por *Sigma*: dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidilglicerol (DPPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), fosfatidilinositol (PI) de origen vegetal, estearilamina (SA) y fosfatidilglicerol (PG) de huevo, todos ellos utilizados sin purificación previa.

4. SOLUCIONES

Solución de acetato, TAC (pH=7.4): se preparó una solución de acetato sódico 0.25 M y se ajustó hasta el pH requerido con ácido acético 0.1 M.

Solución tampón fosfato, PBS (pH=7.4): se mezclaron 0.28 g de cloruro sódico, 0.23 g de fosfato monosódico dihidrato y 1.15 g de fosfato disódico en 100 ml de agua destilada desionizada por el sistema Milli-Q (Millipore), ajustándose el pH con una solución de hidróxido sódico 0.1 M.

El tampón Tris 0.01M (pH=7.5) se obtuvo a partir de 24.2 mg de Tris-(hidroximetil)-aminometano en 200 ml de agua miliQ. La solución se desgasó y se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno. La solución del reductor ditionito ($S_2O_4^{2-}$) 1.44 M (pH=11) se preparó disolviendo 25 mg en 100 μ l de tampón bicarbonato sódico desgasado, esta solución debe conservarse en frío durante una hora como máximo.

Al preparar el tampón bicarbonato sódico Na_2CO_3 0.5M (pH=11), se pesó 10.6 g de bicarbonato sódico en 200 ml de agua miliQ.

Para preparar la solución deoxicolato 0.033M se pesó 1.37 g de deoxicolato y se diluyó en 100 ml de agua miliQ.

Solución de Tritón X-100: se pesaron 10 g de Tritón y se diluyeron en acetato sódico hasta obtener una solución al 10%.

Solución para la cuantificación del fosfolípido:

La solución A: 2 g de molibdato amónico y 16 ml de ácido perclórico al 70% llevados a 45 ml de agua milli-Q. La solución B: 2 g de ácido ascórbico disueltos en 80 ml de agua. Se mezclaron y se enrasó a 200 ml con agua.

Solución de urea 8 M y Tris-HCl 0.1 M: se pesaron 480.5 g de urea y 12.11 g de Tris para 1 l de agua.

Solución de NH_4HCO_3 para diálisis: se pesaron 0.788 g de producto para 1 l de agua.

Solución de ácido acético 0.1M se tomaron 5.7ml de ác. acético glacial para 1 l de agua miliQ.

B METODOS

1. OBTENCION DE LOS SISTEMAS MAPS

1.1 SISTEMA MAP₄VP1(11-25)

A partir de la MAP₄VP1-Resina sintetizada en el Departamento de Química de Peptidos y Proteínas, del I.I.Q.A.B-C.S.I.C se procedió al desanclaje del péptido. En primer lugar se procedió a la eliminación simultánea de los grupos Fmoc protectores de las cadenas laterales, con piperidina/DMF 20%. Seguidamente se trató la peptidil-resina en un recipiente con TFA/H₂O (95:5) durante 2h, con agitación cada 10 min. Tras recoger el filtrado y evaporar el ácido con corriente de nitrógeno, se precipitó el péptido con éter dietílico. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min (unas 4 ó 5 veces) decantándose el sobrenadante. Finalmente se disolvió el péptido en H₂O y se liofilizó para obtener el producto sólido (crudo).

Una vez obtenido el péptido crudo se procedió a su purificación mediante diálisis (Spectrum por 6 tubing MrCutoff 1000) ante una solución de urea 8 M y Tris-HCl 0.1 M (pH=8), durante 24h a 4^oC (3 cambios); después en una solución de ácido acético 0.1 M durante 8h (2 cambios) para eliminar la urea.

El producto obtenido se liofilizó y caracterizó por HPLC en fase reversa, análisis de aminoácidos (AAA) y espectrometría de masas por electrospray (ES-MS).

1.2 SISTEMA MAP₄VP3 (110-121)

El péptido se ha sintetizado en el I.I.Q.A.B-C.S.I.C. por el grupo de la Dra. Isabel Haro. Procedemos al desanclaje del sistema peptídico a partir de la MAP₄ VP3-resina. En primer lugar se eliminaron los grupos Fmoc protectores con piperidina/DMF 20%, y seguidamente se añadió sobre la peptidil-resina el cóctel ácido formado por TFA:Etanditiol:H₂O (85:10:5,v/v/v) durante dos horas y media a temperatura ambiente. Después de separar la resina y lavar varias veces con éter, se secó con vacío y el péptido crudo se precipitó con éter. Al final se disolvió con agua y se liofilizó para obtener la muestra sólida.

La muestra obtenida con el fin de purificarla se dializó (Sepctrum Por 6 tubing Mr Cutoff 1000) ante una solución de urea 8M y Tris-HCl 0.1M durante 24 h. a 4°C. Después se lavo 4 veces con una solución de ácido acético 0.1M durante 5-6h para eliminar la urea.

El péptido crudo se liofilizó y se caracterizó por HPLC analítico en fase reversa, análisis de aminoácidos y ES-MS.

2. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN MONOCAPAS

2.1 TECNICA INSTRUMENTAL EMPLEADA EN MONOCAPAS

2.1.1 Elección del disolvente

Con el propósito de obtener monocapas óptimas, es necesario considerar el proceso de extensión de la misma, los factores que afectan a su formación y tener evidencia de su estructura molecular. La mayoría de las veces, las sustancias potencialmente formadoras de capas monomoleculares precisan de los llamados disolventes de extensión, que facilitan la determinación de la cantidad de producto a extender. Las características que debería cumplir un disolvente de extensión ideal son:

- * Tener suficiente poder disolvente.
- * Ser químicamente inerte con la sustancia que forma la monocapa y con la subfase.
- * Ser fácilmente purificable.
- * Presentar elevada volatilidad.
- * Ser poco soluble en agua.

Sería deseable que el disolvente facilitase la etapa de extensión y que a continuación desapareciera de la interfase por evaporación. Para ello se escogen disolventes de punto de ebullición entre 40 y 50^oC.

El disolvente usado en el presente trabajo para disolver las sustancias formadoras de monocapas fue el cloroformo.

En la técnica de monocapas se han utilizado dos aparatos tipo langmuir diferentes.

2.1.2 Instrumento de medida de diseño propio

Las determinaciones se han realizado con un manómetro superficial del tipo Langmuir, diseñado en nuestro laboratorio, cuyo modelo se basa en el modelo propuesto por Verger y De Haas (Verger et al. 1973). El equipo responde a una doble finalidad:

1- Medida y registro continuo de la tensión superficial en función del área ocupada por la monocapa (isotermas de compresión o curvas de presión-área).

2- Registro de los procesos cinéticos en superficie a área y presión superficial constantes.

La tensión ejercida por la lámina de Wilhelmy sobre la electrobalanza se convierte en impulsos eléctricos en la unidad de control de la misma. El valor de la tensión eléctrica obtenido es proporcional a la tensión superficial del líquido y se transmite con la sensibilidad adecuada a la entrada de electrodo de un potenciómetro de lectura digital, el

cual está a su vez conectado a un registrador gráfico. De este modo, es posible registrar gráficamente, y en función del tiempo, los valores de tensión eléctrica (mV) procedentes de la electrobalanza, los cuales son a su vez proporcionales a los valores de tensión superficial del líquido problema.

Se han utilizado dos tipos de cubeta según la determinación efectuada: actividad superficial y cinéticas de penetración a área constante o isotermas de compresión.

a) Los estudios de actividad superficial y de cinéticas de penetración se realizaron en una cubeta cilíndrica de politetrafluoroetileno (Teflón) de 70 ml de capacidad, diseñada también en el laboratorio. Para facilitar la incorporación de sustancias en la subfase, la cubeta dispone de un orificio lateral con el que se pretende no alterar el estado de la monocapa. El reducido tamaño de la cubeta permite disminuir la cantidad de lípido a emplear para formar la monocapa.

b) Las isotermas de compresión se han realizado en una cubeta fabricada con Teflón, de dimensiones 28,4 cm de largo x 17,45 cm de ancho x 0,625 cm de profundidad, instalada sobre un soporte sólido de acero. La cubeta tiene una superficie de 495 cm² y un volumen de 330 ml. Sobre los bordes de esta cubeta se desliza una barrera móvil de Teflón sobre un borde de cobre, que permite la compresión o expansión de la monocapa, de manera que la superficie que ocupa la monocapa vendrá condicionada por la posición de la barrera móvil.

2.1.2.1. Isotermas de compresión

Primeramente se prepararon, las diferentes soluciones de fosfolípidos puros de DPPC, SA y PI; las mezclas de DPPC-10% PI y DPPC-5% SA; después las mezclas de los fosfolípidos DPPC, DPPE y CL en cloroformo a diferentes fracciones molares de ambos componentes: 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100. Se llenó el compartimento reservorio con 330 ml de solución tampón pH=7.4 (PBS), con y sin el péptido MAP₄ VP1.

Seguidamente se colocó la barrera en un extremo y se procedió al lavado superficial, consistente en succionar la superficie mediante una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío a la vez que se desplaza manualmente la barrera de un extremo al otro de la cubeta. Este proceso se repitió en tres ocasiones antes de cada determinación y en diferentes sentidos de avance de la barrera. Luego se conectaron los agitadores mecánicos y se puso la lámina de Wilhelmy en contacto con la superficie de la solución tampón accionando el mecanismo de desplazamiento vertical de la microelectrobalanza.

Tras equilibrar la balanza, o sea, cuando se alcanzó un valor fijo de mV en el potenciómetro, se situó la pluma del registrador en el punto de inicio del papel, que corresponde a una presión superficial nula del mismo. A continuación se extendió mediante microjeringas de precisión Hamilton (de una sensibilidad de 0.1 µl) un volumen exactamente medido de la solución de lípido o de mezclas lípidos a estudiar. En los estudios con péptido, éste se incorporó previamente unos 5 min aprox. en la subfase.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para la estabilización de la monocapa (5 min) se puso en marcha simultáneamente el motor de avance de la barrera móvil y el papel

de registro (a una velocidad de $4.2 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$), obteniéndose un registro de la variación de mV procedentes de la electrobalanza con respecto al tiempo. Las variaciones de mV fueron luego transformadas en valores de presión superficial (π) en $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y el tiempo en área molecular en unidades de $\text{nm}^2\cdot\text{moléc}^{-1}$, consiguiéndose así las curvas de presión-área o isothermas de compresión.

La sensibilidad de la electrobalanza fue tal que la variación de $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ correspondía a 4.02 mV . El sistema se calibró a partir de una solución de ácido esteárico, cuya isoterma es bien conocida y se caracteriza por una transición de fase exactamente de 25 mN/m en agua pura a 20°C .

2.1.2.2. Cinéticas de penetración a área constante

Los estudios de determinación de la actividad superficial de los péptidos se realizaron en la misma cubeta. Se inyectaron concentraciones variables y crecientes de los mismos, determinándose la presión superficial en función del tiempo. La concentración a la que se alcanzó el equilibrio de saturación fue la que se inyectó en los estudios de penetración a área constante.

Se prepararon disoluciones de los lípidos en cloroformo de concentraciones del orden de 1.40 mM . En las determinaciones a área constante se registró el incremento de presión superficial, producto de la incorporación a la superficie de sustancias disueltas previamente en el soporte, frente al tiempo.

Para estos estudios se utilizó una cubeta de 70 ml de capacidad (ver apartado 2.1.2.), que contenía la subfase en agitación continua. Sobre ella se sumergió la parte inferior de la lámina de Wilhelmy hasta que se obtuvo en el potenciómetro un valor comprendido entre 294 y 290 mV .

Seguidamente se extendió la monocapa con una microjeringa de forma que la presión superficial inicial (π_i) alcanzase el valor deseado de 5 , 10 o $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Tras dejar pasar un reducido tiempo de estabilización se procedió a la inyección en la subfase de un volumen concreto ($100 \mu\text{l}$) de solución de $\text{MAP}_4\text{VP1}$ (0.19 mM) o bien, el mismo volumen de solución peptídica $\text{MAP}_4\text{VP3}$ (0.15 mM) y al accionamiento del mecanismo de avance del papel.

2.1.3 Balanza de Langmuir-Blodgett

El equipo utilizado para realizar los estudios de miscibilidad de las mezclas lipídicas solas, de las mezclas péptido-lípido y de las películas de Langmuir-Blodgett transferidas a un soporte sólido ha sido un KSV LB5000 (KSV, Finland). En este equipo la presión superficial se determina por el método de Wilhemy (sustrato de platino) y se regula mediante dos barreras, controladas mediante ordenador, que se mueven simétricamente.

La cubeta para realizar las isothermas de compresión y la transferencia de las monocapas lipídicas es de teflon rectangular, con un área disponible de 17000 cm^2 y 1000

cm³ de volumen.

El equipo, que permite la transferencia de las películas L-B a un soporte de mica, se basa en un brazo de teflon en cuyo extremo se halla una pinza que permite sujetar el sustrato, así como introducirlo en la subfase líquida, y extraerlo de la misma. El movimiento de todos los componentes del equipo puede realizarse tanto mediante la unidad de control manual, como desde el ordenador que lleva asociado el equipo.

2.1.3.1. Isotermas de compresión

Las isotermas de presión superficial respecto al área molecular media proporcionan información acerca del estado de ordenación de las moléculas en la monocapa, y de las transiciones de fase que experimentan. En primer término se realizaron las isotermas de los lípidos puros utilizados DPPC, PI y SA, después se prepararon las isotermas mixtas de los mismos lípidos para estudiar su miscibilidad. A partir de las isotermas mixta se escogieron las composiciones lipídicas siguientes: neutra DPPC, aniónica DPPC-PI (9:1) y catiónica DPPC-SA (9:1) con las que posteriormente se estudió la interacción con los sistemas peptídicos.

Primeramente se prepararon las mezclas lipídicas de DPPC, DPPC-SA (9:1) y DPPC-PI (9:1), a partir de las soluciones madre clorofórmicas de los diferentes lípidos a una concentración 1.36 mM. Al estudiar la miscibilidad de los péptidos, MAP₄ VP1 (9.5 mM) y MAP₄ VP3 (8 mM), con las tres mezclas lipídicas se prepararon diferentes fracciones molares de ambos componentes 100:0; 96:4; 90:10; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80; 0:100; para ello se solubilizaron los péptidos con DMSO (<4% en la concentración total), posteriormente, se diluyeron con cloroformo hasta la concentración antes citada, y después se mezclaron con las soluciones lipídicas a las proporciones deseadas antes de extender la película.

Se llenó la cubeta de teflon de un litro de capacidad con un área superficial disponible de 750 cm² con 850 ml de solución tampón PBS a pH=7.4. Para la obtención de las isotermas se depositaron 50 µl de las diferentes soluciones clorofórmicas en la interfase aire-solución tampón PBS, gota a gota. Se dejó evaporar el cloroformo durante 10 min y se inició la compresión de la monocapa a una velocidad constante de 10 mm/min hasta alcanzar el colapso. La temperatura de trabajo fue de 25°±1°C. Cada isoterma se obtuvo con tres muestras diferentes, con una variabilidad de 0.05 nm²/molécula.

El equipo utilizado, KSV-5000, proporciona la representación gráfica de las curvas presión superficial frente al área media molecular de las mezclas lipídicas que forman la película. Esta área se calcula a partir del volumen de solución utilizado para la extensión de la monocapa, de su concentración y del área disponible. La calibración de las áreas moleculares medias se realizó con dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), por estar su isoterma bien descrita (Benga, 1985; Birdi, 1986)

2.2 TECNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA EN EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATOMICAS (AFM)

La obtención de las imágenes topográficas de alta resolución de películas de Langmuir-Blodgett sobre mica se han realizado con un microscopio de fuerzas atómicas.

El equipo utilizado es un *Nanoscope III* Extended Multimode Atomic Force Microscope (*Digital Instruments, Santa Barbara, CA*), con resolución lateral de 5nm y resolución axial de 0.01nm. El escáner permitía un área de barrido máxima de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ en el plano xy, y de $1 \mu\text{m}$ en el eje z. Las imágenes se han obtenido en Modo Tapping, utilizando microplacas de silicio microcristalino (*Points Probes, Nanosensors, Wetzlar-Blankenfeld, Germany*) con una frecuencia de resonancia típica entre 38-74 N/m, y una constante de fuerza 270-377 KHz. Las imágenes de AFM en aire se han obtenido en condiciones ambientales de temperatura e humedad. Los sustratos de mica utilizados son del tipo *ASTM-V2 Green mica (Asheville-Schoonmaker Mica Co, Virginia, USA)*. Las imágenes se han tratado con el software *Nanoscope' off-line*. Este software permite realizar el estudio de alturas, anchuras y rugosidades de las diferentes zonas de la muestra, así como la representación de las imágenes tanto en dos como en tres dimensiones.

2.2.1 Preparación de la película de Langmuir-Blodgett (LB), para la transferencia

Las películas monomoleculares de lípidos pueden ser extraídas de la interfase aire-agua y depositadas sobre un sustrato sólido, siguiendo el método original de Langmuir (Langmuir, 1920).

2.2.1.1. Factores que determinan la calidad de una película

La subfase tiene un papel importante en la calidad de la película depositada. El agua pura es el líquido más favorable, por su elevada tensión superficial. Además, también es importante controlar el pH y la temperatura de la subfase.

La calidad de la superficie del sustrato al igual que su composición química (carga superficial) ejercen influencia sobre la película depositada. Así, mientras que en algunas ocasiones se utiliza vidrio por no imponer ningún orden a la película (Shih, 1993) ya que es un sustrato desordenado, en otras se utiliza mica o grafito para que el sustrato sea hidrofílico o hidrofóbico, respectivamente.

La velocidad de compresión de la monocapa y la velocidad de emersión del sustrato son también importantes.

2.2.1.2. Método de preparación de las películas.

Los experimentos se llevaron a cabo con diferentes soluciones clorofórmicas de mezclas fosfolipídicas DPPC, DPPC-PI (9:1), DPPC-SA (9:1), a una concentración 1.36 mM. En la subfase aire- agua se inyectó $50 \mu\text{l}$ de la muestra, mediante una microjeringa

Hamilton (sensibilidad $0.1 \mu\text{l}$). El método consiste en depositar gota a gota sobre la superficie de agua todo el volumen, evitando depositar gotas cerca de la balanza de platino con el fin de evitar la formación de película lipídica sobre ella. Se dejó evaporar el cloroformo durante 10 minutos, y a continuación, se comprimió la monocapa a una velocidad de 5 mm/min hasta alcanzar la presión deseada para la deposición, en éste caso la de 15 mN/m . En los primeros momentos previos a la deposición, la velocidad de movimiento de las barreras es menor a 1 mm/min . Normalmente se tarda entre 10 y 15 minutos en alcanzar la estabilidad de la película, es decir cuando las barreras se mueven a la velocidad de 1 mm/min (indicativo de estabilidad) (George, 1992).

En éste punto se procede a la transferencia de la película formada sobre un sustrato de mica de dimensiones $1.2 \times 1.2 \text{ cm}^2$ de lado (figura 17). Para ello, la mica se exfolia por ambas caras y se sumerge en la subfase de agua previamente a la deposición de la solución clorofórmica de los lípidos en la interfase aire-agua. La transferencia de la película se realiza al extraer la mica del interior de la subfase a una velocidad de 0.1 mm/min . Se observó que dicha velocidad era la más adecuada, tras ensayos a varias velocidades. La presión superficial se mantuvo constante durante todo el proceso de transferencia debido al sistema de retroalimentación de las barreras. Las muestras se guardaron en un desecador hasta el momento de examen, típicamente el día siguiente a la transferencia.

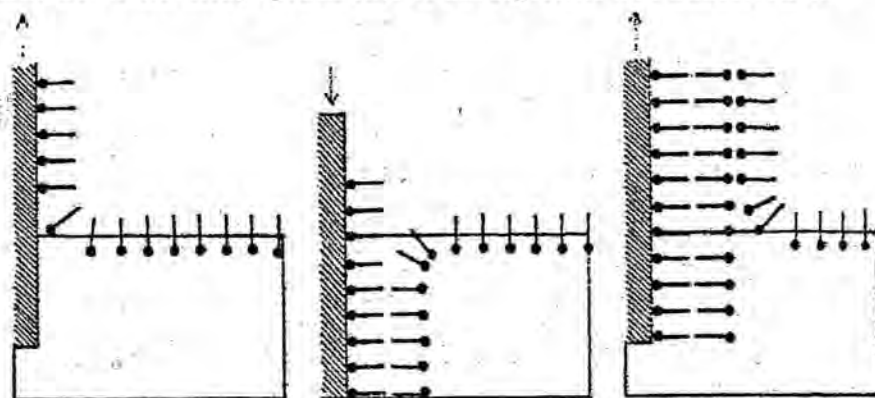


Figura 17: Representación esquemática de la transferencia de una monocapa (izquierda), de una bicapa (centro) y de tres capas (derecha) a un sustrato sólido (Birdi, 1989).

3. ESTUDIOS FISICOQUIMICOS EN BICAPAS

3.1 CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS

3.1.1 Determinación cuantitativa del fosfolípido

A lo largo del proceso de preparación de los liposomas tienen lugar pérdidas inevitables de fosfolípido por: formación de pequeños aerosoles durante la sonicación, por procesos de centrifugación o diálisis, entre otros motivos. Por ello es fundamental conocer la cantidad de lípido contenido en los liposomas una vez preparados. En este trabajo se siguió el método de M^cClare (1971), que cuantifica el fosfolípido de manera indirecta valorando el contenido de fósforo colorimétricamente. Para ello es necesario preparar:

* Reactivo: soluciones A y B mezcladas isovolumétricamente (ver apartado 4 de *Materiales*).

* Solución patrón de fosfatos: como patrón inorgánico se empleó Na_2HPO_4 secado hasta peso constante a 110°C . Se preparó una disolución de $14.48 \mu\text{g/ml}$ en agua (equivalente a $3.15 \mu\text{g/ml}$ de fósforo).

Primeramente se prepararon las disoluciones precisas de la solución patrón de fosfatos para obtener la recta de calibrado. A tal propósito se pipetearon 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, y 1.5 ml de solución estándar en tubos de Pyrex, correspondientes a 2.55, 5.10, 7.65, 10.20 y $15.30 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ de fósforo, respectivamente.

Por otro lado, se prepararon las muestras de liposomas a valorar pipeteando en tubos del mismo tipo que el anterior el volumen de liposomas preciso para conseguir una concentración aproximada de $40 \mu\text{g}$ de fosfolípido/ml.

El contenido de todos los tubos se evaporó en una placa calefactora a 220°C . A continuación se añadieron 0.5 ml de ácido perclórico al 70% a cada uno de los tubos y se carbonizaron las muestras durante 30 min a 220°C . Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar, se adicionó a cada tubo 9.5 ml del reactivo recién preparado (solución A+B), mezclando a continuación. Se calentaron los tubos en un baño termostático a 50°C durante 1 h, con lo que apareció un color azul-verdoso estable en los mismos. Tras haberse enfriado las muestras, se leyó la absorbancia a 825 nm en cubetas de plástico.

Todas las muestras se prepararon por duplicado. Se utilizó como blanco un tubo que contenía únicamente todos los reactivos.

3.1.2 Determinación del tamaño de los liposomas

Se determinó por Quasy-elastic Laser Light Scatering. Mediante esta técnica se detecta la dispersión de la radiación debida al movimiento browniano de las partículas en solución o en suspensión. Se determinan los tamaños, el porcentaje de población existente para cada uno, en función de la intensidad de luz dispersada por la muestra, así como su polidispersión.

En todos los casos se analizaron muestras de $50 \mu\text{l}$ de liposomas diluidas en 3 ml de solución de acetato (TAC) o Tris 10 mM. Para ello se utilizaron cubetas de plástico con cuatro caras transparentes de 1 cm de paso de luz. A la muestra se le hizo incidir un láser de helio-neón a una temperatura constante de 25°C , a fin de evitar fluctuaciones debidas a la viscosidad de la suspensión. La luz dispersada por la muestra fue recogida por un fotomultiplicador situado en un ángulo de 90° respecto a la luz incidente del láser.

3.2 TECNICA INSTRUMENTAL UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA. INTERACCION DE LOS PEPTIDOS CON BICAPAS LIPÍDICAS

3.2.1 Fluorescencia del cromóforo intrínseco triptófano

Para determinar la asociación de los péptidos a membranas lipídicas de diferente composición se monitorizó la variación de la intensidad de fluorescencia del aminoácido triptófano, presente en el péptido MAP₄VP₃.

3.2.1.1. Preparación de los liposomas SUV

Los liposomas empleados en este ensayo fueron liposomas unilaminares pequeños, SUV, de concentración 20 mM. Estos se prepararon a partir de soluciones clorofórmicas madre de 0.1M DPPC, 0.01M de PI, y 0.01M de SA, tomándose los volúmenes necesarios para formar películas lipídicas de 10 μ mol DPPC, 9 μ mol DPPC más 1 μ mol PI, y 9.5 μ mol DPPC más 0.5 μ mol SA. Se evaporó el disolvente durante 30 minutos con un rotavapor y para asegurar la eliminación total de las trazas de disolvente se liofilizó durante 1 hora. Al hidratar las películas con 0.5 ml de TAC se obtuvieron liposomas MLV. Las preparaciones se mantuvieron durante 1 hora en un baño de agua, a 55°C para la DPPC y a 45°C para DPPC-PI. En la obtención de los liposomas de DPPC-SA se siguió siempre la misma metodología, con ciclos de calor a 60 °C durante 5 minutos seguidos de ciclos de frío a -70°C durante 5 minutos, esta operación se repitió 5 veces. Seguidamente, todas las preparaciones MLV se sonicaron en un baño de ultrasonidos de alta potencia durante 8 ciclos de 2 minutos, con intervalos de incubación de 5 minutos a la temperatura más idónea para cada tipo de preparaciones entre cada ciclo. Los liposomas obtenidos son unilaminares con un diámetro inferior a 100 nm.

3.2.1.2. Determinación de la fluorescencia del triptófano

La experimentación se llevó a cabo incubando una solución peptídica de concentración 7 μ M con volúmenes crecientes de liposomas vacíos de DPPC, DPPC-PI y DPPC-SA hasta una concentración lípido-péptido 60:1. Para cada relación molar se registró el espectro de fluorescencia en el intervalo de 285 a 500 nm. La muestra se excitó a 280 y se determinaron los máximos de intensidad de fluorescencia a 340 nm, que corresponden a la λ_{ex} y λ_{em} del triptófano respectivamente.

El espectro de emisión de fluorescencia obtenida tras excitación de la muestra a 280 nm, se corrige de la dispersión de la luz debido a los liposomas, de la dilución y del filtro interno. Por cada cantidad de lípido añadido, se obtiene un espectro de emisión del triptófano corregido por diferencia del espectro de emisión de los liposomas blancos, a partir del cuál se determina la $\lambda_{em\ max}$, calculando la primera derivada del espectro (corrección del light scattering). Además, se corrige del efecto del filtro interno. El valor de la intensidad de fluorescencia viene dado

$$F = F_{max} \cdot 10^{-(A_{ex}+A_{em})/2} \quad \text{Ec.22}$$

Siendo F la intensidad de fluorescencia corregida, F max es la intensidad de fluorescencia después de la corrección por light scattering, A_{ex} y A_{em} son las absorbancias

de los liposomas a 280 nm y a 340 nm, respectivamente. La validación de la corrección se realiza en paralelo con N-acetiltriptofanamida, cuya intensidad de fluorescencia no está afectada por los lípidos.

3.2.2 Ensayos de unión del péptido a las bicapas lipídicas

Una vez establecido mediante el anterior ensayo que el péptido se une a las bicapas con esta técnica veremos como al excitar el triptófano del péptido éste transfiere la energía de emisión al marcador fluorescente N-NBD-PE que forma parte del liposoma SUV. Para que dicha transferencia (RET) sea posible, la distancia entre el péptido y el grupo NBD ha de ser $< 15 \text{ \AA}$. La muestra se excita a $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ y se lee la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$, característica del NBD.

Para ello se prepararon los diferentes SUV conteniendo un 2% de N-NBD-PE. Las diferentes composiciones lipídicas se prepararon de igual modo que en el ensayo anterior, añadiendo a la película lipídica la cantidad necesaria (200 μl) de sonda fluorescente de una solución clorofórmica madre de concentración 0.001M. La película se hidrato con 0.5 ml de solución tamponada Tris 0.01M (pH=7.4).

La experimentación se llevó a cabo incubando 4 μl de las diferentes soluciones liposómicas de 20 mM en 2.5 ml Tris 0.01M (pH=7.4), con cantidades crecientes de solución peptídica procedente de una solución madre 0.175 mM, hasta relación péptido/lípido (mol:mol) de 0.25:1.

Los resultados se expresaron como el cambio relativo de la intensidad de fluorescencia, δF .

$$\delta F = \frac{F - F_0}{F_0} \quad \text{Ec.23}$$

Siendo F_0 la intensidad de fluorescencia de los liposomas y F la intensidad de fluorescencia a cada concentración de péptido. La estequiometría del proceso se obtuvo directamente de la representación gráfica, δF versus concentración péptido/lípido (mol:mol).

3.2.3 Ensayos de microviscosidad de las bicapas

3.2.3.1. Preparación de liposomas SUVs

En primer lugar se prepararon los liposomas multilaminares grandes, MLVs, de DPPC, DPPC-PI (9:1), DPPC-PG (9:1), DPPC-DPPE (9:1), DPPC-CL (9:1) y DPPC-SA (9.5:0.5). Para ello se disolvieron 40 mg de DPPC, para el primero; 36 mg de DPPC y 4 mg del fosfolípido correspondiente para los siguientes; 38 mg de DPPC y 2 mg de SA para el último, en un balón de vidrio con 3 ml de cloroformo. Se rotaevaporaron para formar una película en las paredes del balón, durante 30 minutos. Para eliminar las posibles trazas de

disolvente se mantuvieron durante 45 minutos en la liofilizadora. La película se hidrató con 2 ml de solución de acetato, TAC (pH=7.4); se homogeneizó al baño de ultrasonidos para desprender el fosfolípido de las paredes del balón, y se controló el pH mediante papel indicador. Se llevó a incubación a 10⁰C por encima de la temperatura de transición según el fosfolípido utilizado. De este modo se obtuvo una suspensión de aspecto lechoso de liposomas (MLVs).

A continuación se sonicó con la sonda de Ti a 100 wats de potencia durante 2 minutos, y 1 minuto de reposo con flujo de nitrógeno (8 veces) . Seguidamente se centrifugó a 20000 rpm o 50000 g, para separar en el precipitado el titanio y los posibles MLVs del sobrenadante, donde están los SUVs.

El método de preparación es igual para todos los diferentes tipos de SUVs estudiados, a excepción de los liposomas conteniendo un 5% de SA. Al seguir la misma pauta estos precipitaban. Una vez hidratados se solucionó el problema, congelándolos a -70⁰C durante 5 minutos y descongelándolos a 60⁰C durante 5 minutos, operación que se repitió 5 veces. Después se sonicaron y centrifugaron, obteniéndose los SUVs.

3.2.3.2. Marcaje de los liposomas

Para el marcaje de los liposomas se tomaron 250 µl de SUVs 0.027 M y 250 µl de solución de DPH (5x10⁻⁵ M) o ANS (9x10⁻⁵ M). La proporción de PL/sonda fluorescente fue 1:420; 1:230 para DPH y ANS respectivamente. La preparación se mantuvo durante 1h a 10⁰C por encima de la Tc del fosfolípido utilizado, resguardados de la luz.

3.2.3.3. Determinación de polarización de fluorescencia

Se tomaron 50 µl de SUVs (concentración 27 mM) saturados con marcador fluorescente y se introdujeron en las cubetas de cuarzo para fluorimetría, las cuáles contenían 3 ml de solución peptídica 5x10⁻⁶ M en el caso del problema o 3 ml de TAC en el caso del control (por duplicado).

Las muestras se dejaron equilibrar un mínimo de 10 minutos, bajo agitación magnética. Las lecturas se realizaron entre los 20⁰C y 50⁰C, aumentando en 5⁰C al principio, y alrededor de la Tc el incremento de temperatura fue de 3⁰C.

A cada temperatura se realizaron los espectros de fluorescencia y se efectuaron las lecturas de la constante G y de la polarización correlativamente, para cada cubeta y por triplicado. Los valores de polarización se determinaron mediante la ecuación:

$$P = \frac{I_{v_v} - (G \cdot I_{v_h})}{I_{v_v} + (G \cdot I_{v_h})} \quad \text{Ec.24}$$

siendo I_{v_v} e I_{v_h} las intensidades de fluorescencia medidas con los polarizadores orientados en paralelo o perpendicular respecto a la luz polarizada, respectivamente. El factor G corrige las diferencias en la transmisión de la luz polarizada del instrumento.

Para observar las variaciones se representó gráficamente los valores, tanto de intensidad de fluorescencia como de polarización, frente a la temperatura. Los resultados de la polarización se trataron estadísticamente para conocer si las diferencias eran significativas ($p < 0.05$). Además, los valores de polarización con DPH se ajustaron a la ecuación de una sigmoide, calculándose la primera derivada, con el fin de conocer la T_c .

3.2.4 Ensayos de fusión de membranas

Con el fin de evaluar la capacidad de los péptidos de producir fusión de liposomas de las diferentes composiciones ensayadas, se determinó la transferencia de energía entre dos sondas fluorescentes incorporadas a diferentes liposomas de igual composición, en presencia de los péptidos. El máximo de fusión se obtuvo para cada composición lipídica con las sondas incorporadas en el mismo liposoma.

Se prepararon liposomas SUV 20 mM de DPPC, DPPC-PI (9:1), DPPC-SA(9.5:0.5) que incluían 0.6% N-NBD-PE o bien 0.6% N-Rh-PE. Estos marcadores fluorescentes se añadieron al inicio de la preparación a partir de soluciones clorofórmicas 0.001M. Por otro lado, se prepararon los liposomas control que incluían 0.3% N-NBD-PE y 0.3% N-Rh-PE. Las películas se hidrataron con Tris 0.01M pH 7.4.

Los estudios se llevaron a cabo mezclando 5 μ l de liposomas marcados con NBD con 5 μ l de liposomas marcados con Rh en una solución de 1,5 ml Tris, a la que se añadió diferentes cantidades de péptido.

Los resultados de fusión se expresaron como incremento de la transferencia de energía por resonancia (RET), entre los liposomas marcados por efecto del péptido, monitorizándose el descenso de la intensidad de fluorescencia del liposoma marcado con NBD. Para ello se determinó, en primer lugar, la fluorescencia en la cubeta dónde los liposomas marcados se encontraban en proporción 1:1 molar, excitando la muestra a $\lambda_{ex} = 460$ nm y leyendo la intensidad de fluorescencia (F_0) a $\lambda_{em} = 530$ nm, correspondiendo a la excitación y a la emisión del NBD (dador). Después se midió la fluorescencia para cada concentración de péptido (F). Finalmente, se añadió 90 μ l de deoxicolato para romper los liposomas y obtener el máximo de fusión (F_{max}). Paralelamente, se obtuvo la intensidad de fluorescencia de los liposomas control que se corresponde con el máximo de fusión posible para dichas preparaciones lipídicas. La magnitud del proceso de fusión viene expresada como un porcentaje, % de fluorescencia.

$$\delta F = \left(\frac{F - F_0}{F_{max} - F_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec.25}$$

3.2.5 Estudio de la estabilidad de las bicapas

3.2.5.1. Liberación de carboxifluoresceína (CF)

Una forma de conocer si la interacción de los péptidos con las bicapas lipídicas,

origina algún tipo de permeabilización o solubilización, consiste en incubar las vesículas lipídicas conteniendo CF encapsulada con los péptidos.

3.2.5.1.1. Purificación de carboxifluoresceína

El marcador fluorescente CF es necesario someterlo a un proceso de purificación previo a su utilización basado en el método de Lesserman et al. (Lesserman, 1982), con algunas modificaciones. La purificación se realizó por cromatografía en columna, tal como se describe a continuación.

Se disolvió 1 g de CF en 5 ml de agua Milli-Q, añadiendo NaOH hasta la completa disolución, con ayuda de agitación magnética. Se neutralizó con HCl diluído hasta pH=7.4, finalmente se enrasó en matraz aforado de 10 ml.

Sobre una columna cromatográfica de Sephadex^R LH 20 se eluyó la solución de CF preparada con agua Milli-Q y se recogieron seis fracciones de 10 ml cada una de color anaranjado.

Se valoró la concentración de CF en cada alícuota, para ello se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro UV, y aplicando la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Ec.26}$$

siendo A la absorbancia, ε coeficiente de absorción molar ($\text{CF}=70000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b el grosor de la cubeta en cm, y c la concentración molar.

Las soluciones con mayor concentración de CF se reunieron, se liofilizaron y se guardaron a 4°C.

3.2.5.1.2. Preparación de liposomas SUV encapsulando CF

Para obtener los liposomas SUVs con CF encapsulada, se siguió la misma pauta que en el apartado 3.2.4.1. La única diferencia es al formar los liposomas MLV, éstos se obtienen rehidratando la película lipídica con 500 μl de una solución de CF 100 mM en TAC (18.35 mg/500 μl). Una vez formados los liposomas SUV se procede a eliminar la CF no encapsulada.

3.2.5.1.3. Purificación de los SUV

1) Cromatografía sobre gel de Sephadex^R.

Para eliminar la CF no encapsulada se sometió la preparación a una cromatografía en columna. Para ello se hidrataron 8 g de Sephadex^R G-50 con TAC, y se rellenó la columna de vidrio de 30x2 cm. Se depositaron los 2 ml de SUVs preparados y se eluyeron con TAC, recogándose 6 fracciones de 1 ml, a las cuáles se les determinó la latencia diluyéndolas 500 veces. Las de mayor latencia se reunieron en un matraz y se enrasaron a 2 ml.

2) Diálisis.

Con el fin de eliminar completamente los restos de CF libre de los liposomas se dializaron durante 24h frente a 250 ml de TAC, bajo agitación continua, cambiando el dializado 1 vez.

3) “Basket centrifugation”

La CF no encapsulada se elimina por columnación en una jeringa de plástico ICO® de 10 ml rellena de resina Sephadex G-50. El protocolo a seguir es el siguiente:

La columna se equilibra con TAC, pasando unas 10 veces el volumen de la columna, unos 100 ml de TAC. La columna se coloca dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml. Después se centrifuga la jeringa con la resina a 2000 r.p.m.(1065 g) durante 1 minuto hasta dejarla escurrida.

Se añaden 0.5 ml de liposomas en la parte central y superior de la resina, y se centrifuga 1 minuto a 1500 r.p.m. (659 g), quedando los liposomas retenidos y en el fondo del tubo se encuentra la CF en solución (se deshecha). Seguidamente se vuelve a centrifugar una segunda vez a 2000 r.p.m. (1065 g) para conseguir la recuperación de todos los liposomas.

3.2.5.1.4.Determinación de la fluorescencia de CF

La fluorescencia de una solución de liposomas con carboxifluoresceína se expresa en forma de porcentaje de carboxifluoresceína liberada. Este parámetro nos da una idea de la CF que se encuentra en el interior de los liposomas respecto a la que se ha liberado. La variación de la fluorescencia a lo largo del tiempo se determinó para muestras de liposomas incubados con los péptidos o con TAC.

$$\delta F = \left(\frac{F - F_0}{F_{\max} - F_0} \right) \times 100 \quad \text{Ec.27}$$

Siendo F la intensidad de fluorescencia en presencia de péptido, F_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia de péptido y F_{\max} la fluorescencia total después de romper los liposomas con triton X-100 (10%).

Se incubaron en distintos viales, 5 μ l de SUVs con CF encapsulada y 1400 μ l de TAC con o sin péptido disuelto, a distintas relaciones molares lípido-péptido, con el fin de estudiar la influencia de los péptidos en la permeabilidad de los liposomas.

Transcurridos 15, 30, 45 y 60 min se extrajeron 5 μ l de la mezcla; se diluyeron en 2.5 ml de TAC y se leyó la fluorescencia del medio. Las condiciones de lectura fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 490$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, y las rendijas de excitación como de emisión 5/5. Seguidamente se añadieron a la solución diluída 50 μ l de Triton^R X-100 al 10 %, para romper los liposomas y determinar la fluorescencia correspondiente a la total liberación del material encapsulado.

3.2.5.2. Determinación de la permeabilidad de los liposomas por reducción de NBD

Para determinar si los antígenos peptídicos múltiples inducían la permeabilización de los distintos tipos de liposomas se efectuó un análisis de fluorescencia basado en la disminución de la intensidad de fluorescencia del grupo NBD por reducción en presencia de hidrogenosulfito sódico (ditionito) (Mc.Intyre, 1991; Hoekstra, 1993). Para ello se prepararon liposomas SUV 20 mM de la composición deseada e incorporando un 0.6% del marcador fluorescente N-NBD-PE.

Estos liposomas son unilaminares, y por su tamaño ($\cong 100$ nm de diámetro) presentan aproximadamente un 50 % de los fosfolípidos en la monocapa externa. En condiciones normales, los liposomas no son permeables al ditionito añadido desde el medio acuoso, y sólo se reducen los grupos NBD de la monocapa externa. En caso de aumentar la permeabilidad de las vesículas por efecto de los péptidos, se espera un mayor porcentaje de reducción de fluorescencia, correspondiente a los grupos NBD de la monocapa interna.

El estudio se llevó a cabo determinándose la fluorescencia de NBD, con $\lambda_{ex} = 460$ nm y $\lambda_{em} = 535$ nm. Una alícuota de liposomas DPPC, DPPC-PI, DPPC-SA marcados con 0.6% de N-NBD-PE se diluyó en una solución de 2.5 ml Tris 0.01M pH=7.4 saturada con nitrógeno, (cubeta control) (concentración de lípido 16 μ M). Paralelamente, en la cubeta problema conteniendo la misma concentración de liposomas se añadieron determinadas concentraciones de solución peptídica. En ambos casos se registró la fluorescencia hasta mostrar una línea de base estable (< 60 s), añadiéndose después 10 μ l de ditionito 1.44 M, concentración final 5.76 mM. La solución reductora se preparó en Na_2CO_3 0.5 M a pH=11 saturada con nitrógeno, y se mantuvo en hielo, utilizándose como máximo durante una hora.

El descenso de la intensidad de fluorescencia se registró durante 800 s. Finalmente se rompieron los liposomas con 90 μ l de solución 33 mM de deoxicolato. El porcentaje de fosfolípido accesible al ditionito se calculó como

$$\text{fosfolípido accesible (\%)} = \left(1 - \left[\frac{F - F_T}{F_0 - F_T} \right] \right) \times 100 \quad \text{Ec28}$$

siendo F la intensidad de fluorescencia tras la reacción, obtenida extrapolando la reacción lenta a tiempo 0, F_T la fluorescencia cuando todo el lípido ha reaccionado calculada por adición de deoxicolato, y F_0 la fluorescencia antes de añadir el ditionito.

Resultados y Discusión

I MISCIBILIDAD

1. MISCIBILIDAD DE LOS LÍPIDOS UTILIZADOS EN LAS MEMBRANAS MODELO

Al emplear como modelo de membrana un sistema constituido por más de un componente, es posible que dichas sustancia no se distribuyan de forma homogénea en la interfase aire-agua y por tanto, el modelo presente un comportamiento no ideal.

Los diferentes lípidos que constituyen el modelo de membrana, ya sea una monocapa o bien una bicapa, se encuentran algunas veces agrupados formando dominios. Ello es debido a la existencia de zonas de alta concentración de uno o más de los componentes del sistema. A fin de establecer si los diferentes lípidos utilizados como modelo de membrana presentan una distribución homogénea es necesario determinar su miscibilidad. Esto se realizará mediante experimentos basados en monocapas formadas por diferentes proporciones de cada componente, obteniendo las correspondientes isothermas de compresión y calculando una serie de parámetros termodinámicos. Estos proporcionarán información sobre el tipo de mezcla que forman los distintos lípidos, en función de la proporción de cada uno y de la presión superficial, según un procedimiento ampliamente utilizado con diferentes fosfolípidos (Alsina, 1991) y mezclas de estos con proteínas (Taneva, 2000) o péptidos (Cajal, 1998).

Cuando interpretamos las interacciones entre diferentes moléculas que constituyen una misma monocapa, se valora el área ocupada por molécula para las diferentes fracciones molares. Si la mezcla es ideal o no existe interacción entre los componentes, el área ocupada por molécula sigue un comportamiento lineal y es el resultado de la contribución de cada componente en estado puro multiplicado por su fracción molar. En este caso diremos que se cumple la regla de la aditividad, y sus componentes no tienen influencia entre sí. Por tanto, este caso responde a una mezcla ideal, es decir, los distintos componentes están mezclados y entre ellos no hay energía de interacción o bien responde al caso contrario, donde sus componentes están totalmente separados. Ahora bien, el área por molécula puede no seguir un comportamiento lineal, así habrá desviaciones positivas o negativas, de manera que los componentes aún siendo miscibles interaccionan de tal manera que varían el valor intrínseco del área por molécula (A) de los componentes puros (Taneva et al., 1996).

Para evaluar mejor las características de la miscibilidad entre componentes en las diferentes monocapas, se calcularon los parámetros termodinámicos asociados al proceso. El exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}) se obtuvo aplicando la siguiente ecuación:

$$\Delta G_M^{Ex} = \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_{1,2} d\pi - X_1 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_1 d\pi - X_2 \int_{\pi \rightarrow 0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (1)$$

donde $A_{1,2}$ es el área molecular promedio de la monocapa mixta, A_1 y A_2 son las áreas moleculares de los componentes puros, y X_1 y X_2 son las fracciones molares de los componentes 1 y 2 de la monocapa como ya ha sido descrito por otros autores (Alsina, 1993).

Los valores del parámetro de interacción (α) se calcularon para las diferentes presiones superficiales a partir de la ecuación derivada de los estudios de Joos et al (Joos, 1969a) y Margules (Glastone, 1972), ecuación 19 de la introducción.

Una vez establecido que no hay desviaciones significativas de la ley de la aditividad, es necesario establecer si en las diferentes monocapas mixtas ocurría una completa inmiscibilidad o por el contrario se daba una mezcla ideal. El análisis del cambio de la presión superficial de colapso en función de la composición de la monocapa nos puede indicar si los componentes son miscibles o no (Cadenhead, 1980). Cuando dos componentes son miscibles, la presión de colapso varía con la composición de la mezcla obedeciendo un comportamiento de mezcla ideal y se puede aplicar la siguiente ecuación (Gaines, 1966a).

$$1 = X_1 \frac{(\pi_{c,m} - \pi_{c,1})A_{mc,1}}{RT} + X_2 \frac{(\pi_{c,m} - \pi_{c,2})A_{mc,2}}{RT} \quad (2)$$

dónde X_1 y X_2 son las fracciones molares de los componentes 1 y 2 en la monocapa, $\pi_{c,1}$ y $\pi_{c,2}$ son las presiones de colapso de los componentes puros 1 y 2, $\pi_{c,m}$ es la presión de colapso de la monocapa mixta, $A_{mc,1}$ y $A_{mc,2}$ son las áreas moleculares de los componentes 1 y 2 en el punto de colapso y por último R , T son la constante de los gases y la temperatura absolutas, respectivamente.

Al tener todas las monocapas presión de colapso es posible para una serie de isotermas calcular la energía de interacción (ΔH) aplicando la ecuación:

$$\Delta H = \frac{RT\alpha}{Z} \quad (3)$$

Para la determinación del número de coordinación (Z), seguimos el modelo de Quickenden y Tam (Quickenden, 1974) considerando que en una monocapa muy empaquetada (justo antes del colapso), cada molécula está rodeada por otra seis moléculas vecinas ($Z=6$). A presiones superficiales por debajo de la presión de colapso (5 o 20 mN/m) se aplico la ecuación para calcular el factor de empaquetamiento.

$$PF = 0.907 \frac{A_{mc}}{A_m} \quad (4)$$

Este valor fue utilizado para obtener el correspondiente número de coordinación, de acuerdo con las equivalencias dadas por Quickenden y Tam, dónde A_{mc} es el área molecular de la mezcla en el punto de colapso y A_m es el área ocupada por molécula de la mezcla a 10, 20 y 32 mN/m.

Además, la información complementaria sobre la miscibilidad de los constituyentes de la monocapa nos la proporcionará el estudio del módulo de compresibilidad que se define como:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (5)$$

Este valor puede ser utilizado para caracterizar el comportamiento de fase de la monocapa de acuerdo con Davies et al. (Davies, 1963). Según el autor la fase de liquido

expandido (LE) se corresponde con un valor de 12.5 a 50 mN/m y la fase de líquido condensado (LC) con un valor intermedio entre 100 y 250 mN/m.

1.1 ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE DPPC-PI

Las isotermas de compresión de los dos lípidos puros (DPPC y PI), y de sus mezclas a diferentes fracciones molares de cada componente se muestran en la figura 1.1.

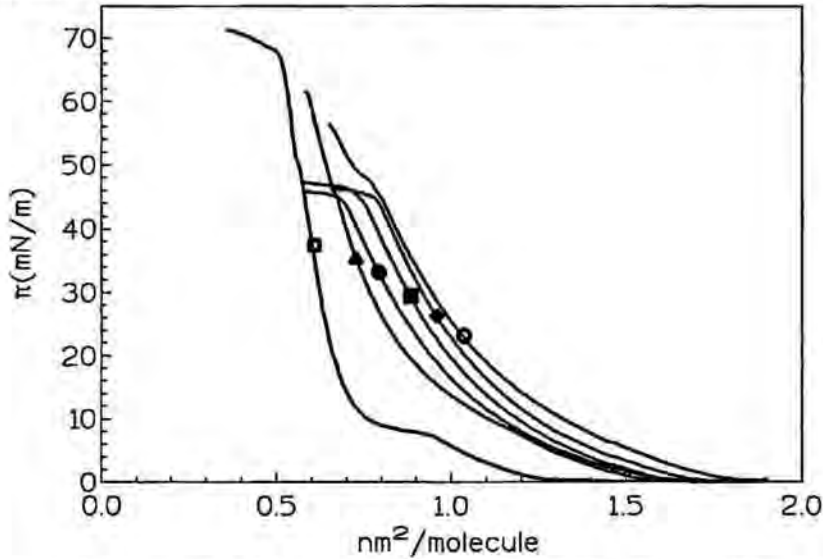


Figura 1.1 Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC y PI extendidas sobre subfase PBS, pH=7.4. Fracción molar de DPPC: 1(□), 0.8(▲), 0.6(○), 0.4(■), 0.2(♦) y 0 (•).

La presencia de PI en la monocapa de DPPC da lugar a monocapas en general más expandidas, con valores de área por molécula superiores a los correspondientes a los dos componentes puros excepto para la monocapa con $X_{\text{DPPC}} = 0.8$. En la figura 1.1 observamos para la fracción molar 0.6 de DPPC una zona de inflexión a 46 mN/m, la cuál según Taneva et al. (Taneva, 1997a) podría resultar de la expulsión de la fase rica en el componente lipídico insaturado PI al ir comprimiendo la monocapa, ya que la presión de colapso de PI puro es de alrededor de 46 mN/m. Por otra parte, la presión de colapso (π_c) decrece de 70 mN/m para la DPPC hasta 46 mN/m para la PI, no observándose una clara dependencia de la fracción molar de las mezclas.

Tabla 1.1 Presión de colapso (π_c , mN/m), compresibilidad máxima (C_s^{-1} , mN/m), y área límite (A_0 , nm²/molec.) ocupadas por molécula calculada para las monocapas de DPPC, PI y de sus mezclas.

	relación molar DPPC/PI					
	1:0	0.8:0.2	0.6:0.4	0.4:0.6	0.2:0.8	0:1
π_c	70.1	61.5	56.3	46.4	46.0	46.1
C_s^{-1}	439.56	268.62	133.02	151.86	125.72	133.15
A_0	0.62	0.87	1.14	1.12	1.18	1.08

Los cálculos del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) de las diferentes mezclas mostraron la existencia de diferentes fases en función de la presión superficial. Las monocapas presentaron una zona de líquido expandido hasta una presión superficial de alrededor 18 mN/m y la fase condensada se alcanzó alrededor de 42 mN/m de presión. La monocapa de DPPC alcanzó la fase líquida expandida y la fase líquida condensada a las

presiones de 8 mN/m y 28 mN/m, respectivamente. Todas las composiciones presentan presión de colapso. En la tabla 1.1 se muestra la máxima compresibilidad de éstas monocapas así como su área límite (A_0), la cuál depende de la composición de la mezcla. Al aumentar la proporción de DPPC presente en la monocapa aumenta también la compresibilidad máxima a la vez que disminuye el área límite.

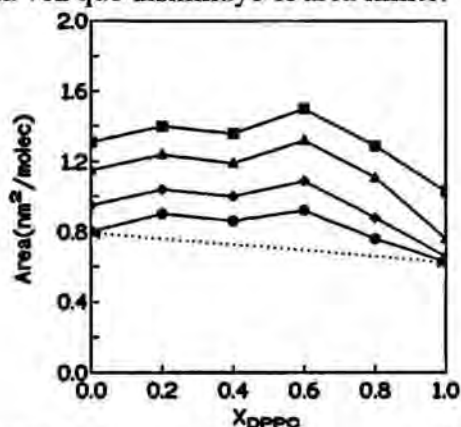


Figura 1.2 Miscibilidad de PI/DPPC en monocapas mixtas extendidas sobre subfase PBS. Áreas ocupadas por moléculas ($\text{nm}^2/\text{molécula}$) a presiones superficiales de 5(■), 10(▲), 20(◆) y 32(●) mN/m.

Los valores de las áreas moleculares obtenidos a las presiones superficiales de 5, 10, 20 y 32 mN/m para las diferentes fracciones molares de DPPC/PI se muestran en la figura 1.2. En la figura se observa una desviación positiva respecto a la regla de la aditividad (representada por una línea discontinua) a todas las presiones consideradas. La desviación es máxima para la fracción molar $X_{DPPC} = 0.6$, lo cual sugiere la existencia de fuerzas repulsivas entre las moléculas que forman la monocapa.

Tabla 1.2 Áreas ocupadas por molécula expresada en $\text{nm}^2/\text{molécula}$ de la monocapa mixta de DPPC/PI medida a diferentes presiones superficiales (π).

$\pi(\text{mN/m})$	relación molar DPPC/PI					
	1:0	0.8:0.2	0.6:0.4	0.4:0.6	0.2:0.8	0:1
5	1.03	1.29	1.50	1.35	1.40	1.31
10	0.76	1.11	1.32	1.19	1.24	1.15
20	0.66	0.88	1.09	1.00	1.04	0.95
32	0.63	0.76	0.92	0.86	0.90	0.80

En la tabla 1.2 se detallan los valores de las áreas moleculares obtenidas a cada presión superficial considerada, para las diferentes fracciones molares DPPC/PI.

Cálculos termodinámicos de las mezclas DPPC/PI

En la tabla 1.3 se muestran los valores obtenidos de los excesos de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), las energías de interacción (ΔH) dado que todas las composiciones presentan presión de colapso, y los valores del parámetro de interacción (α) a las presiones superficiales de 5, 20 y 32 mN/m. Asimismo, se realizó un análisis de la variación de la presión de colapso en función de la composición.

Tabla 1.3 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapas mixtas de DPPC/PI extendidas sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5, 20 y 32 mN/m.

Fracción	5mN/m			20 mN/m			32 mN/m		
	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH
Molar DPPC-PI	(J/mol)		(J/mol)	(J/mol)		(J/mol)	(J/mol)		(J/mol)
0.8/0.2	0.63	0.0016	1.93	10.38	0.0300	16.24	21.06	0.0500	32.91
0.6/0.4	0.88	0.0015	1.84	12.77	0.0200	26.54	28.76	0.0500	29.99
0.4/0.6	-0.33	-0.0006	-0.71	-0.79	-0.0014	-0.89	3.56	0.0100	3.73
0.2/0.8	0.75	0.0018	2.30	7.24	0.0200	11.30	14.11	0.0400	22.02

Las energías de interacción de las monocapas mixtas DPPC-PI, al igual que los excesos de energías de mezcla son muy pequeños, a las diferentes presiones superficiales estudiadas. Los valores de ΔH son positivos, lo cual sugiere la existencia de fuerzas de repulsión débiles entre las moléculas de DPPC y PI dentro de la monocapa. Estas desviaciones de la idealidad observadas son menores que el producto RT (2474 J/mol, a 25 °C) y por tanto, no son significativas. Además, al realizar el análisis de las presiones de colapso de los valores experimentales según la ecuación 2 de este capítulo se obtuvieron unos resultados de 1.00 ± 0.01 que sugiere una mezcla ideal de DPPC y PI.

Una forma de confirmar estos datos será a través del cálculo del área límite (Chavez,1999). El valor del área molecular límite (A_{lim}) para cada monocapa mixta a cada una de las fracciones molares estudiadas se muestra en la figura 1.3. Estos valores fueron determinados a partir de la intersección con el eje de las abscisas de una línea recta tangente a la isoterma de compresión en la región, donde la monocapa esta más condensada (fase líquido comprimido o sólido). Estos valores muestran un comportamiento similar a los de la miscibilidad, es decir a la representación de los valores del área molecular frente a las diferentes fracciones molares.

El área límite de la mezcla DPPC/PI a cualquier fracción molar presenta desviaciones positivas a la regla de la aditividad. Esto sugiere la existencia de fuerzas repulsivas entre las moléculas. También como se muestra en la tabla 1.3, al ser pequeña la energía de interacción y positivos los valores de ΔH , entre los componentes de la monocapa podemos decir que se establecen fuerzas de carácter repulsivo débiles. Además, la presión de colapso aumenta al incrementar la cantidad de DPPC en la mezcla. Esto es indicativo de la formación de un sistema mixto estable. Sin embargo, el valor del A_{lim} para cada mezcla es mayor que el valor ideal dentro del error experimental confirmando la existencia de fuerzas repulsivas entre las moléculas.

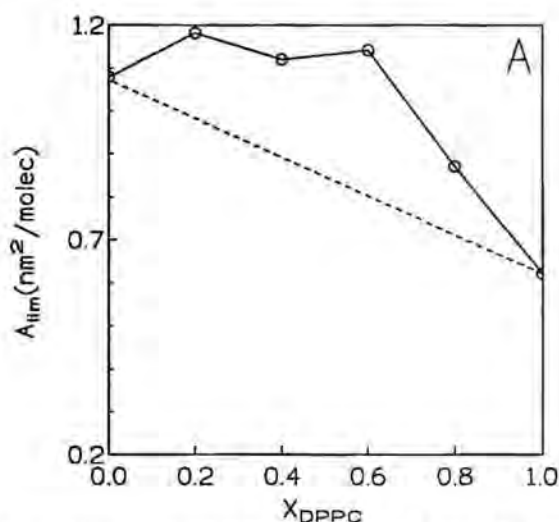


Figura 1.3 Área límite (A_{lim}) de monocapas mixtas DPPC/PI (9:1). La ley de la aditividad esta representada por una línea punteada.

En consecuencia los valores ΔG_M^{Ex} y del A_{lim} de la mezcla de monocapas, además de la variación de presión de colapso en función de la composición de la monocapa, indica que DPPC y PI son miscibles en cualquier proporción a la temperatura ambiente, y entre estas moléculas se establecen interacciones de carácter repulsivo muy débil.

1.2 ISOTERMAS DE COMPRESION DE MONOCAPAS MIXTAS DE DPPC-SA

Las isotermas de compresión de los componentes puros DPPC y SA, y de sus mezclas a diferentes fracciones molares de cada uno de ellos se muestran en la figura 1.4.

La presencia de SA en las monocapas de DPPC da lugar a películas superficiales más comprimidas como es de esperar dada la menor área por molécula ocupada por SA, a excepción de la mezcla con $X_{DPPC} = 0.8$, que da lugar a una monocapa más expandida incluso que la DPPC pura. La presión de colapso es de 70 mN/m para la DPPC pura, mientras las isotermas de las mezclas tienen una presión de colapso de 65 mN/m, la misma para la SA pura (tabla 1.4). Por tanto, al ser la presión de colapso casi la misma que DPPC pura nos da idea de que las monocapas de mezcla están bien compactadas.

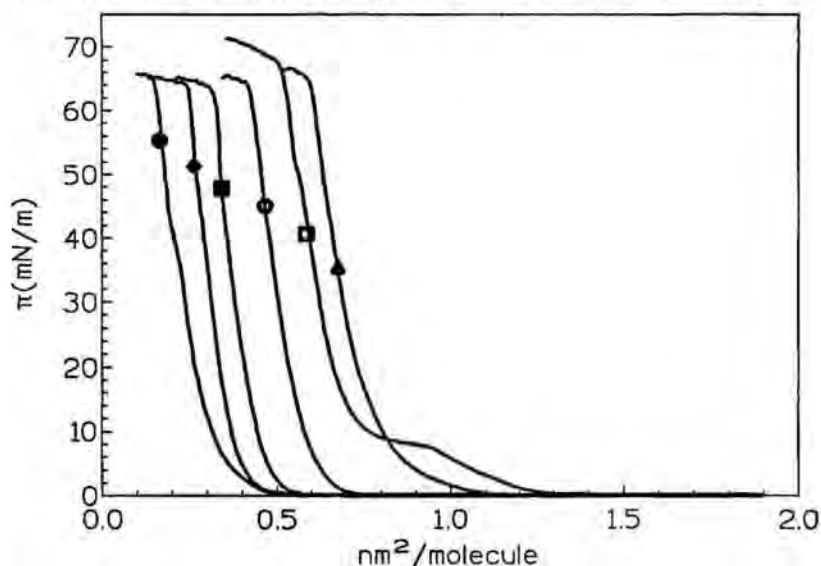


Figura 1.4 Isotermas de compresión de monocapas mixtas de DPPC y SA extendidas sobre subfase PBS, pH=7.4. Fracción molar de DPPC: 1.0(\square), 0.8(\blacktriangle), 0.6(\circ), 0.4(\blacksquare), 0.2(\blacklozenge) y 0(\bullet).

En la tabla 1.4 se muestran los valores de compresibilidad máxima para las diferentes monocapas, siendo la monocapa de DPPC la menos compresible. Los cálculos del módulo de compresibilidad muestran que todas las mezclas forman monocapas en fase líquido expandido a 6 mN/m, que adoptan la fase de líquido condensado a 14 mN/m y un estado sólido al comprimir a presiones superiores. Este estado sólido no se llega a formar en monocapas de DPPC pura, lo que indica que SA favorece la compactación de la monocapa. Los valores de área límite también se muestran en la tabla 1.4, y se observa que éste valor aumenta con la proporción de DPPC, si bien no de manera lineal. La monocapa de DPPC presenta una transición de fase marcada, la cuál desaparece en las monocapas mixtas así como en la de SA.

Tabla 1.4 Presión de colapso (π_c , mN/m), compresibilidad máxima (C_s^{-1} , mN/m), y área límite (A_0 , nm²/molec.) ocupadas por molécula calculada para las monocapas de DPPC, SA y de sus mezclas.

	relación molar DPPC/SA					
	1:0	0.8:0.2	0.6:0.4	0.4:0.6	0.2:0.8	0:1
π_c	70.1	66.6	65.5	65.2	65.2	65.8
C_s^{-1}	439.56	464.29	494.66	839.29	690.68	588.7
A_0	0.62	0.75	0.58	0.42	0.35	0.25

La miscibilidad de DPPC y SA en las monocapas mixtas viene representada en la figura 1.5, dónde se muestran las áreas por molécula a las presiones superficiales 5, 10, 20 y 32 mN/m para las distintas fracciones molares estudiadas. La mayoría de las fracciones molares siguen la regla de la aditividad excepto la fracción molar de 0.8 cuya desviación es positiva. Además, a la presión de 5 mN/m se producen desviaciones negativas cuando las fracciones molares de DPPC son inferiores a 0.8. Este comportamiento sugiere la existencia de interacciones de carácter atractivo entre las moléculas de DPPC y de SA. En las monocapas con $X_{DPPC}=0.8$ y a presiones superficiales superiores a 5 mN/m, dónde las monocapas se encuentran como líquido expandido, predominan las fuerzas de interacción de tipo repulsivo débil, dadas las desviaciones negativas de la regla de la aditividad. La existencia de desviaciones, sean mayores o menores de la regla de la aditividad, sugiere la formación de mezclas no ideales, con dominios ricos en un determinado componente.

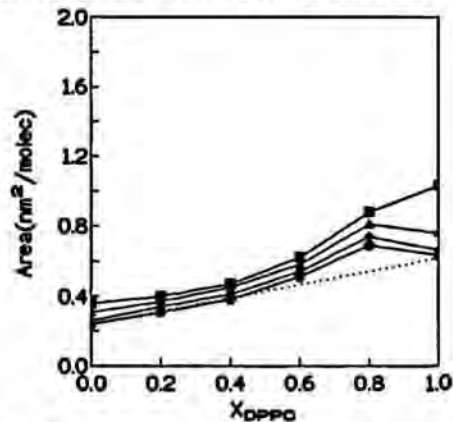


Figura 1.5 Miscibilidad de DPPC/SA en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por moléculas (nm²/molécula) a presiones superficiales de 5(■), 10(▲), 20(◆) y 32(●) mN/m.

Los valores de las áreas moleculares obtenidos a cada presión superficial considerada, para las diferentes fracciones molares DPPC/SA se detallan en la tabla 1.5

Tabla 1.5 Areas ocupadas por molécula expresada en nm²/molécula de las monocapas mixtas de DPPC/SA medida a diferentes presiones superficiales (π).

π (mN/m)	relación molar DPPC/SA					
	1:0	0.8:0.2	0.6:0.4	0.4:0.6	0.2:0.8	0:1
5	1.03	0.88	0.62	0.47	0.40	0.36
10	0.76	0.81	0.58	0.45	0.37	0.31
20	0.66	0.74	0.54	0.41	0.34	0.26
32	0.63	0.69	0.51	0.32	0.31	0.24

Cálculos termodinámicos para las mezclas DPPC/SA

En la tabla 1.6 se muestran los valores obtenidos de los excesos de energías libres de mezcla (ΔG_M^{Ex}), las energías de interacción (ΔH) que pudo calcularse al tener todas las composiciones presión de colapso, y los valores del parámetro de interacción (α) a las presiones superficiales 5, 20 y 32 mN/m. Además se realizó el estudio de la variación de la presión de colapso en función de la composición.

Tabla 1.6 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/SA extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5, 20 y 32 mN/m.

Fracción	5 mN/m			20 mN/m			32 mN/m		
	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH	ΔG_M^{Ex}	α	ΔH
Molar DPPCSA	(J/mol)		(J/mol)	(J/mol)		(J/mol)	(J/mol)		(J/mol)
0.8/0.2	0	0	0	-6.03	-0.020	-9.38	-4.86	-0.010	-7.56
0.6/0.4	-1.38	-0.002	-2.89	-9.71	-0.020	-10.13	-9.75	-0.020	-10.17
0.4/0.6	-1.21	-0.003	-2.51	-8.04	-0.010	-16.75	-8.75	-0.010	-18.21
0.2/0.8	-0.84	-0.002	-2.55	-4.98	-0.010	-15.62	-6.07	-0.020	-18.92

Los valores de ΔG_M^{Ex} obtenidos son muy pequeños, muy por debajo del producto RT (2474 J/mol, a 25 °C), indicando que las desviaciones de la idealidad observadas (figura 1.4) no son significativas, y que las posibles interacciones entre las moléculas son poco importantes, si bien es posible que las mezclas no sean totalmente homogéneas. A partir del análisis de las presiones de colapso, según la ecuación 2, se determinaron los valores experimentales, cuyos valores son 1.00 ± 0.01 , lo que sugiere que las mezclas de DPPC y SA son ideales.

La representación de los valores del área límite para las diferentes monocapas (figura 1.6) confirman la existencia de fuerzas de carácter repulsivo débil, sobre todo a $X_{DPPC}=0.8$.

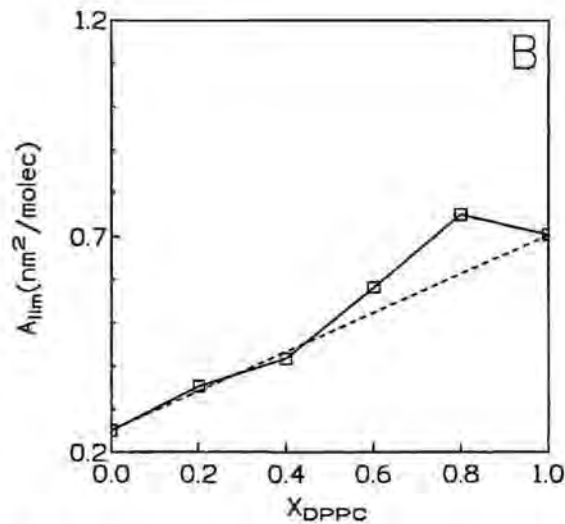


Figura 1.6 Área límite (A_{lim}) de monocapas mixtas DPPC/SA (9:1). La ley de la aditividad esta representada por una línea punteada.

En las monocapas mixtas de DPPC/SA el área límite presenta un comportamiento ideal a cualquier fracción molar a excepción de la desviación positiva para la fracción 0.8 DPPC. Sin embargo, al ser todos los valores de ΔH negativos y pequeños, entre los componentes se establecerán interacciones de carácter atractivo, y por tanto en la monocapa de DPPC-SA habrá un mejor empaquetamiento de las cadenas alquílicas.

1.3 MEZCLAS SELECCIONADAS COMO MODELO DE MEMBRANA PARA LOS ESTUDIOS DE INTERACCION LIPIDO-PEPTIDO.

A partir de los estudios de miscibilidad de los lípidos DPPC, PI y SA se escogen las fracciones molares para estudiar las interacciones entre lípido-péptido. El objetivo principal es valorar los componentes hidrofóbicos y electrostáticos de la interacción de cada péptido con las membranas lipídicas modelo. Para ello, se seleccionaron tres composiciones básicas: membranas de DPPC, un fosfolípido zwitteriónico que forma membranas con carga global neutra, y membranas de DPPC incorporando un 10 % de componente con carga negativa (PI) o positiva (SA), a fin de evaluar el efecto de la carga. Las composiciones seleccionadas se emplearán en monocapas extendidas en la interfase aire/agua, y en bicapas (liposomas), como modelos de membrana.

A continuación pasaremos a discutir el comportamiento de estas tres composiciones lipídicas, cuyas isotermas de compresión se muestran en la figura 1.7.

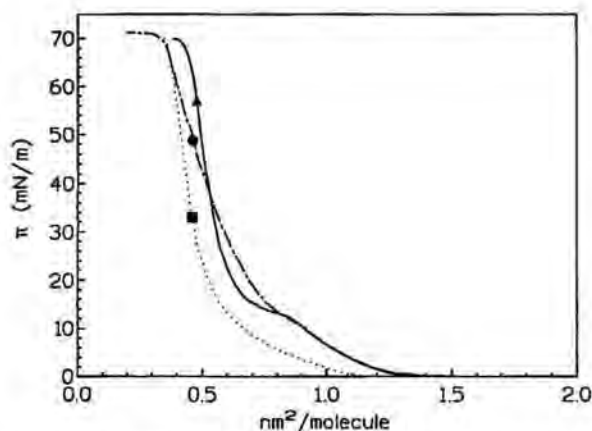


Figura 1.7 Isothermas de compresión (π vs A) de las monocapas (▲)DPPC, (■) DPPC/SA (9:1) y (●) DPPC/PI (9:1) extendidas en la interfase aire-agua a temperatura ambiente, subfase agua MilliQ resistividad 18.2 M Ω /cm.

Las monocapas al comprimir las presentan diferente comportamiento, las de DPPC y DPPC/SA pasan de fase líquida expandida a líquida condensada mientras que, para la mezcla de DPPC/PI (9:1) de fase líquida expandida pasa a fase líquido intermedio. En cuyo caso la película siempre estará más expandida.

La capa monomolecular catiónica, DPPC/SA (9:1) muestra valores más bajos de área por molécula en todo el rango de presión superficial, en cambio la monocapa aniónica de DPPC/PI (9:1) presenta a presiones superficiales grandes valores intermedios, pero a bajas presiones coincide con la isoterma de la película zwitteriónica de DPPC.

Generalmente, las monocapas cargadas están más expandidas debido a interacciones de repulsión entre sus grupos polares cargados (Cappuzzi, 1996a). Sin embargo, en nuestro caso la carga sólo representa un 10% del total y se puede considerar diluida en la matriz del lípido neutro, como es la DPPC. A partir de las isothermas de compresión de los componentes puros vemos que el área por molécula de SA es la más pequeña, mientras que la de la molécula de PI es la de mayor área, comparada con la DPPC. A partir de las isothermas de compresión de los componentes puros se obtienen los valores del área límite es decir, el área por molécula a nivel del colapso. Este valor para la DPPC es 0.6 nm² (Chavez, 1999), para PI es de 1.1 nm² mientras que para la SA es de 0.25 nm² siendo parecido al valor encontrado para el ácido esteárico y el estearato magnésico (Abousalham, 2000 y Birdi, 1994).

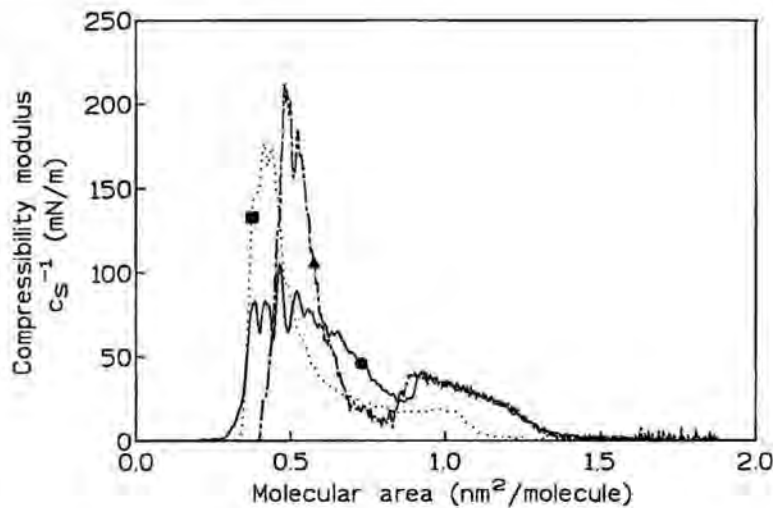


Figura 1.8 Módulos de compresibilidad (C_s^{-1}) de las monocapas (\blacktriangle) DPPC, (\blacksquare) DPPC/SA (9:1) y (\bullet) DPPC/PI (9:1) extendidas en la interfase aire-agua a temp. ambiente.

El registro gráfico del módulo de la compresibilidad respecto al área por molécula (C_s^{-1} vs A) muestra diferentes fases de la monocapa: gaseosa, líquido expandido, líquido intermedio y líquido condensado. La monocapa catiónica está en fase líquido condensado a áreas menores de $0.45 \text{ nm}^2/\text{molécula}$, por encima de este valor hasta $0.55 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ se encuentra en fase líquido intermedio, y para áreas más grandes la monocapa adopta una fase de líquido expandido. En el caso de la monocapa neutra de DPPC, el módulo de la compresibilidad indica la presencia de fase líquido condensado para áreas inferiores a $0.58 \text{ nm}^2/\text{molécula}$, una fase líquido intermedio para valores entre 0.58 y $0.63 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ y por encima de $0.63 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ se encuentra en fase líquido expandido. Finalmente, la monocapa aniónica como muestra la figura 1.6 tiene también un cambio de fase y es la más expandida de las tres monocapas. A áreas mayores de $0.7 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ presentan una fase líquido expandido y por debajo de este valor se encuentran como líquido intermedio. Además, el colapso se alcanza sin pasar por estado de líquido condensado.

Los valores del módulo de compresibilidad son importantes para describir los estados de fase de una monocapa, a la vez que proporcionan información complementaria sobre la miscibilidad de sus constituyentes cuando se extienden sobre una interfase aire-agua. Tanto la monocapa zwitteriónica como la aniónica presentan la misma área molecular en la fase líquido expandido. Sin embargo, la presencia de un pequeño porcentaje de cadena saturada además de carga positiva (SA) mejora el empaquetamiento de la monocapa neutra. El estado de fase condensado se alcanza para las monocapas, catiónica y zwitteriónica, aunque esta última se encuentra más expandida. En la fase líquido condensado las moléculas del lípido se encuentran empaquetadas fuertemente, estableciéndose interacciones a nivel de las cadenas alquílicas. En dicho estado la orientación de las moléculas será prácticamente perpendicular a la interfase. En la fase de líquido intermedio tanto las cadenas hidrocarbonadas como el grupo polar interactúan entre ellos, puesto que las moléculas lipídicas se encuentran unas de otras muy cercanas. Las tres monocapas presentan la fase líquido intermedio pero es para la aniónica, que el área por molécula es mayor. Seguramente la presencia de insaturaciones en las cadenas alquílicas del lípido PI o bien por la carga negativa de su grupo polar originan la expansión de la monocapa puesto que se establecen interacciones repulsivas entre moléculas, tanto a nivel de la cola como a nivel de la cabeza. Por el contrario, para la monocapa catiónica en

la mayoría de las mezclas se observa una buena compactación, debida a que la SA es un cadena de ácido graso saturado al igual que el ácido palmítico de la DPPC, las cuáles van a favorecer el empaquetamiento de la matriz neutra de DPPC. A pesar de que en algunas fracciones molares si se observan pequeñas interacciones de tipo repulsivo débiles como se muestran en los estudios de miscibilidad. Sin embargo, a dichas interacciones se asocia una energía de interacción lo suficientemente pequeña como para no ser significativa.

1.4 IMAGENES DE LAS CAPAS MONOMOLECULARES OBTENIDAS CON LA TECNICA DE AFM

A partir de los estudios previos de miscibilidad de DPPC con lípidos cargados, uno positivamente como la SA y otro negativamente como PI, se seleccionaron dos mezclas lipídicas DPPC-PI (9:1) y DPPC-SA (9:1). Las isothermas de compresión de dichas mezclas lipídicas se realizan sobre una subfase de agua para evitar los cambios en la disposición de las moléculas de lípidos debido a los iones de la subfase. Al comprimir las monocapas de DPPC-PI, DPPC y DPPC-SA hasta la presión de 15 mN/m, el área promedio que ocupan sus moléculas es 0.80, 0.66 y 0.55 nm²/molécula, respectivamente. Asimismo, su módulo de compresibilidad para todas ellas a dicha presión oscila entre 50-100 mN/m. Por tanto, las tres monocapas se encuentran en la región de coexistencia de fase líquido condensado y líquido expandido.

Estas monocapas de Langmuir-Blodgett (LB) extendidas sobre una subfase de agua, comprimidas hasta la presión superficial de 15 mN/m y extraídas sobre mica a la velocidad de 0.1 mN/min se han observado posteriormente por AFM en modo tapping (TMAFM). En dichas imágenes estudiamos la organización (forma de los dominios y orientación molecular) de las mismas. En este estado las cadenas alquílicas de todas las moléculas implicadas en el estudio se encuentran con cierto ángulo sobre la superficie de mica.

En el gráfico de la figura 1.7 puede observarse como la pendiente de la isoterma de DPPC al igual que la de la de DPPC-SA, son mayores a la de la DPPC-PI. Al considerar la misma presión superficial, la monocapa de DPPC-PI estará menos compacta que las otras dos. Las isothermas con mayor pendiente forman monocapas más condensadas y al mismo tiempo éstas poseen buena capacidad de deposición (Tsuji, 1997). Sin embargo, las de pendiente más suave forman películas expandidas que al extraerlas de la interfase aire-agua presentarán mayor dispersión (diferencias) respecto a la misma monocapa extendida sobre subfase agua.

Las imágenes de AFM de las tres monocapas se muestran en la figura 1.9. La monocapa neutra de DPPC viene representada por las imágenes A-A', la película con carga positiva DPPC-SA 9:1 por B-B', y la de DPPC-PI 9:1 de carga negativa por C-C'. Estas imágenes se tomaron a diferentes campos, de modo que vienen definidas por una dimensión de superficie en μm^2 ; y por la altura z , expresada en nm. Al observar con detalle la figura 1.9 comprobamos la diferente organización de las moléculas de DPPC en mezclas con un 10 % de lípido cargado. Por un lado, la monocapa DPPC-SA está prácticamente en fase líquido condensado (LC) a pesar de presentar algunas discontinuidades en fase líquido expandido (LE). Por otro lado, en la monocapa DPPC-PI la fase condensada se visualiza como dominios alargados de bordes regulares, en cuyo interior se aprecian orificios de diferentes tamaño. Pero en el exterior de estos dominios compactos en fase LC, no se

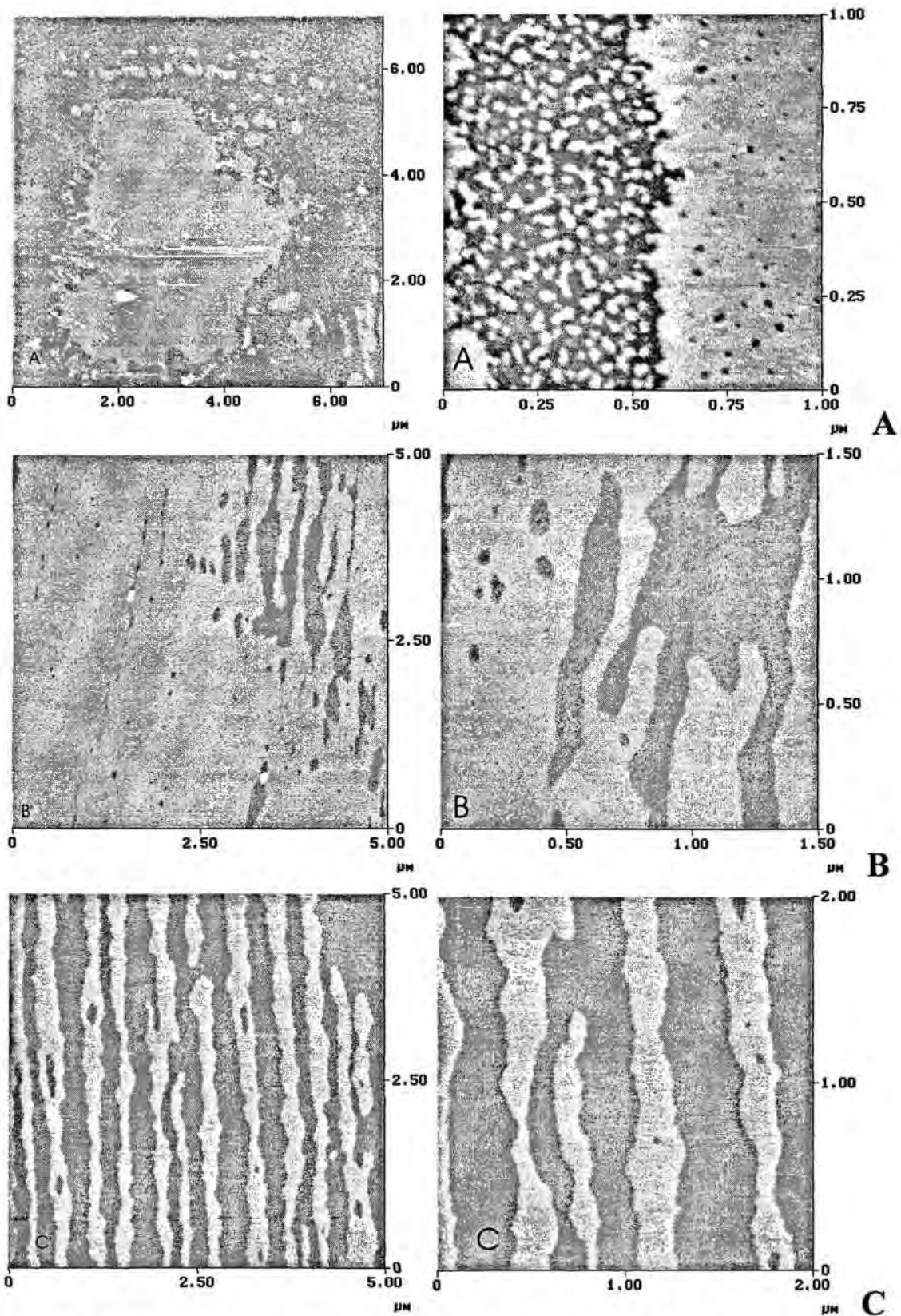


Figura 1.9 Imágenes de AFM tapping mode de las monocapas extendidas sobre subfase agua a temperatura ambiente A) DPPC, B) DPPC-SA (9:1), C) DPPC-PI (9:1) depositadas sobre mica a la presión de 15 mN/m. Las zonas claras corresponden a mayor altura que las zonas oscuras. La fase líquido condensado (LC) presenta mayor altura y se corresponde con la zona clara.

aprecia agrupación de unas cuantas moléculas en fase LC formando *clusters* al igual que sucede para la monocapa catiónica DPPC-SA en cuya fase LE tampoco existen clusters. Los factores que determinan la forma de los dominios son diversos. Cuando, la línea de tensión predomina se forman dominios circulares, en cambio si predominan fuerzas repulsivas entre dipolos individuales se originan formas alargadas o ramificadas (Dufrêne, 1997). Al considerar la monocapa neutra esta muestra claramente la coexistencia de dominios compactos LC con fase LE. Todos estos dominios condensados tienen formas redondeadas, las cuales se mantendrán hasta el colapso (Crane, 1999). Todas estas, son mezclas homogéneas ideales de DPPC-SA (9:1) o DPPC-PI (9:1), de acuerdo con los estudios de isotermas de las mezclas y del análisis termodinámico. Sin embargo, se observa la coexistencia de 2 fases pero no de dominios ricos en un componente.

La secuencia de imágenes 1A, 1B, 1C, 1D y 1 de la figura 1.10 resultan de ir reduciendo el campo a la que se toma la imagen de la película de DPPC. De este modo es posible visualizar los detalles de los dominios compactos, los cuales son menos compresibles y están a mayor altura (color claro). Cuando el campo es mayor (1A) aparece un macrodominio globular grande, siguiendo con la imagen 1B se observan macrodominios lobulares y otros más pequeños de formas ovoides. En las imágenes de campo más pequeño se detallan el borde dendrítico de los dominios compactos en fase LC, en cuyo interior existen orificios circulares cercanos al borde del mismo. El número de ellos disminuye hacia el centro del dominio. Similares resultados han sido descritos para el extracto de cerebro bovino (Peiró, 1998). Además, entre los macrodominios se sitúan pequeñas formas ovaladas en fase LC que llamamos microdominios o *clusters* (agregación de moléculas), las cuales se encuentran inmersas en la fase LE. Estos *clusters* según algunos autores (Hollars, 1998; Fang, 1995) no están presentes en la interfase aire-agua, pero son inducidas por la fina capa de agua que se deposita entre la mica y la película, al extraer la monocapa de la subfase y desecarla previamente a la observación con el microscopio de fuerzas atómicas.

A partir del estudio detallado de las imágenes de AFMTM de DPPC de la figura 1.10 se obtiene una altura relativa entre la fase líquido condensado (LC) (color claro) y la del líquido expandido (LE) (color oscuro) de 1.00 ± 0.3 nm. Los macrodominios compactos, tanto lobulares como ovoides grandes, inmersos en la fase líquido expandido muestran un ancho de 314 ± 27 nm y 168 ± 59 nm, respectivamente. Los microdominios ovoides que son como *clusters* tienen un diámetro es 49 ± 6 nm; resultados similares han sido descritos por (Yang, 1994) para la DPPC cuando se transfiere a bajas presiones ya que origina dominios circulares de 50 nm de diámetro. Ahora bien, en la zona más exterior del macrodominio globular se observan orificios circulares con un diámetro de 39 nm y éstos también, se encuentran distribuidos de forma homogénea, en los otros dominios compactos. En todas las imágenes se observan la coexistencia de *clusters* y dominios compactos, con una diferencia de alturas similares 0.6-0.9 nm.

La figura 1.11 incluye varias imágenes de AFMTM de la monocapa con carga positiva. Al aumentar el campo se visualiza una monocapa prácticamente completa, con algunas formas irregulares tanto grandes como pequeñas, en fase LE (2A y 2B). Estas se encuentran dentro de la matriz de fase LC. También en la imagen 2D observamos orificios circulares repartidos por todo el dominio compacto. La imagen 2C al igual que la anterior muestra prácticamente la monocapa en una fase LC a excepción de los orificios y los surcos más longitudinales en fase LE. Al ser la estearilamina un ácido graso con una sola

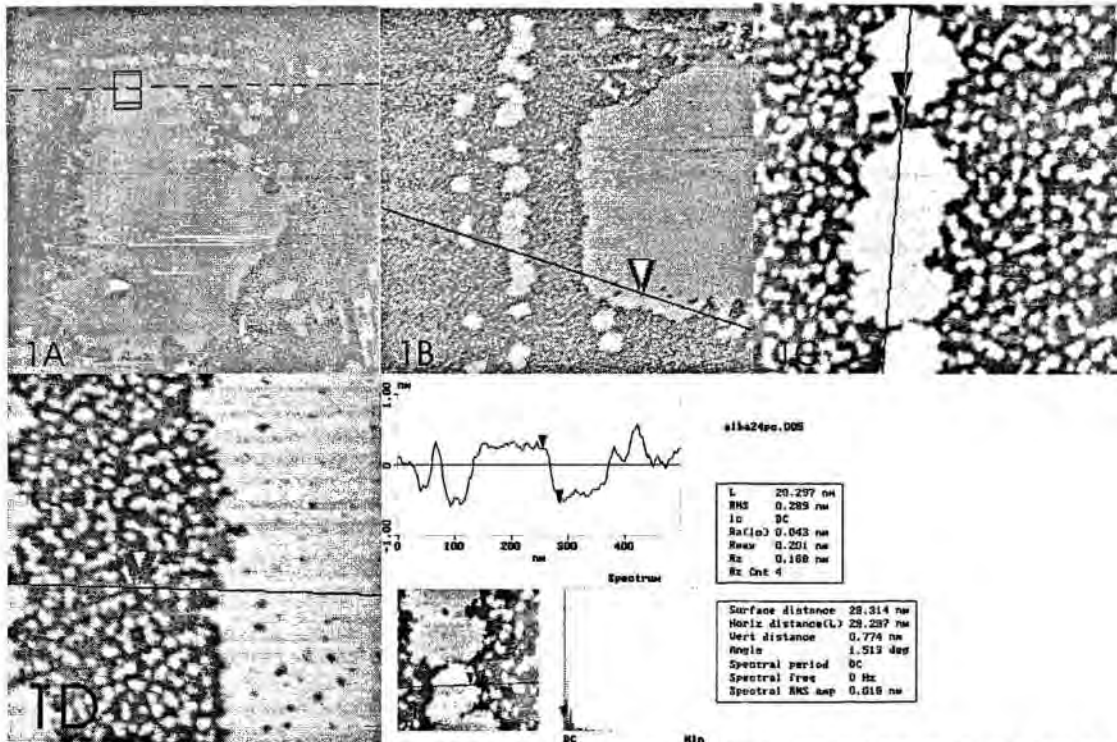


Figura 1.10 Imágenes de AFM modo *tapping* de la monocapa DPPC depositada sobre mica a la presión superficial de 15 mN/m a una velocidad de transferencia de 0.1 nm/min y a temperatura ambiente. Las imágenes están tomadas a diferentes campos. 1A) $(7 \times 7) \mu\text{m}^2$; $z=10$ nm, 1B) $(3 \times 3) \mu\text{m}^2$; $z=5$ nm, 1C) $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$; $z=2$ nm y 1D) $(1 \times 1) \mu\text{m}^2$; $z=3$ nm. La imagen 1 corresponde a un campo de $(500 \times 500) \text{nm}^2$; $z=2$ nm y el perfil da la altura del escalón entre un dominio compacto (claro, más alto) y la región no compacta (oscuro).

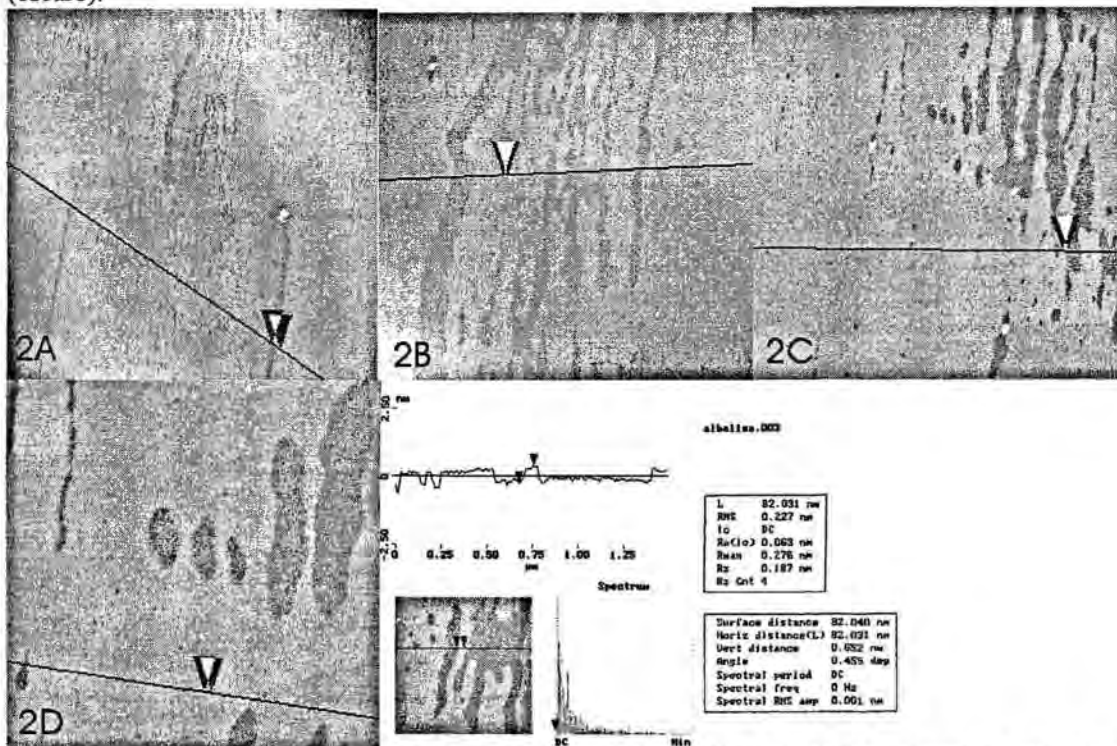


Figura 1.11 Imágenes de AFM modo *tapping* de la monocapa DPPC-SA(9:1) depositada sobre mica a la presión superficial de 15 mN/m, a una velocidad de transferencia de 0.1 nm/min y a temperatura ambiente. Las imágenes están tomadas a diferentes campos, 2A) $(15 \times 15) \mu\text{m}^2$; $z=10$ nm, 2B) $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$; $z=10$ nm 2C) $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$; $z=5$ nm y 2D) $(1.5 \times 1.5) \mu\text{m}^2$; $z=5$ nm de altura. La imagen 2 corresponde a un campo de $(1.5 \times 1.5) \mu\text{m}^2$; $z=5$ nm y el perfil da la altura del escalón entre un dominio compacto (claro, más alto) y la región no compacta (oscuro).

cadena saturada y un grupo polar que al pH del estudio esta cargado positivamente, probablemente este mejor adherido a la superficie de la mica. Por otra parte, se manifiesta entre las cadenas alquílicas de DPPC y la cadena de SA una mejor cohesión por acción de las fuerzas hidrofóbicas de Van der Waals. De hecho las moléculas con cadenas largas forman dominios compactos. También, las cadenas hidrocarbonadas palmitoil y estearil podrán interactuar lateralmente y compactarse mejor que las insaturadas. En consecuencia, las cadenas se situaran más perpendiculares a la superficie de la mica al ser depositadas sobre ella.

Al estudiar la estructura de DPPC-SA, la altura del escalón entre la fase LC y la fase LE es de 0.70 ± 0.2 nm (figura 1.11; 2). La fase expandida forma irregularidades cuyo diámetro para las grandes es 156 ± 37 nm y para las pequeñas es 76 ± 15 nm. Dentro de la misma matriz de LC se observan defectos circulares de fase LE uniformemente repartidos con un diámetro alrededor de 35 nm.

La altura de un escalón entre dominios es variable de acuerdo con dos factores: la fuerza (*setpoint*) aplicada sobre la muestra durante escaneo y la amplitud de vibración de la microplaca (relacionada con la energía que se transmite en la muestra en cada oscilación de la microplaca). Al aplicar mayor fuerza se aumenta la nitidez de la imagen como se produce entre la imagen 3D''' y la 3D' de la figura 1.12 para la monocapa de DPPC-PI. El motivo de la variación de la altura es la compresibilidad de las moléculas que forman los dominios (LE), que se encuentran en estado líquido poco compacto. Estos se comprimirán en mayor o menor grado de acuerdo con la mayor o menor fuerza aplicada sobre la muestra. La altura del escalón entre el dominio condensado y la fase menos compacta (LE) se encuentra entre 0.7 a 1.2 nm, según la fuerza aplicada. En modo *tapping* si aumentamos la fuerza aplicada por la microplaca aumenta la diferencia de altura entre las fases como consecuencia de que la fase menos compacta LE se comprime más. Así, para la monocapa de DPPC-SA la diferencia de altura entre las dos fases pasa de 0.50 nm a 0.70 nm, al tomar la imagen a menor campo y a mayor amplitud de vibración (figura 1.11; 2C y 2D).

Cuando se estudia la monocapa de DPPC-PI las imágenes de la figura 1.12 se muestran borrosas e inestables. Este fenómeno se debe a la atracción que existe entre la punta del *cantilever* y la muestra. Así, la muestra es arrastrada por la punta, no permitiendo la obtención de imágenes estables, dada la carga negativa de la película (Hilde, 1999). El escalón entre los dominios compactos alargados con bordes nítidos y paralelos respecto a la fase LE (más baja) es 1.10 ± 0.15 nm. La amplitud de los dominios longitudinales alrededor de 180 ± 69 nm. Para subsanar los problemas de nitidez, las imágenes de las muestras se obtuvieron a partir de monocapas de una solución de DPPC-PI 100 veces diluida. A pesar de la cantidad mínima de PI, las imágenes mantenían la misma disposición de los dominios compactos sobre la mica (figura 1.13). Sin embargo, la distancia entre los dominios compactos paralelos es menor, alrededor de 105 ± 15 nm. En el interior del dominio compacto de la imagen 3 existen orificios de tamaño 87 ± 10 nm con una altura de 1.3 ± 0.1 nm. En la fase LE no encontramos microdominios LC o *clusters* como en el caso de las imágenes del lípido zwitteriónicas (DPPC).

La capa monomolecular de DPPC-PI en la figura 1.13 se visualiza como dominios longitudinales de LC, donde la amplitud es 286 ± 45 nm y la periodicidad de los mismos es 116 ± 10 nm y la altura entre fases LC- LE es 1.10 ± 0.10 nm. Dentro de los dominios compactos observamos pocos orificios. En el caso de considerar que las moléculas de DPPC constituyen la fase condensada mientras que la fase LE la constituyen las moléculas

de PI. Tal como en el estudio de la mezcla lipídica (1:1) de DSPE y DOPE, los cuales muestran separación de fases en forma de dominios circulares de DSPE embebidos en una matriz de DOPE con diferencia de altura 1.3 nm entre ellos (Dufrêne, 1997). Esta separación de fases se explica así por el diferente empaquetamiento molecular de los mismos lípidos.

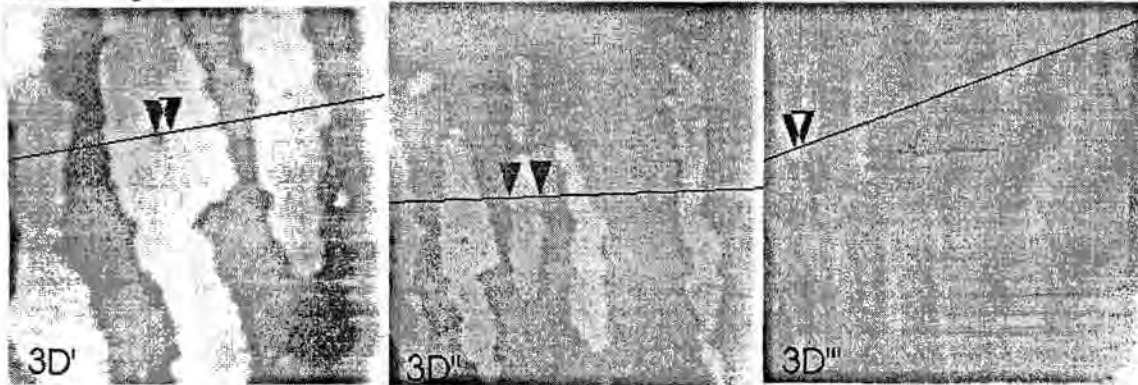


Figura 1.12 Imágenes de AFM modo *tapping* de la monocapa DPPC-PI (9:1) depositada sobre mica a la presión superficial de 15 mN/m a una velocidad de transferencia de 0.1 nm/min y a temperatura ambiente. Las imágenes están tomadas a diferente campo. 3D') (700X700) nm²; z=3 nm. 3D'') (1.5X1.5) μm²; z=10 nm. 3D''') (4X4) μm²; z=30 nm, El perfil da la altura del escalón entre un dominio compacto, fase LC (claro) y la región no compacta, fase líquida expandido LE (oscuro).

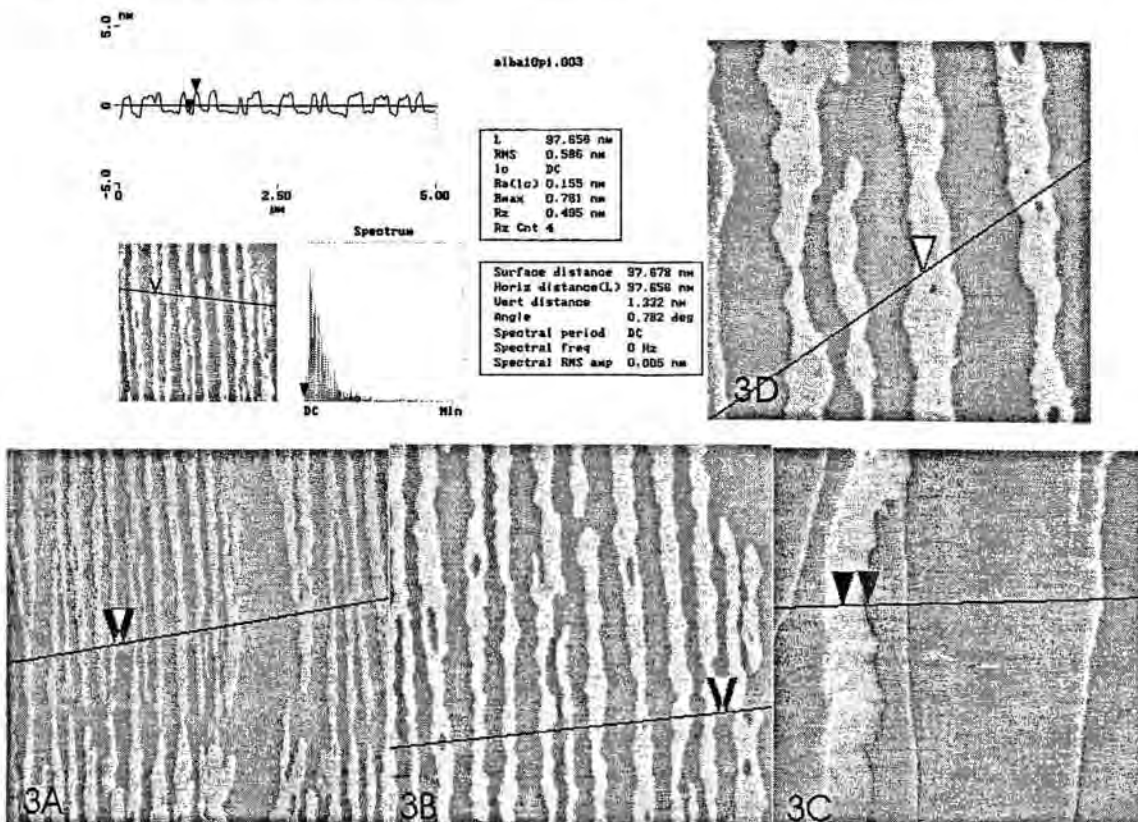


Figura 1.13 Imágenes de AFM modo *tapping* de la monocapa DPPC-PI (99:1) depositada sobre mica a la presión superficial de 15 mN/m a una velocidad de transferencia de 0.1 nm/min y a temperatura ambiente. Las imágenes están tomadas a diferentes campos 3A) (10X10) μm²; z=10 nm, 3B) (5X5) μm²; z=10 nm, 3C) (10X10) μm²; z=10 nm y 3D) (2X2) μm²; z=10 nm. La imagen 3 corresponde a un campo de (5X5) μm²; z=10nm y el perfil representa la altura del escalón entre un dominio compacto, fase LC (claro, más alto) y la región no compacta (oscuro), fase LE.

En nuestro caso la proporción lipídica es solo un 10 % de lípido insaturado y negativo, lo cuál no se refleja en la placa de mica, ya que en ella si existieran fases separadas, la fase LC se encontraría en mayor cantidad respecto a la fase LE. Es decir, si fuéramos a calcular el área ocupada con fase fluida (LE) a partir de los resultados de las isotermas y asumiendo una completa inmiscibilidad la fase LE (color oscuro) sería al menos un 10 % del total de superficie de mica cubierta y no es así.

Las monocapas DSPC/PI (9:1) presentan formas alargadas e irregulares con lados angulosos cuya altura entre fase LC-LE es 0.84 ± 0.06 nm por ángulo brewster (BAM) y corroborado por SFM según De Wolf (DeWolf, 1999). Por otra parte Koppenol y col. (Koppenol, 1997) han estudiado miscibilidades entre fosfatidilcolinas saturadas e insaturadas y concluyen que la DPPC forma monocapas miscibles a las fracción molares de 1 a 0.7 (DPPC) a cualquier presión hasta el colapso con DPPG, POPC, DOPC y además, forma monocapas mixtas que son parcialmente inmiscibles con DOPG y POPG a fracciones molares de 0.5 o mayores. Nuestro caso, el de la monocapa de DPPC-PI (9:1) estaría englobado dentro de las monocapas cuya proporción es miscible según estos autores.

La monocapa de DPPC-PI (9:1) visualizada por AFM muestra macrodominios alargados de fase LC (color claro) que se alternan con fase LE (color oscuro). En parte, estos dominios alargados se explican por los puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos polares (hidroxilo) de la cabeza de PI y el agua, al extraer la monocapa de la subfase. Y por otra parte, al ser dicha monocapa una mezcla de cadenas saturada e insaturada de diferente proporción y longitud, con un grupo polar grande en comparación con su área de sección se esperan menores fuerzas de interacción de tipo Van der Waals entre las cadenas alquílicas. De este modo, entre las cadenas alquílicas existirá poca cohesión.

En conclusión la presencia de 10 % cargado de lípido en la matriz neutra de un fosfolípido saturado, como es la DPPC altera el equilibrio de sus moléculas en fase LC y fase LE, a la presión superficial de 15 mN/m. Cuando en dicha monocapa existe el ácido graso SA, que es una cadena alquílica saturada, las moléculas de DPPC condensan más rápidamente es decir que el equilibrio entre las fases se desplaza hacia la fase condensada o compacta (LC), y a la presión superficial de estudio prácticamente toda la monocapa está en fase LC. Sin embargo, la existencia del inositol en la monocapa retrasa la velocidad de condensación de las moléculas de DPPC.

Este hecho lo podríamos explicar a la poca proporción de PI presente en la monocapa, la cuál retrasa la formación de los dominios compactos o el paso de las moléculas a fase LC. Además será consecuencia en primer término, a la cabeza de PI es grande en comparación con la de la DPPC y además es negativa. En segundo término, la existencia de dobles enlaces (insaturaciones) que evitarán la compactación entre las cadenas alquílicas constitutivas de dicha monocapa.

II CARACTERIZACION

2. CARACTERIZACION DE LA SINTESIS PEPTIDICA

2.1 SINTESIS DE LA ESTRUCTURA PEPTIDICA MAP₄VP3 (110-121)

El péptido se ha sintetizado manualmente en fase sólida en el Departamento de Química de Peptidos y Proteínas del I.I.Q.A.B.-C.S.I.C (Pérez, 1995a). El soporte sólido de síntesis es una resina Wang con grado de funcionalización de 0.8 mEq/g. Para la síntesis se partió de 2 mmol de Fmoc-Ala activada previamente la cuál se esterificó sobre 2 g de resina. La reacción de incorporación del primer AA se llevó a cabo en menor extensión a fin de evitar impedimentos estéricos durante la síntesis de la macromolécula (funcionalización final de 0.1mEq/g). Los grupos que no reaccionaron fueron acetilados con Ac₂O (2Eq)/ DMF en presencia de 1Eq 4-dimetilaminopiperidina (DMAP) durante 30 min. El core de lisina tetravalente se obtuvo por coupling secuencial de 0.3, 0.6 y 1.2 mmol de Fmoc-Lys(Fmoc), que se incorporó mediante el empleo de los activadores diisopropilcarbodiimide y hidroxibenzotriazol. Se realizaron tests de ninhidrina para el control de cada etapa de acoplamiento y desprotección.

Se realizaron controles analíticos exhaustivos. El core de lisina (Lys₃-Ala) y varios intermedios sintéticos fueron controlados por AAA y por ES-MS. Unicamente se requirió la repetición de un paso sintético, en la incorporación de Fmoc-Arg(Pmc). Durante el proceso sintético fueron necesarios tiempos de reacción más largos, tanto para la acilación como para la desprotección.

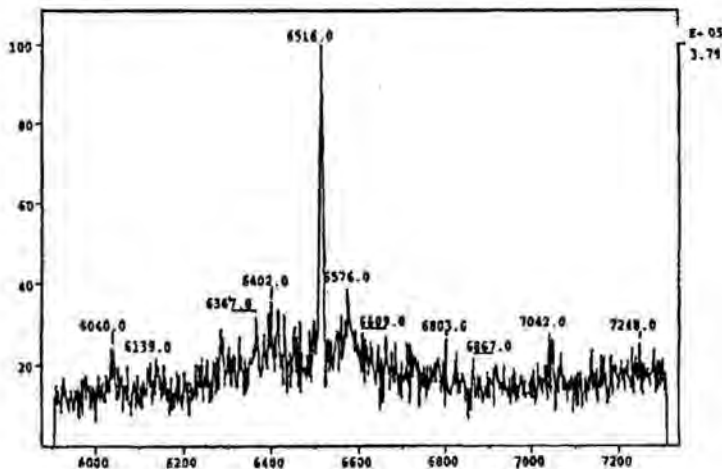


Figura 2.1 Espectro de masas correspondiente al MAP₄VP3 (110-121). Peso molecular de MAP₄VP3 (110-121) es $[M+H]^+ = 6516.0$.

Tras finalizar la síntesis se procedió en primer lugar a eliminar el grupo protector terminal Fmoc con piperidina/DMF 20% y seguidamente se añadió sobre la peptidil-resina la mezcla de desprotección formada por TFA:Etanditiol:H₂O (85:10:5,v/v/v), la cual se dejó actuar durante unas dos horas a temperatura ambiente. Después de separar la resina y lavar varias veces con éter, se secó la resina al vacío y el péptido crudo se precipitó con éter.

Al finalizar el desanclaje del MAP₄VP3 (110-121) se procedió a la purificación del péptido obtenido mediante diálisis según el procedimiento descrito en el apartado 1.2 de materiales y métodos. El rendimiento global del desanclaje y la purificación posterior fue de un 19%.

El péptido se caracterizó con HPLC analítico, análisis de aminoácidos y por ES-MS.

En la figura 1.1 se aprecia un pico mayoritario que corresponde al PM de la estructura sintetizada. Los resultados tanto del análisis de AA como los obtenidos por HPLC del MAP₄VP3 (110-121) se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 2.1 Caracterización del sistema MAP₄VP3 (110-121)

ANÁLISIS DE AMINOACIDOS ¹		HPLC ²
D=4.75(8)	R=3.65(4)	K'=11.82
E=3.46(4)	V=7.73(8)	
G=4.17 (4)	F=8.43(12)	
A=1(1)	K=1.21(3)	
L=3.71(4)		

1-Valores teóricos entre paréntesis

2-Condiciones de HPLC: spherisorb C-18 (10 µM); flujo 1 ml/min.; detección 255 nm; elución en gradiente con A= H₂O (0.1%TFA) y B= ACN (0.1%TFA), 5 min isocrático 90% A seguido de un gradiente 90% A hasta un 10%A en 30 min.

2.2 SINTESIS DE LA ESTRUCTURA PEPTIDICA MAP₄VP1 (11-25)

La síntesis del MAP₄VP1 (11-25) se ha realizado también manualmente en fase sólida (en el I.I.Q.A.B- C.S.I.C) utilizando una resina Wang cuya funcionalización inicial era de 0.8 mEq/g. Al igual que para el MAP tetramérico correspondiente a la región VP3 (110-121) la incorporación del primer AA del péptido(Fmoc-Ala) se llevo a cabo en menor extensión para conseguir una funcionalización de la resina del orden de 0.1 mEq/g que evitará los impedimentos estéricos, que podrían originarse durante la síntesis del MAP.

En la síntesis se empleó un exceso triple tanto de aminoácidos como de reactivos de condensación, y el tiempo de reacción se prolongó por espacio de unas 3 h, para asegurar un buen rendimiento de las reacciones de acilación. También, durante esta síntesis se requirieron tratamientos con Pip/DMF más prolongados en las reacciones de desprotección sucesivas de los grupos α-aminos terminales.

Se realizaron controles analíticos exhaustivos (test de ninhidrina en cada acoplamiento y desprotección). El core de lisina (Lys₃-Ala) y varios intermedios sintéticos fueron controlados por AAA y por ES-MS. Se requirió la repetición de la carga de Ile, 2^a Val, Glu, 1^{er} Thr y 3^{era} Val.

Al finalizar la síntesis se procedió al secado y desanclaje del MAP₄VP1 (11-25) según el procedimiento descrito en el apartado 1.2 de métodos. Después se dializó el producto

obtenido tal como se describe en el apartado 1.2 de métodos, siendo el rendimiento global tras el proceso de purificación de un 36.8%.

El péptido se caracterizó por ES-MS (figura 2.1), dónde se aprecia un pico mayoritario que corresponde al PM de la estructura sintetizada.



$[M+H]^+ = 6734.0$
 $MAP_4VP1(11-25)$

Figura 2.2 Espectro de masas correspondiente al $MAP_4VP1(11-25)$. Peso molecular de $MAP_4VP1(11-25)$ es $[M+H]^+ = 6734.0$.

También se realizaron un AAA, y un análisis por HPLC de la estructura sintetizada cuyos resultados se refieren en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Caracterización del sistema $MAP_4VP1(11-25)$

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS ¹		HPLC ²
D=6.5(8)	A=1(1)	K'=3.5
E=9.02(12)	P=5.94(8)	
S=2.1(4)	V=12.37(12)	
G=3.08(4)	I=2.72(4)	
T=5.1(8)	K=1.25(3)	

1-Valores teóricos entre paréntesis

2-Condiciones de HPLC: spherisorb C-18 (10 μ M); flujo 1 ml/min.; detección 255 nm; elución en gradiente con A= H_2O (0.05%TFA) y B= ACN (0.05%TFA), 20 % B hasta un 80 %B en 20 min.

III INTERACCIÓN DE LOS PEPTIDOS EN MONOCAPAS

Los péptidos inmunogénicos son, generalmente, moléculas con actividad superficial, dado su carácter anfipático y además, dado que para desarrollar su acción biológica los inmunopéptidos deben interactuar con la membrana, la técnica de Langmuir (monocapas) resulta de gran utilidad para el estudio de las propiedades tanto fisicoquímicas como biológicas de los mismos (Maget-Dana, 1999a).

La investigación la centraremos en el estudio de la adsorción del péptido en la interfase aire/agua, su disposición-comportamiento en una capa monomolecular, cómo penetra en una monocapa lipídica (siendo ésta un modelo de membrana) y por último, ver las interacciones del péptido con moléculas de lípido en un sistema de monocapas mixto péptido-lípido.

3. CINÉTICAS DE PENETRACION

3.1 ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE MAP₄VP3 (110-121)

Las propiedades de la interfase se ven afectadas por los cambios que se producen en cada una de las dos fases de que consta la misma, y en especial por la presencia de un soluto en la fase líquida. Muchas moléculas peptídicas, a pesar de ser solubles en agua, son capaces de disminuir la tensión superficial. Algunos péptidos al igual que los lípidos, los polímeros y las proteínas, se llaman biosurfactantes puesto que pueden adsorberse en la interfase. Estos son sustancias anfifílicas, es decir moléculas asimétricas con tendencia a estar orientadas en la interfase. La construcción tetramérica MAP₄VP3 (110-121) presenta cuatro extremos amino-terminal compuestos por aminoácidos no polares y un solo extremo carboxamida, con tres residuos de lys (lisina) altamente polares. Por tanto, al ser inyectado en una subfase acuosa de PBS, tienden a acumularse en la interfase aire/agua de modo que su extremo polar quede sumergido en esta última. De este modo, la tensión superficial del tampón PBS disminuye y la presión superficial en la interfase aumenta.

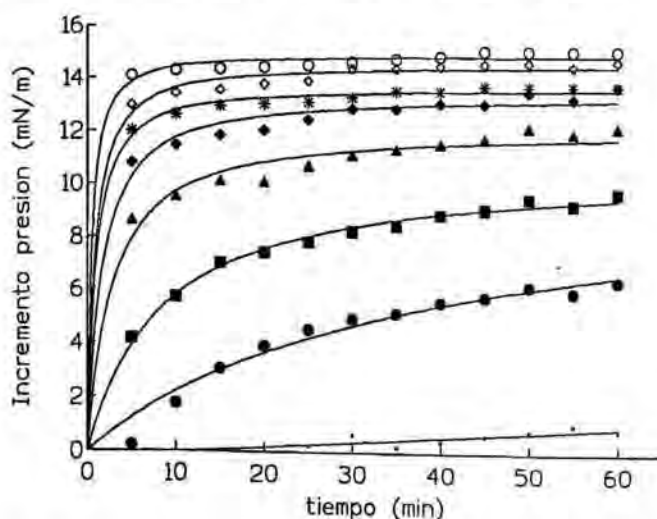


Figura 3.1 Incremento de presión superficial inducido por el péptido MAP₄VP3 (110-121), medido a diferentes concentraciones del mismo. (•) 0.02μM, (●) 0.05μM, (■) 0.11μM, (▲) 0.22μM, (◆) 0.27μM, (*) 0.33μM, (◇) 0.38μM (○) 0.44μM. Subfase PBS 50 mM.

III INTERACCION DE LOS PEPTIDOS EN MONOCAPAS

Los péptidos inmunogénicos son, generalmente, moléculas con actividad superficial, dado su carácter anfipático y además, dado que para desarrollar su acción biológica los inmunopéptidos deben interactuar con la membrana, la técnica de Langmuir (monocapas) resulta de gran utilidad para el estudio de las propiedades tanto fisicoquímicas como biológicas de los mismos (Maget-Dana, 1999a).

La investigación la centraremos en el estudio de la adsorción del péptido en la interfase aire/agua, su disposición-comportamiento en una capa monomolecular, cómo penetra en una monocapa lipídica (siendo ésta un modelo de membrana) y por último, ver las interacciones del péptido con moléculas de lípido en un sistema de monocapas mixto péptido-lípido.

3. CINETICAS DE PENETRACION

3.1 ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE MAP₄VP3 (110-121)

Las propiedades de la interfase se ven afectadas por los cambios que se producen en cada una de las dos fases de que consta la misma, y en especial por la presencia de un soluto en la fase líquida. Muchas moléculas peptídicas, a pesar de ser solubles en agua, son capaces de disminuir la tensión superficial. Algunos péptidos al igual que los lípidos, los polímeros y las proteínas, se llaman biosurfactantes puesto que pueden adsorberse en la interfase. Estos son sustancias anfifílicas, es decir moléculas asimétricas con tendencia a estar orientadas en la interfase. La construcción tetramérica MAP₄VP3 (110-121) presenta cuatro extremos amino-terminal compuestos por aminoácidos no polares y un solo extremo carboxamida, con tres residuos de lys (lisina) altamente polares. Por tanto, al ser inyectado en una subfase acuosa de PBS, tienden a acumularse en la interfase aire/agua de modo que su extremo polar quede sumergido en esta última. De este modo, la tensión superficial del tampón PBS disminuye y la presión superficial en la interfase aumenta.

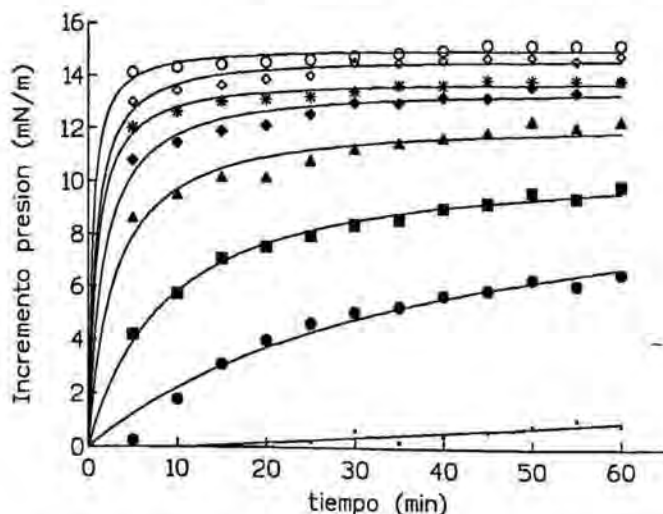


Figura 3.1 Incremento de presión superficial inducido por el péptido MAP₄VP3 (110-121), medido a diferentes concentraciones del mismo. (●) 0.02μM, (●) 0.05μM, (■) 0.11μM, (▲) 0.22μM, (◆) 0.27μM, (*)0.33μM, (◇) 0.38μM (○) 0.44μM. Subfase PBS 50 mM.

Este experimento se llevó a cabo según se describe en el apartado 2.1.2.2 de la sección de materiales y métodos. El proceso de adsorción se determinó para diferentes concentraciones iniciales de péptido en la subfase acuosa. Los resultados obtenidos del registro del incremento de presión superficial frente al tiempo, para las diferentes concentraciones de péptido ensayadas se muestran en la figura 3.1. A concentraciones pequeñas, menores de 0.05 μM se observa un tiempo de latencia entre la inyección del péptido y el inicio de su adsorción a la interfase. A concentraciones mayores de 0.22 μM , la difusión de las moléculas de péptido a la interfase es rápida y prácticamente completa en los primeros 10 minutos después de la inyección. En cambio, para las concentraciones intermedias el proceso de adsorción resulta más lento. La saturación de la interfase se produce para una concentración peptídica de 0.33 μM .

A partir de los resultados se comprueba que la cinética del proceso de incorporación de MAP₄VP3 a la interfase aire/agua depende de la concentración inicial de péptido en la subfase, siendo más rápido el aumento de la presión superficial cuanto mayor es la cantidad de péptido inyectada.

En la figura 3.2 se representan los incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) alcanzados a los 60 minutos para las diferentes concentraciones estudiadas. La curva observada se ajusta a una hipérbola rectangular del tipo:

$$\Delta\pi = \Delta\pi_m c/K + c \quad (6)$$

dónde $\Delta\pi_m$ es el máximo incremento de presión superficial, c la concentración de péptido en la subfase y K la concentración a la que se alcanza $\Delta\pi_m/2$.

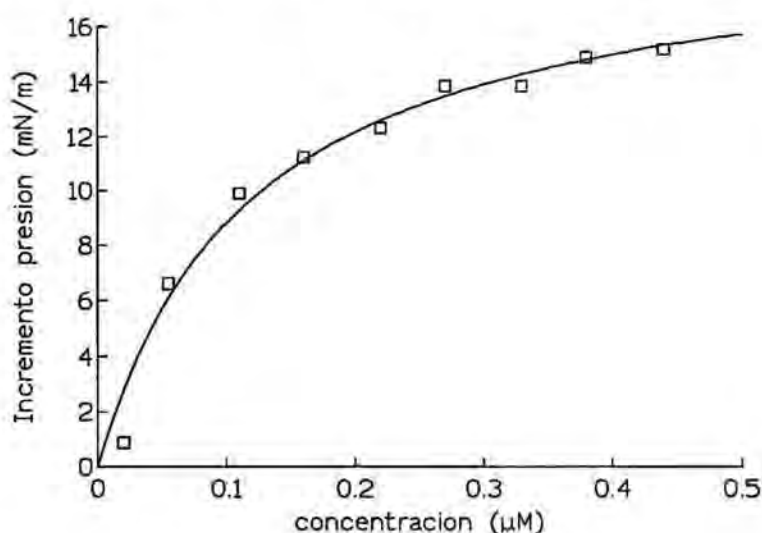


Figura 3.2 Incrementos de presión superficial a los 60 min inducido por el MAP₄VP3 (110-121) medido a diferentes concentraciones del mismo en la subfase de PBS 50 mM.

Al ajustar los datos experimentales que se muestran en la figura 3.2 a la ecuación se obtienen los siguientes parámetros:

Tabla 3.1 Parámetros del tratamiento matemático de la curva de la figura 3.2 según la ecuación 6.

$\Delta\pi_m = 19 \text{ mN/m}$	$K = 0.12 \mu\text{M}$	$r^2 = 0.973$
---------------------------------	------------------------	---------------

Al aplicar a los valores obtenidos de los registros gráficos la ecuación que define la isoterma de adsorción de Gibbs, se calcula el exceso superficial de péptido en la interfase con respecto a la subfase (Γ).

$$\Gamma = \Delta\pi / (RT \Delta \ln c) \text{ (mol/m}^2\text{)} \quad (7)$$

donde R vale 8.32 J/ K mol, T es la temperatura a la que se realiza el experimento (en este caso temperatura ambiente de 294 K), c la concentración de péptido en la subfase y $\Delta\pi$ el incremento de presión a los 60 minutos.

Además, se calcula la correspondiente área por molécula utilizando la ecuación:

$$\text{Area} = 1/N\Gamma \quad (8)$$

siendo N el número de Avogadro, 6.023×10^{23} moléculas/mol.

El exceso superficial se ha calculado solo para las concentraciones de péptido en las que se alcanzaba el equilibrio. En la tabla 3.2 se indican los valores de exceso y área ocupada por molécula para las diferentes concentraciones de péptido estudiadas.

Tabla 3.2 Valores de exceso superficial (Γ) y área por molécula para diferentes concentraciones iniciales de MAP₄VP3 (110-121) en la subfase.

Concentración (μM)	Exceso Γ (mol/m ²)	Area (nm ² /molec.)
0.22	$3.3 \cdot 10^{-6}$	0.5
0.27	$4.3 \cdot 10^{-6}$	0.4
0.33	$5.6 \cdot 10^{-6}$	0.3
0.38	$6.4 \cdot 10^{-6}$	0.26
0.44	$6.9 \cdot 10^{-6}$	0.24

3.2 CINÉTICAS DE PENETRACION A AREA CONSTANTE

Los experimentos de penetración de péptidos en monocapas constituyen un modelo válido para estudiar las interacciones entre estas moléculas y las membranas, ya que proporcionan información que en muchos casos es extrapolable a la interacción de péptidos con lípidos organizados en bicapas, tal como se encuentran en las membranas biológicas.

La interacción del MAP₄ VP3 con monocapas lipídicas formadas por tres lípidos de diferente carga eléctrica, DPPC (zwitteriónico), PI (aniónico) y SA (catiónico), se determinó mediante cinéticas de penetración, midiendo el incremento de presión

superficial ($\Delta\pi = \pi - \pi_0$) producido por el péptido al incorporarse a dichas monocapas. La diferente carga eléctrica de la capa monomolecular nos permite evaluar el factor electrostático en la interacción lípido/péptido. La influencia de la densidad de empaquetamiento lateral de los lípidos en dicha interacción, se estudia en monocapas extendidas a las diferentes presiones superficiales iniciales de 5, 10 y 20 mN/m. El último valor equivale al encontrado en las bicapas lipídicas de los liposomas (Marsh, 1996). La cantidad de péptido inyectada en la subfase, PBS pH 7.4, fue de 0.22 μM , un valor inferior a la concentración de saturación obtenida en el ensayo de la actividad superficial.

En primer lugar se determinó la penetración del péptido en una monocapa zwitteriónica de DPPC. En la figura 3.3 se muestran los registros de $\Delta\pi$ en función del tiempo. A la presión inicial de 5 mN/m los máximos incrementos de presión superficial se alcanzan en los primeros 30 minutos, mientras que la incorporación del péptido en monocapas extendidas a las presiones de 10 y 20 mN/m fue más gradual.

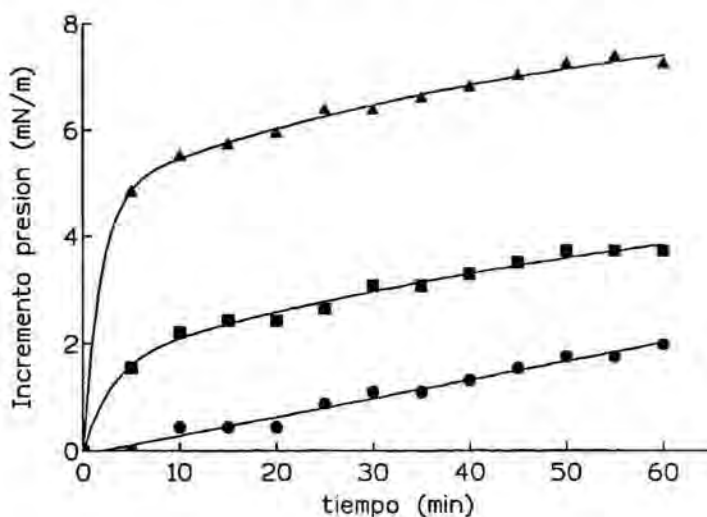


Figura 3.3 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPC, a las presiones iniciales de 5(▲), 10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP3 en la subfase 0.22 μM .

El proceso de inserción fue analizado por regresión no lineal según la ecuación:

$$\Delta\pi = A \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + B \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad (9)$$

Donde A y B son los incrementos de presión superficial correspondientes a dos procesos cinéticos de primer orden, con tiempo de semivida ($t_{1/2}$) de $0.69/k_1$ y $0.69/k_2$, respectivamente, siendo k_1 y k_2 las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

Los parámetros cinéticos se resumen en la tabla 3.3, a presiones superficiales de 5 y 10 mN/m, la inserción de MAP₄ VP3 tiene lugar en dos procesos de primer orden, uno rápido con $t_{1/2} < 5$ minutos, y otro más lento. Se observa que a medida que aumenta la densidad de empaquetamiento de la monocapa, aumenta la contribución del proceso de inserción más lento. A la presión de 10 mN/m el proceso mayoritario es el lento. A la presión de 20 mN/m la monocapa está más compactada y el péptido se incorpora muy lentamente, no pudiéndose ajustar al modelo cinético propuesto.

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos de la penetración de MAP₄VP3 (110-121) en monocapas de DPPC a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k₁ y k₂ son las constantes específicas de velocidad de cada proceso(min⁻¹).

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₁ (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₂ (B)	r ²
5	1.26 (55%)	37.22 (45%)	0.998
10	2.08 (28%)	53.39 (72%)	0.999

Se realizó el mismo estudio para una capa monomolecular cargada negativamente. El lípido fosfatidilinositol se extendió a diferentes presiones iniciales sobre una subfase de PBS, en la cuál se inyecta el péptido. Las cinéticas de penetración, es decir el incremento de la presión superficial respecto al tiempo, se muestran en la figura 3.4.

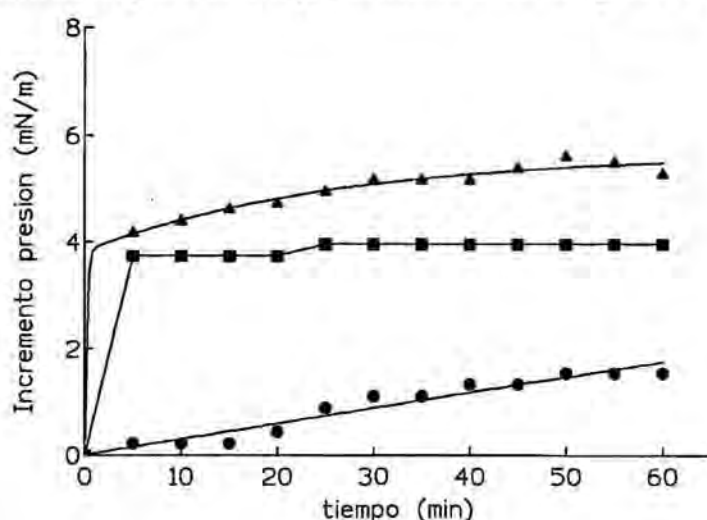


Figura 3.4 Incrementos de presión superficial en monocapas de PI a las presiones iniciales de 5 (▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP3 en la subfase 0.22 μM.

La incorporación del péptido es rápida para las presiones iniciales de 5 y 10 mN/m, se observa que los máximos del incremento de la presión superficial se alcanzan en los primeros 5 minutos. A la presión de 20 mN/m el péptido se incorpora a la interfase de modo mucho más lento y gradual, no completándose el proceso a los 60 minutos de la inyección.

El tratamiento matemático de los resultados según la ecuación 9 indica que la incorporación de MAP₄VP3 a la monocapa negativa a la presión de 5 mN/m sigue dos procesos cinéticos de primer orden. Un proceso rápido, t_{1/2} inferior a 5 minutos y mayoritario, al cuál le corresponde 67% del incremento total de π, y uno más lento minoritario con t_{1/2} = 18 minutos. A presiones superiores, los datos experimentales no se pueden ajustar al modelo cinético propuesto. A la presión de 10 mN/m se observa una incorporación muy rápida del péptido a la monocapa, completa en 5 minutos. A 20 mN/m de presión inicial la incorporación es muy lenta. Todos los parámetros obtenidos se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Parámetros cinéticos de la penetración de MAP₄VP₃ (110-121) en monocapas de PI a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k₁ y k₂ son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₁ (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₂ (B)	r ²
5	0.21 (67%)	18.15(33%)	0.995
10	0.15(94%)	-	0.991

Las cinéticas de penetración de MAP₄VP₃ en monocapas formadas por el lípido catiónico SA extendidas a diferentes presiones iniciales, se muestra en la figura 3.5.

Las curvas resultantes se ajustaron a un modelo cinético correspondiente a dos procesos de penetración de primer orden, independientemente de la presión superficial inicial. Los parámetros cinéticos (tabla 3.5) son consistentes con la existencia de un proceso rápido, con t_{1/2} < 5 minutos, y que corresponde a un incremento de presión de entre el 30 y 60 % del total, y un proceso lento con t_{1/2} elevada.

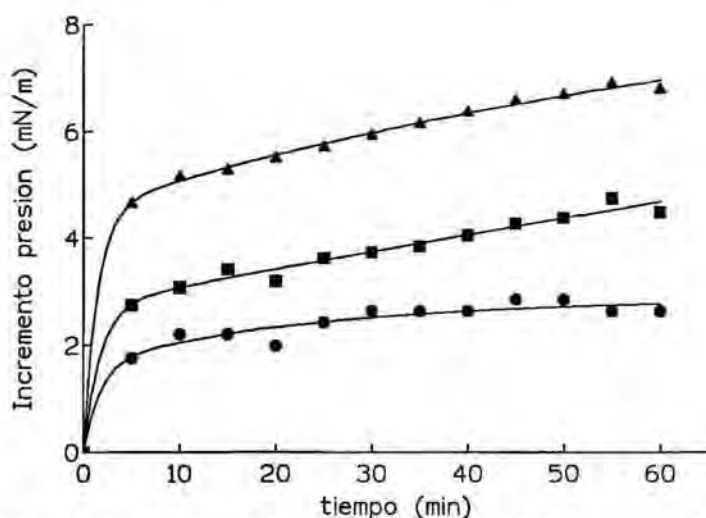


Figura 3.5 Incrementos de presión superficial en monocapas de SA a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP₃ en la subfase 0.22 μM.

Tabla 3.5 Parámetros cinéticos de la penetración de MAP₄VP₃ (110-121) en monocapas de SA a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k₁ y k₂ son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₁ (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₂ (B)	r ²
5	0.17 (49.45%)	56 (50.5%)	0.998
10	0.17 (33.5%)	92 (67%)	0.999
20	1.2 (56.7%)	17.9 (43.3%)	0.964

Incorporación de MAP₄ VP3 en monocapas de dos componentes: consideraciones finales

A partir de las cinéticas de penetración de MAP₄ VP3 en las diferentes monocapas lipídicas, se obtuvieron los incrementos de presión superficial total a diferentes presiones iniciales a los 60 minutos de la inyección (figura 3.6). Estos incrementos de presión fueron inversamente proporcionales a la presión inicial, con una inserción del péptido marcadamente más difícil a medida que aumenta la densidad de empaquetamiento de las moléculas de lípido. Este comportamiento se ha descrito para la interacción de otros péptidos con monocapas, como los péptidos de la cápside del virus de la HVA, por ejemplo VP3-RGD y VP3-RGA (Chavez, 1999) y para diferentes construcciones peptídicas de la secuencia 96-107 de la proteína VP2 del mismo virus (Mota, 1997). Se observa también que la interacción de MAP₄ VP3 con las diferentes monocapas cuenta con un componente electrostático, con mayores incrementos de presión en la monocapa catiónica a todas las presiones iniciales. Los menores incrementos corresponden siempre a la monocapa aniónica, como es de esperar dado el carácter aniónico del péptido al pH de los experimentos. No obstante, la interacción cuenta también con un componente hidrofóbico ya que se obtienen importantes incrementos de presión superficial en los tres tipos de monocapas, aniónica, catiónica y zwitteriónica.

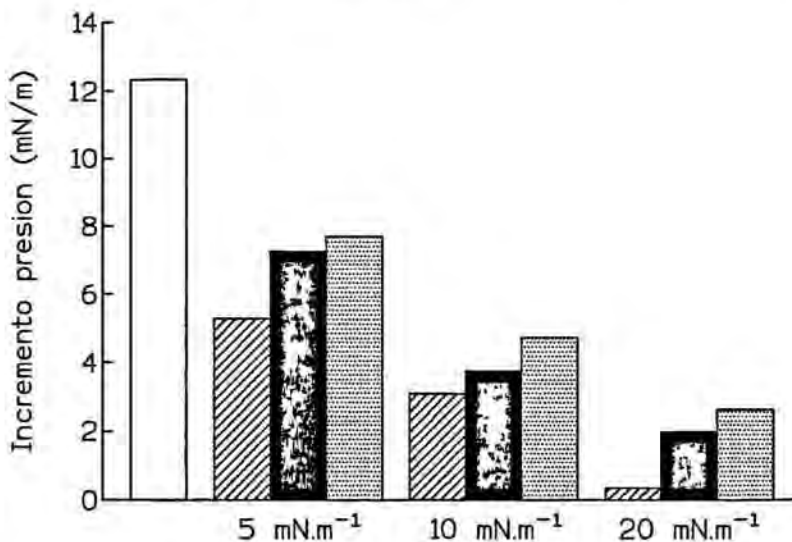


Figura 3.6 Comparación de los $\Delta\pi$ superficiales producidos por el péptido en las diferentes monocapas de fosfolípidos a las presiones iniciales de 5, 10 y 20 mN/m, cuando la concentración en la subfase era de 0.22 μ M. Los diagramas de barra representan : () actividad superficial de MAP₄VP3 (110-121); (///) monocapa de PI; (■) monocapa de DPPC y (...) monocapa de SA.

En el rango de presiones estudiado, se observa una dependencia lineal entre el incremento de presión y la presión inicial (π_i) de la monocapa, como se muestra en la figura 3.7, y la extrapolación de éstas rectas proporciona un valor estimado de la presión límite (π_L), es decir aquella presión máxima a la cuál MAP₄ VP3 no se insertaría en la monocapa lipídica. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 3.6, y oscilan entre 25 y 30 mN/m para los tres tipos de monocapas.

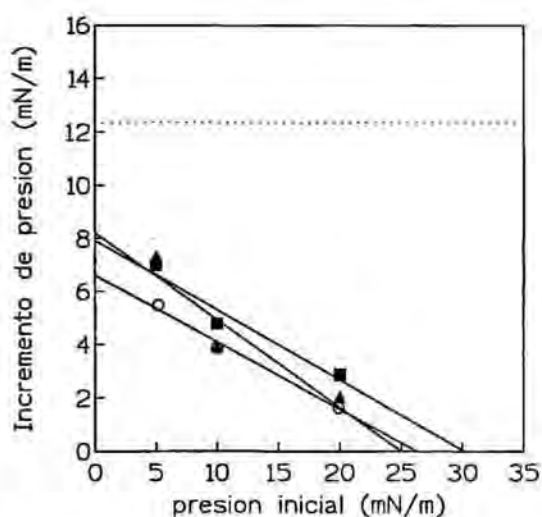


Figura 3.7 Incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por $\text{MAP}_4\text{VP3}$ en las diferentes monocapas de fosfolípidos a las presiones iniciales de 5, 10 y 20 mN/m, cuando la concentración de péptido en la subfase era de $0.22 \mu\text{M}$. Composición lipídica (▲) DPPC; (○) PI; (■) SA. La línea discontinua representa el máximo valor de presión superficial inducido por la adsorción del péptido a la interfase aire/agua en las mismas condiciones.

Tabla 3.6 Valores de la presión límite de $\text{MAP}_4\text{VP3}$ al insertarse en las diferentes monocapas lipídicas.

Composición de la Monocapa	Presión Límite π_L (mN/m)
DPPC	25.08
PI	26.25
SA	29.76

A partir de los resultados de la incorporación del $\text{MAP}_4\text{VP3}$ a los diferentes tipos de monocapas, observamos como la presión de límite para la monocapa de DPPC y PI son similares, al igual que para la inserción de una equinatoxina II en monocapas de PC y SM (esfingomielina) cuya presión límite es de 26 mN/m (Caaveiro, 2001).

La presión límite es ligeramente más elevada en monocapas de SA que en las de DPPC y PI. Esta diferencia está en consonancia con la mayor penetración de $\text{MAP}_4\text{VP3}$ en monocapa catiónicas (figura 3.6 y 3.7), y puede atribuirse a la atracción electrostática que se establece entre este péptido aniónico y las cargas positivas de la interfase. Sin embargo, y como ya se ha descrito anteriormente, la elevada presión límite (π_L) en las monocapas de PI indica la existencia de un importante componente hidrofóbico en la interacción, al igual que para las monocapas de DPPC.

3.3 ACTIVIDAD SUPERFICIAL DE $\text{MAP}_4\text{VP1}$ (11-25)

Los experimentos se llevaron a cabo en una cubeta de 70 ml de capacidad tal como se describe en el apartado de materiales y métodos 2.2.1.2. Para determinar la presión de saturación se inyectaron volúmenes crecientes de una solución concentrada del péptido $\text{MAP}_4\text{VP1}$ (11-25) en una subfase de PBS, registrándose los incrementos de presión

superficial durante un período de 60 minutos. En la figura 3.8 se observan los incrementos de presión a lo largo del tiempo para las diferentes concentraciones del péptido ensayado.

El MAP₄VP1 es una construcción péptidica de carácter anfipático, con una región polar formada por cuatro extremos aminoterminal compuestos en alta proporción por aminoácidos polares y una predominantemente apolar que es su extremo carboxamida con tres residuo de lisina (Lys). Así dicha estructura tenderá a orientarse en la interfase aire-agua con la zona polar en contacto con la subfase de manera que reducirá la tensión superficial y portanto, aumentará la presión, del mismo modo que sucede para la construcción péptidica MAP₄VP3.

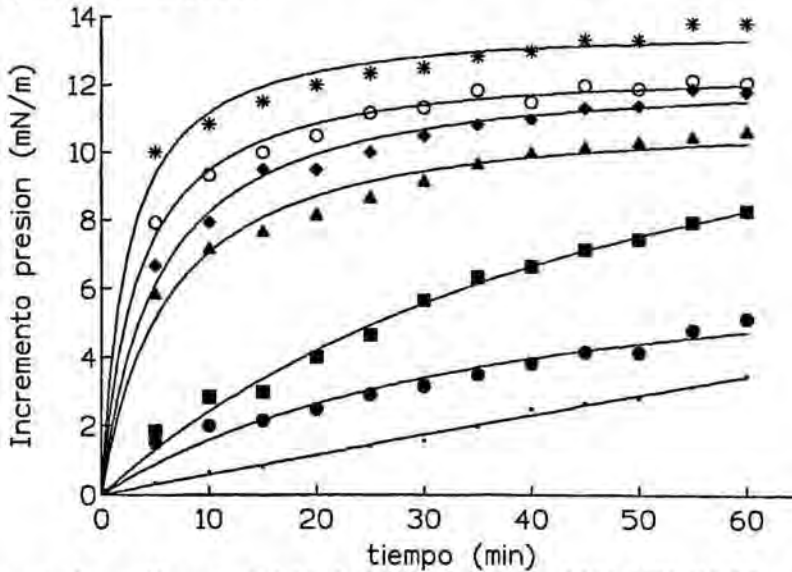


Figura 3.8 Incremento de presión superficial inducido por el péptido MAP₄VP1 (11-25), medido a diferentes concentraciones del mismo. (●) 0.028 μM, (●) 0.070 μM, (■) 0.14 μM, (▲) 0.21 μM, (◆) 0.28 μM, (○) 0.42 μM, (*) 0.84 μM Subfase PBS 50 mM.

El péptido se incorpora de modo gradual a la interfase cuando las concentraciones son menores a 0.14 μM. A concentraciones superiores a 0.21 μM las moléculas de péptido difunden rápidamente a la interfase, puesto que en los primeros diez minutos después de la inyección se alcanza prácticamente la máxima presión.

La cinética de adsorción del péptido a la interfase aire/agua depende de la concentración inicial de péptido inyectada en la subfase, de manera que la presión superficial aumenta más rápidamente a medida que la concentración es más alta. De los resultados se comprueba que a bajas concentraciones la presión superficial aumenta linealmente con el tiempo, en cambio cuando la concentración es elevada se observa una tendencia a la saturación en menos de 60 minutos.

En la figura 3.9 se representan los incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) alcanzados a los 60 minutos tras la inyección de MAP₄VP1 para las diferentes concentraciones estudiadas. La curva observada se ajusta a una hipérbola rectangular (ecuación 6, resultados y discusión).

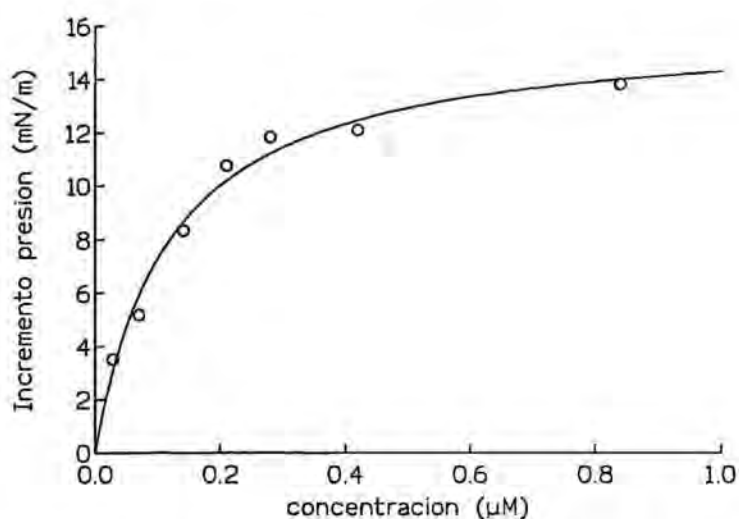


Figura 3.9 Incrementos de presión superficial a los 60 min inducido por MAP₄VP1 (11-25) medidos a diferentes concentraciones del mismo en la subfase de PBS 50 mM.

Al ajustar los datos experimentales que se muestran en la figura 3.9 a la ecuación 6 se obtienen los siguientes parámetros:

Tabla 3.7 Parámetros del tratamiento matemático de la curva de la figura 3.9 según la ecuación 6

$\Delta\pi_m = 17 \text{ mN/m}$	$K = 0.13 \text{ } \mu\text{M}$	$r^2 = 0.979$
---------------------------------	---------------------------------	---------------

Al aplicar a los valores obtenidos de los registros gráficos las ecuaciones descritas en esta sección (ecuación 7 y 8 de resultados y discusión), se calcula el exceso superficial de péptido en la interfase con respecto a la subfase y el área ocupada por molécula (tabla 3.8). El exceso superficial se ha calculado solo para las concentraciones de péptido en las que se alcanzaba el equilibrio.

Tabla 3.8 Valores de exceso superficial (Γ) y área por molécula para diferentes concentraciones iniciales de MAP₄VP1 (11-25) en la subfase.

Concentración (µM)	Γ (mol/m ²)	Area (nm ² /molec.)
0.21	$2.1 \cdot 10^{-7}$	7
0.28	$2.9 \cdot 10^{-7}$	6.9
0.42	$2.5 \cdot 10^{-7}$	6.5
0.85	$3.1 \cdot 10^{-7}$	5

3.4 CINÉTICAS DE PENETRACION DE MAP₄VP1 A AREA CONSTANTE EN MONOCAPAS DE UN COMPONENTE.

Con el fin de evaluar las interacciones entre el péptido MAP₄VP1 y las monocapas formadas por diferentes tipos de lípidos, neutros (DPPC, DPPE), aniónicos (tales como PI, DPPG y CI), y catiónico (SA) se realizan las cinéticas de penetración, midiendo el incremento de presión superficial ($\pi - \pi_0$) originado por el péptido al incorporarse a dichas monocapas. En la interacción nos interesa evaluar el factor electrostático y la influencia del empaquetamiento de los lípidos, así se consideran diferentes presiones iniciales 5, 10 y 20 mN/m. En dichos ensayos la concentración de péptido inyectada en la subfase de PBS es de 0.28 μ M, un valor inferior a la saturación de la interfase.

Monocapas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)

En primer lugar se determinó la cinética de penetración del péptido en monocapas zwitteriónicas, en este caso de DPPC. En la figura 3.10 se muestran los registros del incremento de presión superficial $\Delta\pi$ ($\pi - \pi_0$) en función del tiempo.

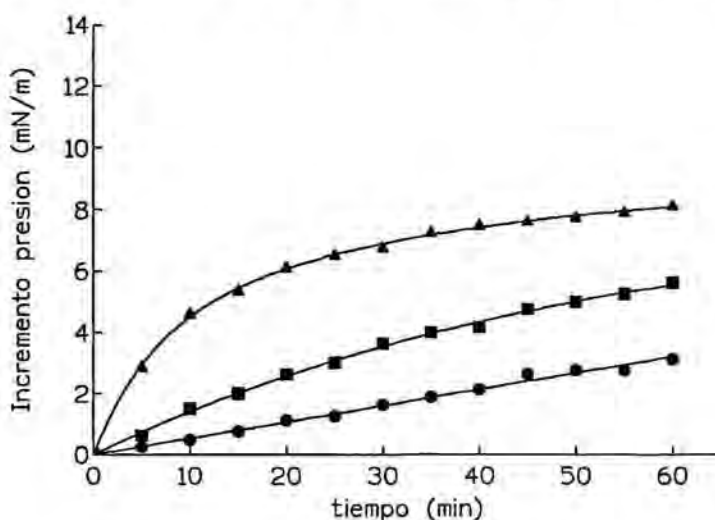


Figura 3.10 Incremento de presión superficial en monocapas de DPPC a las presiones iniciales 5(▲), 10(■) y 20(●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μ M.

La incorporación del péptido es rápida para la presión de 5 mN/m puesto que en los primeros 17 minutos el proceso de incorporación del péptido alcanza el 90% del total de la presión. A la presión de 10 mN/m el péptido va incorporándose de modo más lento, no complementándose el proceso a los 60 minutos de la inyección.

El proceso de inserción se analiza por regresión no lineal según la ecuación 9 de esta sección. El tratamiento matemático de las curvas para las presiones de 5 y 10 mN/m siguen el modelo propuesto de inserción, consistente en dos procesos cinéticos de primer orden. Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 3.9. A la presión de 20 mN/m al ser la densidad de empaquetamiento de la monocapa mayor la inserción del péptido es más difícil y por tanto el MAP₄ VP1 se incorpora de forma lenta a la interfase, no ajustándose al modelo propuesto.

Tabla 3.9 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (110-121) en monocapas de DPPC a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	1.9(53%)	17.5(47%)	0.998
10	31.65(66%)	80(33.7%)	0.998

En la tabla 3.9 observamos como el péptido se inserta en la interfase con dos procesos de primer orden, uno de rápido que para la presión de 5 mN/m tiene un $t_{1/2} < 5$ minutos y para la presión de 10 mN/m su $t_{1/2}$ es inferior a 32 minutos. En esta dos presiones consideradas el otro proceso cinético es lento y contribuye algo menos al incremento total de la presión, entre un 30 % a π de 10 mN/m y casi un 50 % a π de 5 mN/m.

Monocapas de dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE)

La cinética de penetración del MAP₄VP1 en monocapas formadas por un fosfolípido neutro como DPPE, se muestran en la figura 3.11.

Las curvas resultantes se ajustaron a un modelo cinético correspondiente a dos procesos de penetración de primer orden, cuyos parámetros cinéticos se muestran en la tabla 3.10. Para la presión de 5 mN/m, los resultados son consistentes con la existencia de un proceso rápido con una $t_{1/2} < 5$ minutos y minoritario, y uno lento mayoritario con $t_{1/2} = 21$ minutos, al cuál le corresponde un 70 % del incremento total de la presión. A la presión de 10 mN/m el proceso de penetración no sigue el proceso cinético propuesto. A esta presión superficial el péptido se incorpora gradualmente a la interfase y la incorporación no se llega a completar en 60 minutos. Al considerar un empaquetamiento superior, como es el caso de 20 mN/m, el péptido se incorpora siguiendo un único proceso de primer orden con un $t_{1/2} = 29$ minutos.

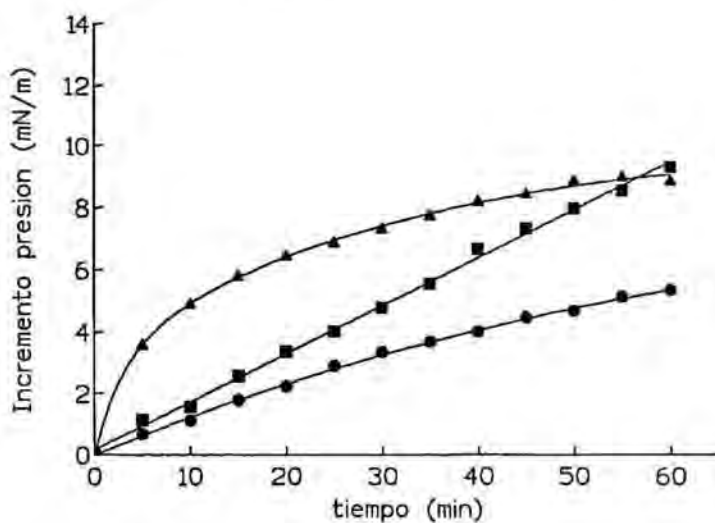


Figura 3.11 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPE a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μ M

Los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de DPPE a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	1.97(30%)	21.26(70%)	0.997
10	-	-	-
20	-	28.8(100%)	0.992

Monocapas de Cardiolipina (CL)

En la figura 3.12 se muestran las cinéticas de penetración del MAP₄ VP1 en una monocapa de un fosfolípido con dos cargas negativas, como es CL (difosfatidilglicerol). A las presiones de 5 y 10 mN/m se alcanzan los máximos incrementos de presión superficial a los 20 minutos de la inyección del péptido en la subfase. En cambio cuando el empaquetamiento de la monocapa es mayor el péptido requiere de un tiempo de inducción alrededor de 30 minutos a partir de la cuál empieza a incorporarse gradualmente a la interfase lipídica.

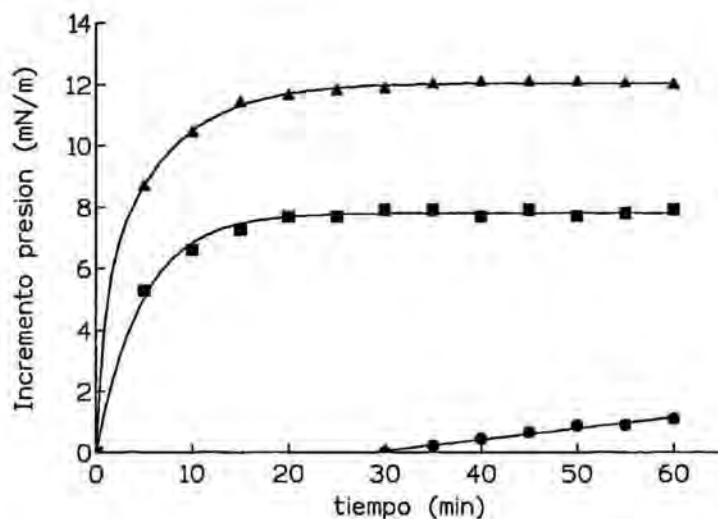


Figura 3.12 Incrementos de presión superficial en monocapas de CL a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μ M.

Al tratar matemáticamente los registros gráficos anteriores y al ajustarlos al modelo cinético propuesto según la ecuación 9, se obtienen los parámetros de la tabla 3.11. A la presión de 5 mN/m, la incorporación sigue dos procesos de primer orden con tiempos de semivida muy cortos. Ahora bien, para la presión de 10 mN/m sigue una cinética de primer orden, cuya $t_{1/2}$ es inferior a 5 minutos.

Tabla 3.11 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de CL a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	0.6(44%)	4.57(64%)	0.999
10	3.36(100%)	-	0.996

Monocapas de fosfatidilinositol (PI)

La inserción de MAP₄VP1 en una capa monomolecular aniónica de PI se muestra en la figura 3.13, y en el gráfico se representan los incrementos de presión superficial respecto al tiempo, para las diferentes presiones iniciales ensayadas. Los $\Delta\pi$ al incorporarse el péptido son pequeños tanto a 5 como a 10 mN/m. Sin embargo, a la presión de 20 mN/m no se observó inserción del péptido a la interfase lipídica. La incorporación del péptido a la monocapa negativa es rápida para las presiones 5 y 10 mN/m, puesto que los máximos de presión superficial se alcanzan en los primeros 5 minutos.

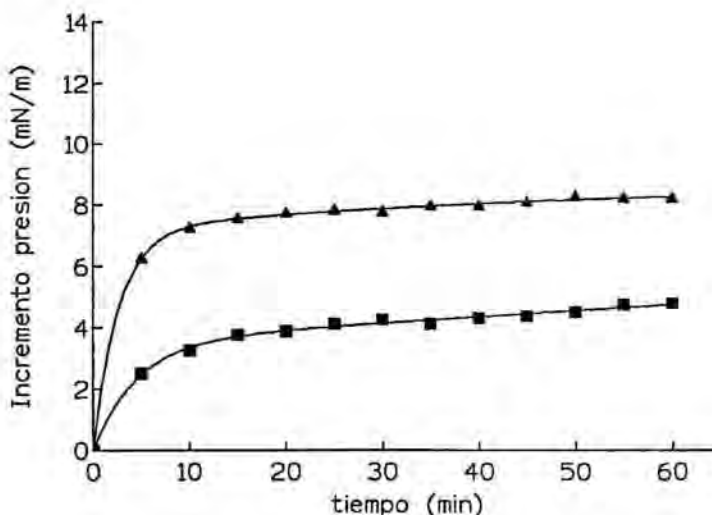


Figura 3.13 Incrementos de presión superficial en monocapas de PI a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28μM.

El tratamiento matemático de los resultados cinéticos al ajustarlos al modelo cinético de la ecuación 9 proporcionan los parámetros que se muestran en la tabla 3.12. A la presión de 5 mN/m la cinética de incorporación del péptido a la monocapa negativa sigue dos procesos de primer orden uno rápido, con $t_{1/2}$ inferior a 5 minutos, al que le corresponde un 82% del incremento de la presión total. El otro proceso es lento y minoritario, con una $t_{1/2} = 32$ minutos. A la presión de 10 mN/m, MAP₄ VP1 se incorpora muy rápidamente, en un proceso de primer orden con $t_{1/2}$ de 5 minutos.

Tabla 3.12 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de PI a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k₁ y k₂ son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₁ (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₂ (B)	r ²
5	1.82(82%)	32.12(18%)	0.999
10	5.12(100)	-	0.972

Monocapas de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG)

En la figura 3.14 se muestran los registros de $\Delta\pi$ en función del tiempo para una monocapa de DPPG al incorporarse MAP₄VP1 inyectado a la subfase. A la presión inicial de 5 mN/m los máximos incrementos de presión superficial se alcanzan en los 20 primeros minutos, mientras que la incorporación del MAP₄VP1 en monocapas extendidas a 10 y 20 mN/m fue más gradual.

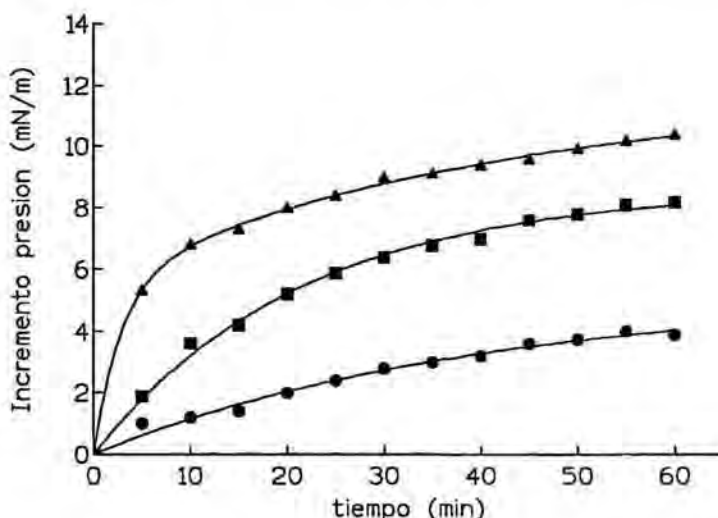


Figura 3.14 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPG a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μM.

La curva obtenida a la presión inicial de 5 mN/m sigue el modelo propuesto de inserción del péptido según dos procesos cinéticos de primer orden (ecuación 9). La penetración consta de un proceso rápido con $t_{1/2} < 5$ minutos, al cuál corresponde un 43% del incremento total de π , y uno más lento, con $t_{1/2} = 20$ minutos que origina un 57% del incremento total de presión. A las presiones iniciales de 10 y 20 mN/m, la incorporación del péptido sigue una cinética de primer orden con un único proceso de inserción con $t_{1/2} = 17$ minutos y 30 minutos, respectivamente. Todos los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la tabla 3.13.

Tabla 3.13 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de DPPG a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total)

correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)= $0.69/k_1$ (A)	$t_{1/2}$ (min)= $0.69/k_2$ (B)	r^2
5	1.1(43%)	19.2(57%)	0.997
10	-	17(100%)	0.997
20	-	27.5(100%)	0.991

Monocapas de estearilamina (SA)

Las cinéticas de incorporación de MAP₄ VP1 a una capa monomolecular constituida por SA, extendido a diferentes presiones iniciales se muestran en la figura 3.15.

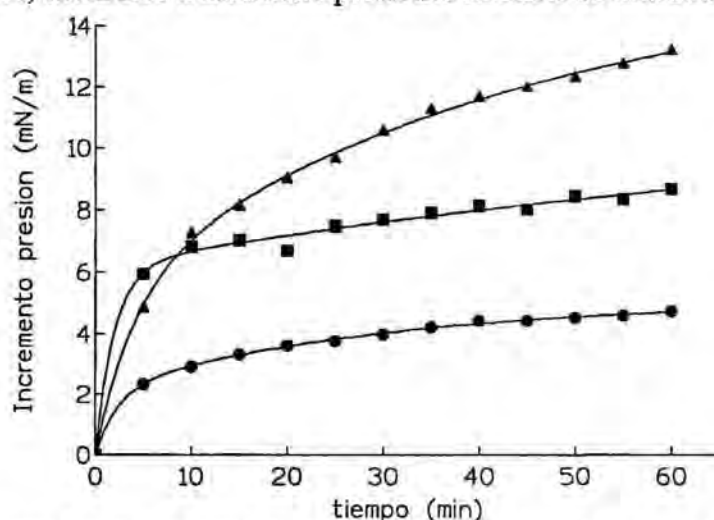


Figura 3.15 Incrementos de presión superficial en monocapas de SA a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μM.

Las curvas se ajustaron al modelo cinético correspondiente a dos procesos de penetración de primer orden, independientemente de la presión superficial inicial. En la tabla 3.14 se muestran los parámetros cinéticos, los cuáles indican la existencia de un proceso rápido, con $t_{1/2} < 5$ minutos y al que corresponde un incremento de presión entre 30 -60 % del total, y un proceso lento cuya $t_{1/2}$ se sitúa ente 20-60 minutos.

Tabla 3.14 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de SA a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)= $0.69/k_1$ (A)	$t_{1/2}$ (min)= $0.69/k_2$ (B)	r^2
5	2.7(34%)	31.1(66%)	0.999
10	1.35(55%)	62.6(45%)	0.994
20	1.6(41%)	20.3(59%)	0.999

Incorporación de MAP₄ VP1 en monocapas de un componente : conclusiones

Se han realizado cinéticas de penetración de MAP₄ VP1 en monocapas formadas por un único componente y extendidas a diferentes presiones superficiales: 5, 10 y 20 mN/m. Las monocapas presentaban carga positiva (SA), negativa (PI, DPPG, CL) o neutra (DPPC, DPPE), con el fin de evaluar el componente electrostático de la interacción lípido/péptido. Los resultados muestran que MAP₄ VP1 se incorpora en todas las monocapas estudiadas, incluso en las de carácter aniónico. Esta observación dada la carga negativa de MAP₄ VP1 a pH= 7,4 indica que el péptido presenta gran afinidad por la interfase lipídica, y que la interacción tiene un importante componente hidrofóbico. Al representar los incrementos de presión obtenidos a los 60 minutos de la inyección del péptido en la subfase (figura 3.16), se observa que a 5 mN/m de presión inicial la penetración sigue el siguiente orden SA > CL > DPPG > DPPE > PI > DPPC, es decir que existe un ligero efecto electrostático, con mayor incorporación en la interfase catiónica. A la presión inicial de 20 mN/m también se observa una mayor incorporación en las monocapas de SA, sin embargo los resultados son más consistentes con una interacción de carácter hidrofóbico que se puede atribuir al carácter anfipático de MAP₄ VP1, como se deduce también de la elevada actividad superficial de esta construcción peptídica. Resultados similares han sido descrito para la incorporación de la proteína D del surfactante pulmonar a diferentes monocapas (Taneva,1997a).

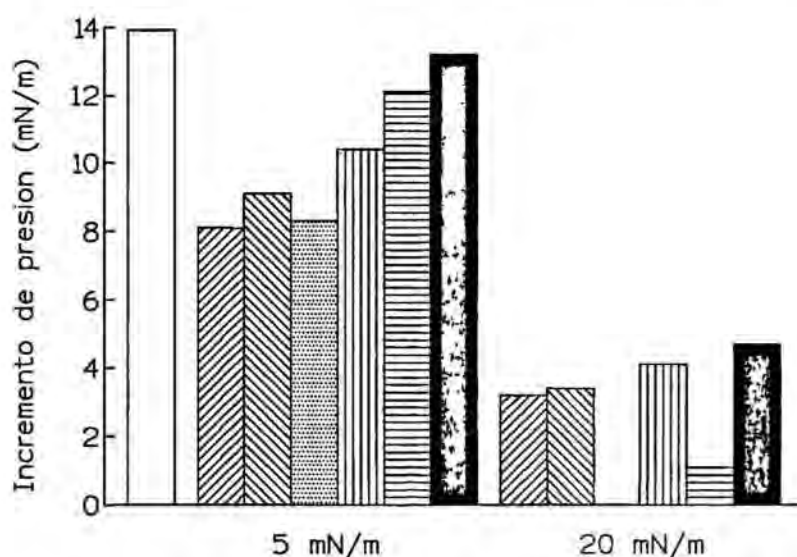


Figura 3.16 Comparación de los incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por MAP₄VP1 en las diferentes monocapas de fosfolípidos transcurridos los 60 minutos tras la inyección a las presiones iniciales de 5 y 20 mN/m, cuando la concentración de péptido en la subfase era de 0.28 μ M.. Los diagramas de barra representan : () actividad superficial del MAP₄VP1 (11-25); (///) DPPC; (\\) DPPE, (...) PI, (III) DPPG, (=) CL y (■) SA.

En general, el proceso de inserción de MAP₄ VP1 en las diferentes monocapas se pudo ajustar a un modelo cinético consistente con dos procesos de primer orden: un proceso muy rápido, de semivida inferior a 5 minutos, y un proceso de inserción lenta y gradual con el tiempo, de $t_{1/2}$ muy variable según la composición de la monocapa y la presión inicial, sin que se pueda atribuir un comportamiento específico en función de la carga de la monocapa. En algunos casos, a presiones superiores a 5 mN/m, la inserción se produjo siguiendo un proceso único de primer orden.

Los valores de presión límite o de exclusión para la inserción de MAP₄ VPI a los diferentes tipos de monocapas se estimaron a partir de las gráficas de incrementos de presión superficial respecto a la presión inicial extrapolando a cero el incremento de presión, como se muestra en la figura 3.17 y se resumen en la tabla 3.15. Se observa que la presión límite, por encima de las cuales no se producía inserción del péptido en las monocapas, son más elevadas para monocapas de fosfolípidos con ácidos grasos saturados, sean neutras o aniónicas, así como para la monocapa del ácido graso saturado (SA), mientras que para las monocapas de PI y CL, fosfolípidos aniónicos con cadenas acílicas insaturadas, se obtienen valores más bajos de presión límite.

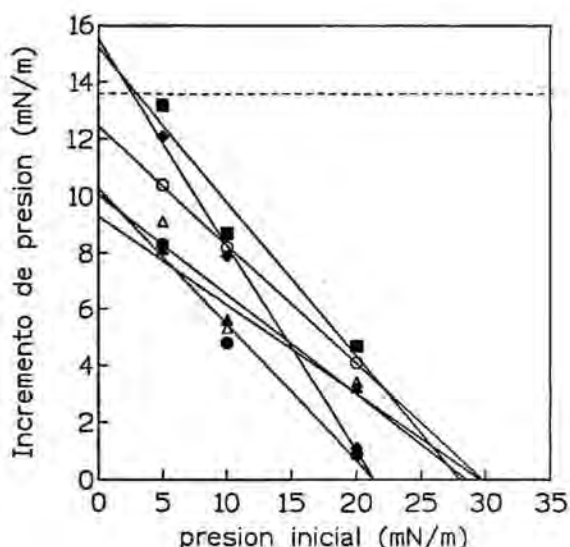


Figura 3.17 Incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por MAP₄VPI en las diferentes monocapas de fosfolípidos a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m transcurridos 60 minutos de la inyección. Concentración de péptido en la subfase 0.28 μ M. (▲) DPPC; (△) DPPE, (●) PI; (○) DPPG, (◆) CL y (■) SA. La línea discontinua representa el máximo valor de presión superficial inducido por la adsorción del péptido a la interfase aire/agua en las mismas condiciones.

Tabla 3.15 Valores de la presión de exclusión de MAP₄VPI al insertarse en las diferentes monocapas lipídicas.

Composición de la Monocapa	Presión Límite π_L (mN/m)
DPPC	29.6
DPPE	28.5
DPPG	29.7
PI	21.3
CL	21.3
SA	28

Por otra parte se desprende de los resultados que el péptido se incorpora a todas las monocapas pero es para las monocapas de SA y de CL cuando la inserción es específica ya que cortan la línea de la actividad superficial del péptido.

3.5 CINÉTICAS DE PENETRACION A AREA CONSTANTE DE MAP₄VP1 EN MONOCAPAS DE DOS COMPONENTES.

De igual modo que en el anterior apartado se llevaron a cabo las cinéticas de penetración a área constante de MAP₄VP1 al extender sobre una subfase de PBS pH 7.4 las siguientes mezclas de fosfolípidos: DPPC-PI (9:1), DPPC-SA (9:1), DPPC-DPPG (9:1), DPPC-CL (9:1), DPPC-DPPE (9:1).

Monocapas de DPPC-PI (9:1)

En la figura 3.18 se muestran los registros gráficos del $\Delta\pi$ respecto al tiempo para la penetración de MAP₄VP1 en una monocapa de DPPC-PI (9:1).

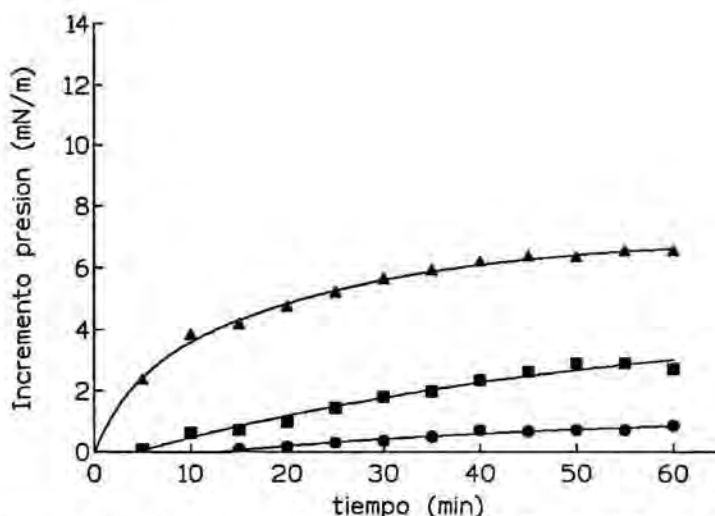


Figura 3.18 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPC-PI(9:1) a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μ M.

El tratamiento matemático de los resultados según la ecuación 9 indica que la incorporación del péptido a la monocapa aniónica a la presión de 5 mN/m sigue dos procesos cinéticos de primer orden: uno rápido y minoritario, que se completa en menos de 5 minutos, y uno más lento con $t_{1/2} < 17$ minutos, al cuál le corresponde un 72 % del incremento del total de la π . A las presiones superficiales de 10 mN/m y 20 mN/m, la incorporación del péptido a la interfase se ajusta a un proceso único de primer orden, con tiempos de semivida de 35 y 27 minutos, respectivamente. En la tabla 3.16 se citan los parámetros matemáticos obtenidos.

Tabla 3.16 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de DPPC-PI (9:1) a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	2.43(27%)	16(72%)	0.997
10	-	35(100%)	0.976
20	-	26.5(100%)	0.960

Monocapas de DPPC-PG (9:1)

Los gráficos de $\Delta\pi$ respecto al tiempo resultantes de la inserción de MAP₄ VP1 a la monocapa de carga neta negativa de DPPC-DPPG (9:1) se muestran en la figura 3.19. La incorporación del péptido a dicha monocapa a las presiones de 5 y 10 mN/m sigue el modelo cinético propuesto en la ecuación 9, mientras que a la presión inicial de 20 mN/m la inserción sigue un proceso cinético único de primer orden.

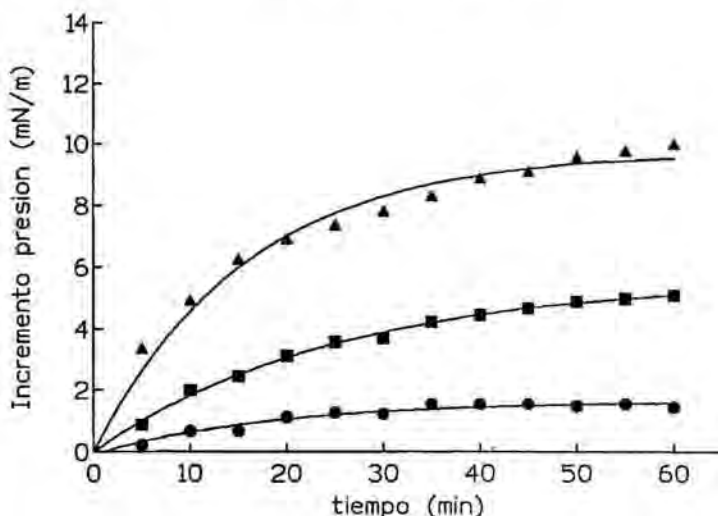


Figura 3.19 Incrementos de presión superficial en monocapa de DPPC-DPPG (9:1) a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28μM.

Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 3.17.

Tabla 3.17 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de DPPC-DPPG (9:1) a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k₁ y k₂ son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₁ (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/k ₂ (B)	R ²
5	2(19%)	17.7(81%)	0.997
10	9(21%)	23.2(79%)	0.997
20	-	13.2(100%)	0.960

A las presiones superficiales de 5 y 10 mN/m la inserción del péptido tiene lugar en dos procesos de primer orden, con tiempos de semivida de menos de 10 minutos para el proceso rápido que producen el 20 % de inserción y alrededor de 20 minutos para el resto. La incorporación del péptido a 20 mN/m es más lenta dado el mayor empaquetamiento de la monocapa, siguiendo una cinética de primer orden con $t_{1/2} < 14$ minutos y no tiene el proceso de inserción rápida.

Monocapas de DPPC-DPPE(9:1)

El gráfico de la figura 3.20 se representa el $\Delta\pi$ respecto al tiempo producido por MAP₄VP1 al insertarse a la monocapa neutra de DPPC-DPPE (9:1) extendida a diferentes presiones.

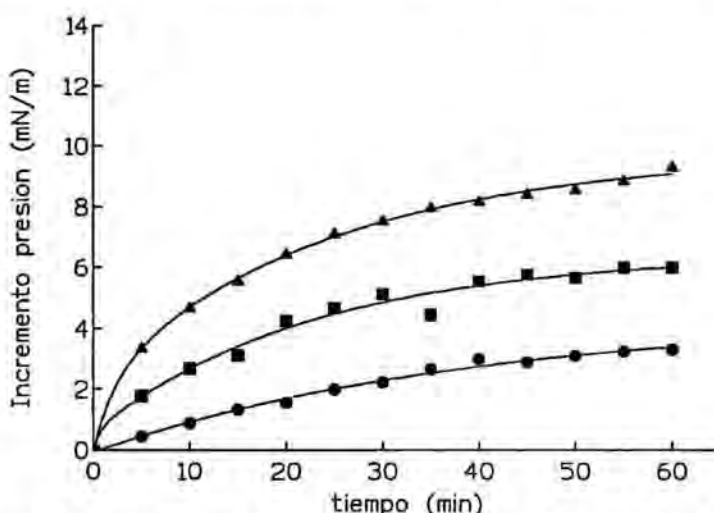


Figura 3.20 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPC-DPPE (9:1) a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28 μ M.

Las cinéticas de penetración a la presión de 5 y 10 mN/m siguen el modelo cinético propuesto en la ecuación 9 para la inserción del péptido a la interfase pero no a 20 mN/m, puesto que la incorporación es gradual es decir la cinética sigue un único proceso de primer orden.

Tabla 3.18 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1 (11-25) en monocapas de DPPC-DPPE (9:1) a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	1.54(22%)	16.9(78%)	0.999
10	0.44(10%)	15.9(90%)	0.980
20	-	27(100%)	0.992

La inserción del péptido a la presión inicial de 5 y 10 mN/m tiene lugar en dos procesos cinéticos de primer orden: uno muy rápido y minoritario con $t_{1/2} < 5$ minutos, y otro lento mayoritario con $t_{1/2} < 20$ minutos, el cual corresponde a un 78%-90% del incremento total de la presión. A 20 mN/m la cinética de penetración del péptido sigue un proceso de primer orden lento con una $t_{1/2} < 30$ minutos.

Monocapas de DPPC-CL (9:1)

Los registros gráficos del $\Delta\pi$ en función del tiempo de la penetración de MAP₄VP1 en monocapa mixta de DPPC-CL se muestran en la figura 3.21. A la presión de inicial de 5 y 10 mN/m siguen el modelo cinético propuesto (ecuación 9), consistente en dos procesos cinéticos de primer orden. A 20 mN/m la densidad de empaquetamiento es mayor y el

MAP₄ VP1 requiere de un tiempo de inducción de 15 minutos para incorporarse a la interfase.

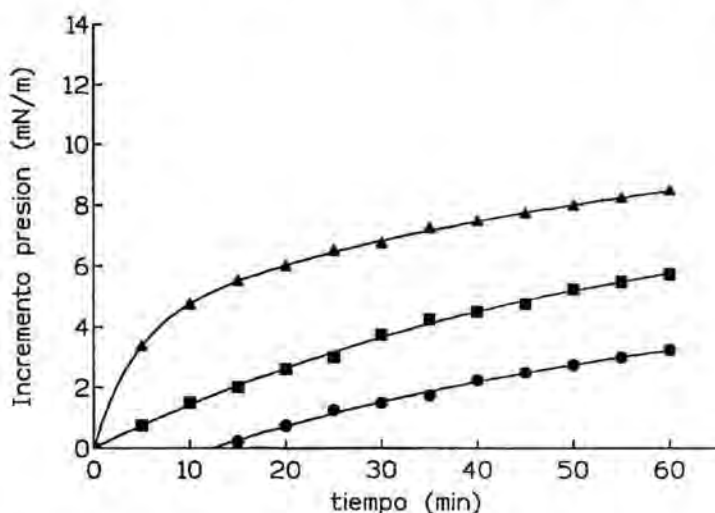


Figura 3.21 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPC-CL (9:1) a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.28μM.

Los parámetros cinéticos se muestran en la tabla 3.19. A la presión de 5 y 10 mN/m, la incorporación del péptido a la interfase tiene lugar con dos procesos de inserción de primer orden. Un proceso rápido, con $t_{1/2}$ inferior a 5 minutos y 12 minutos para 5 y 10 mN/m, respectivamente. Mientras el proceso lento y con mayor contribución en el proceso total de inserción tiene un $t_{1/2}$ inferior a 35 minutos para las dos presiones, al cuál le corresponde un 60-90 % del incremento total de presión. A 20 mN/m de presión se incorpora siguiendo una cinética de primer orden lenta, con $t_{1/2}$ inferior a 40 minutos.

Tabla 3.19 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP3 (11-25) en monocapas de DPPC-CL (9:1) a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	2.9(37%)	37.6(63%)	1.000
10	11.35(9%)	30.69(91%)	0.998
20	-	38.58(100%)	0.996

Monocapas de DPPC-SA (9:1)

La cinética de penetración de MAP₄ VP1 en monocapas mixtas DPPC-SA (9:1) extendidas a diferentes presiones superficiales iniciales se muestran en la figura 3.22.

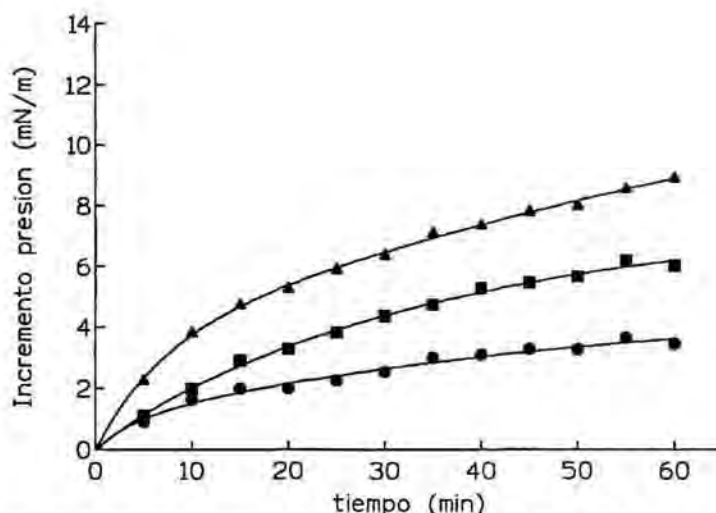


Figura 3.22 Incrementos de presión superficial en monocapas de DPPC-SA (9:1) a las presiones iniciales 5(▲),10 (■) y 20 (●) mN/m. Concentración de MAP₄ VP1 en la subfase 0.22 μM.

Las curvas resultantes se ajustaron al modelo cinético propuesto en la ecuación 9. A 5 mN/m los parámetros cinéticos se corresponden con dos procesos de penetración de primer orden: un proceso rápido, con $t_{1/2}$ inferior a 5 minutos al que corresponde 33% del incremento total de presión, y un proceso lento con $t_{1/2}$ elevado. Sin embargo, para las presiones iniciales 10 y 20 mN/m la incorporación del péptido sigue una única cinética de primer orden, con $t_{1/2}$ alrededor de 30 minutos.

Tabla 3.20 Parámetros cinéticos de la penetración del MAP₄VP1(11-25) en monocapas de DPPC-SA (9:1) a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m. A y B representan los incrementos de presión superficial (% del total) correspondientes a cada proceso de inserción, k_1 y k_2 son las constantes específicas de velocidad de cada proceso.

π_0 (mN/m)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_1 (A)	$t_{1/2}$ (min)=0.69/ k_2 (B)	r^2
5	4.6(33%)	73.7(77%)	0.999
10	-	25(100%)	0.997
20	-	34(100%)	0.987

Incorporación de MAP₄ VP1 en monocapas de dos componentes: consideraciones finales

Al considerar las anteriores cinéticas de penetración deducimos que el MAP₄VP1(11-25) tiene afinidad por cualquiera de las películas lipídicas de dos componentes ensayadas. Los resultados se analizarán en función de la presión inicial de la monocapa y después a escala molecular teniendo en cuenta que según las características del fosfolípido (cabeza polar y cadenas alquílicas) variará bastante el empaquetamiento de la monocapa y por tanto, la inserción del péptido a la misma.

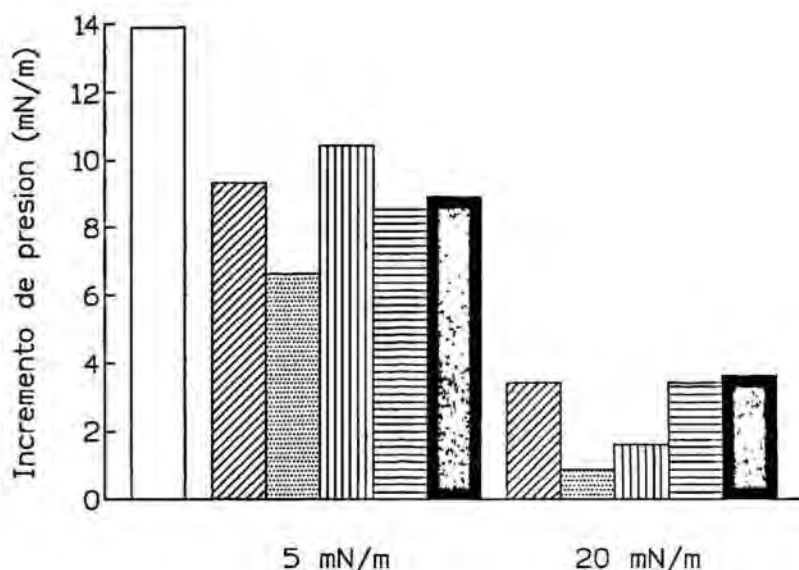


Figura 3.23 Comparación de los incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por MAP₄VP1 en las diferentes monocapas de fosfolípidos a las presiones iniciales de 5 y 20 mN/m, cuando la concentración en la subfase era de 0.28 μ M. Los diagramas de barra representan : () actividad superficial de péptido; (//) DPPC-DPPE (9:1), (...) DPPC-PI(9:1), (III) DPPC-DPPG (9:1), (=) DPPC-CL (9:1) y (■) DPPC-SA (9:1).

A 5 mN/m de presión superficial no se observa ninguna relación entre $\Delta\pi$ superficial y carga de la monocapa, por tanto influirán otros factores. Posiblemente sea el tamaño del grupo polar $PG < PE < SA < CL < PI$. El incremento de presión superficial ($\Delta\pi$) decrece de manera similar DPPC-DPPG (9:1) > DPPC-DPPE (9:1) > DPPC-SA (9:1). Estas tres monocapas son las que experimentan mayor $\Delta\pi$ (ver figura 3.23), todas ellas tienen en común que están constituidas por cadenas alquílicas saturadas y sus grupos polares son poco voluminosos, observaciones similares se han visto en proteínas pequeñas como la defensin A (Maget-Dana, 1997). En cambio cuando la presión inicial es 20 mN/m la estirilamina da un incremento de presión mayor y las mezclas negativas (PI y DPPG) tienen un comportamiento similar. Estos resultados son consistentes con una interacción de carácter hidrofóbico, dado el carácter anfipático del MAP₄VP1.

La figura 3.23 muestra que la variación de la presión superficial disminuye a medida que la presión inicial de los diferentes tipos de monocapa es más grande. A la presión inicial de 5 mN/m el MAP₄VP1 se inserta en las monocapas fácilmente, pero a medida que la presión superficial inicial aumenta (10 y 20 mN/m) la incorporación del péptido en la monocapa resulta más difícil, comportamiento iguales se describen para la glucosa oxidasa (Rosilio, 1997), otras proteínas (Koppenol, 1998), y péptidos (Seeling, 1989). En general la incorporación de la estructura peptídica a cada monocapa sigue un modelo cinético que consta de dos procesos de primer orden: uno rápido con $t_{1/2}$ inferior a 5 minutos y otro proceso lento con $t_{1/2} < 20$ minutos. En algunas composiciones y a mayor empaquetamiento de la monocapa (a presiones iniciales superiores a >5 mN/m) la inserción se desarrolla siguiendo un único proceso cinético de primer orden.

A partir de las gráficas de los incrementos de presión superficial respecto a la presión inicial y extrapolando a 0 el incremento de presión, $\Delta\pi$, se estiman los valores de presión límite. Todos estos valores se resumen en la figura 3.24.

4. ISOTERMAS DE COMPRESION

4.1 ISOTERMA DE COMPRESION DEL PEPTIDO MAP₄VP3 (110-121)

El MAP₄VP3 forma monocapas estables en la interfase aire-agua como se aprecia en la figura 4.1. La presión de colapso para esta película peptídica es de 42 mN/m. La presión de colapso de una monocapa es una medida de estabilidad y a la vez, es la máxima presión lateral que puede soportar una película antes de romperse o disolverse. Por tanto, al tener éste péptido mayor presión de colapso que MAP₄VP1, diremos que forma monocapas más estables. Además, dado el valor máximo de presión superficial que alcanza se correspondería a una estructura en lámina β , según diversos autores valores de presión de colapso superiores a 35 mN/m son característicos de proteínas ricas en estructuras β (Maget-Dana, 1999a). MAP₄VP3 es un péptido anfipático de 4 cadenas lineales con 12 aminoácidos cada una, unidas en un núcleo arborescente de Lisinas y adopta una conformación en lámina β , según estudios conformacionales de dicroísmo circular (Gómara, 2000).

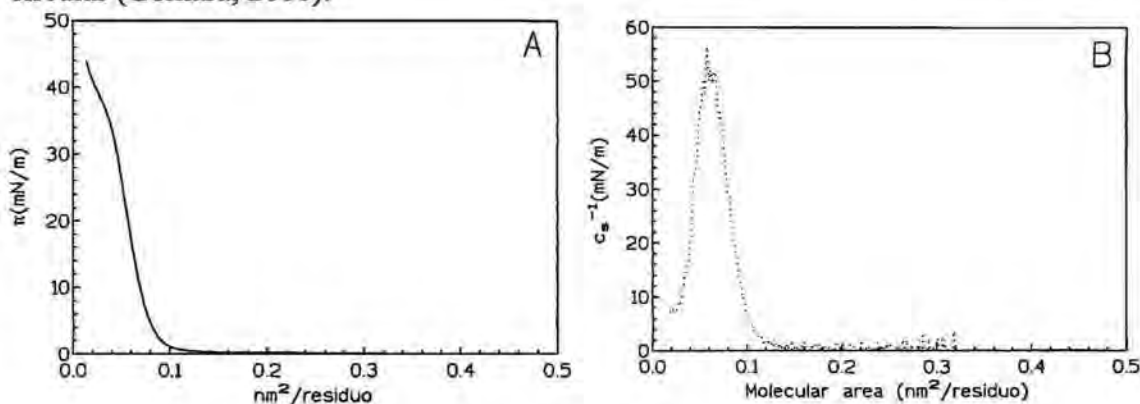


Figura 4.1 Isoterma de Compresión de MAP₄VP3 extendida sobre una subfase de PBS a pH 7.4 a temperatura ambiente. Módulo de Compresibilidad vs. área molecular por residuo.

A partir de la gráfica del módulo de compresibilidad observamos como las moléculas del péptido pasan de gas a líquido expandido y a la presión superficial de 39 mN/m éstas moléculas pasan a un estado más condensado.

Los valores de las diferentes áreas por residuo peptídico para el MAP₄VP3 se muestran en la tabla 4.1 El área lift-off se corresponde con el área de la isoterma cuando ésta pasa de gas a líquido expandido (LE) y por tanto, será el área justo en el punto dónde empieza la fase LE. Por otro lado, el área extrapolada o también llamada área límite es el área de máxima compresión, y se calcula como la tangente en la zona de máxima compresión de la isoterma extrapolada a $\pi=0$. Finalmente, el otro área considerada es el área justo en el punto de colapso del péptido.

Tabla 4.1 Valores del área-residuo obtenidos a partir de las isotermas del péptido.

Área lift-off	Área extrapolada	Área colapso	π_c
0.18 nm ²	0.12 nm ²	0.015 nm ²	43.1 mN/m

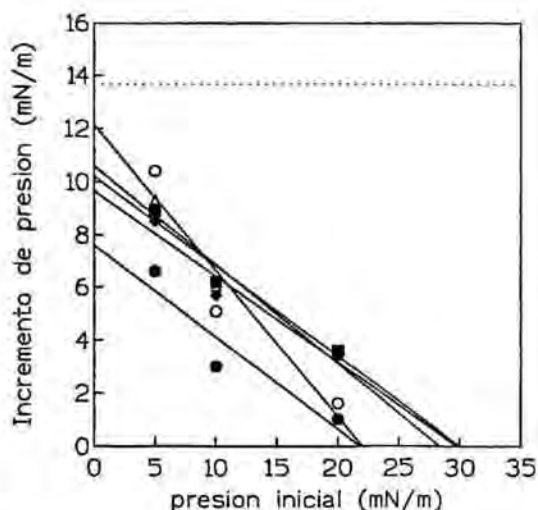


Figura 3.24 Incrementos de presión superficial ($\Delta\pi$) producidos por el péptido en las diferentes monocapas de fosfolípidos a las presiones iniciales de 5,10 y 20 mN/m transcurridos 60 minutos de la inyección. Concentración de péptido en la subfase 0.28 μM . Composición lipídica (Δ) DPPC-DPPE (9:1), (\bullet) DPPC-PI (9:1), (\circ) DPPC-DPPG (9:1), (\blacktriangle) DPPC-CL (9:1) y (\blacksquare) DPPC-SA (9:1). La línea discontinua representa el máximo valor de presión superficial inducido por la adsorción del péptido a la interfase aire/agua en las mismas condiciones.

Cuando la monocapa incorpora un 10 % de PG o PI, el valor de la presión límite es igual a 22 mN/m es decir, a dicha presión superficial el $\text{MAP}_4\text{VP1}$ no se incorporará a la misma. En cambio, para el resto de monocapas la presión límite se encuentra entre los valores 28-30 mN/m.

Tabla 3.21 Valores de la presión de exclusión de $\text{MAP}_4\text{VP1}$ al insertarse en las diferentes monocapas lipídicas.

Composición de la Monocapa	Presión Límite π_L (mN/m)
DPPC-DPPE (9:1)	28.5
DPPC-DPPG (9:1)	21.9
DPPC-PI (9:1)	21.8
DPPC-CL (9:1)	29.7
DPPC-SA (9:1)	30

En general, al estudiar el incremento de presión superficial ($\Delta\pi$) en las cinéticas de penetración a área constante de las mezclas de fosfolípidos, se observa un menor $\Delta\pi$ superficial, comparándolo con el mismo valor para los fosfolípidos de las monocapas de un solo componente. A excepción de las mezclas DPPC-DPPE (9:1) y DPPC-CL (9:1). Aparentemente, las monocapas de mezclas de dos componentes están más condensadas que la de los componentes únicos, y por tanto el péptido tiene más dificultades para incorporarse a la interfase (ver figura 3.23).

A 10 y 20 mN/m el $\Delta\pi$ superficial fue mayor para la mezcla de carga positiva, los neutros (DPPC y DPPE) y después los de carga negativos, como se aprecia en la figura 3.24. La presencia de la DPPC en un porcentaje del 90% regula las interacciones electrostáticas, mientras que para los fosfolípidos negativos se evidencia un efecto repulsivo con el $\text{MAP}_4\text{VP1}$.

Los valores de las áreas que se muestran en la tabla 4.1 son todos ellos excesivamente bajos para un péptido con tantos aminoácidos. Esto se podría explicar por un proceso de solubilización del péptido. Sin embargo, al realizar ciclos de compresión-expansión (no se muestran) de dicho péptido no se observó histéresis, lo que permite descartar la posibilidad de pérdidas de moléculas de la monocapa hacia la subfase.

4.2 MISCIBILIDAD DE MAP₄VP3 CON LÍPIDOS EN MONOCAPAS MIXTAS

El estudio de la miscibilidad del péptido MAP₄VP3 (110-121) con DPPC, DPPC-PI (9:1) y DPPC-SA (9:1) se realiza mediante monocapas mixtas extendidas sobre una interfase aire-agua, a temperatura ambiente. Al realizar las isotermas de compresión se obtienen los registros de presión superficial respecto al área molecular para las diferentes fracciones molares de lípido ($X_{\text{lípido}}$ 0 a 1). A partir de dichos registros se obtienen también los módulos de compresibilidad para las diferentes áreas por residuo. Además, para todos ellos se calculan los parámetros termodinámicos que definen su miscibilidad.

4.4.1 Miscibilidad de MAP₄VP3 con DPPC

La gráfica de presión superficial respecto a área por residuo peptídico obtenida a partir de las isotermas de compresión a diferentes fracciones molares de DPPC y MAP₄VP3 se muestran en la figura 4.2 A. Las monocapas que contienen una proporción alta de péptido ($X_{\text{lípido}} = 0.04, 0.1$ y 0.2) presentan un punto de inflexión alrededor de 42-43 mN/m. Esta presión corresponde a la presión de colapso del péptido puro. También, a partir del gráfico A observamos como la presión de colapso de las películas de mezclas y la del lípido puro es 70 mN/m, excepto para la fracción molar $X=0.04$, cuyo valor es 46 mN/m. Esto podría indicar una exclusión del MAP₄VP3 de la interfase durante la compresión (Taneva 1994, 95, 97b). Sin embargo, si observamos las isotermas (figura 4.2) el perfil de la compresión de la monocapa de DPPC pura es muy diferente al de las monocapas mixtas con MAP₄VP3, incluso si la proporción de péptido es de tan solo 0.2 (fracción molar). Esto indica que, aunque sea de manera parcial, el péptido permanece en la interfase.

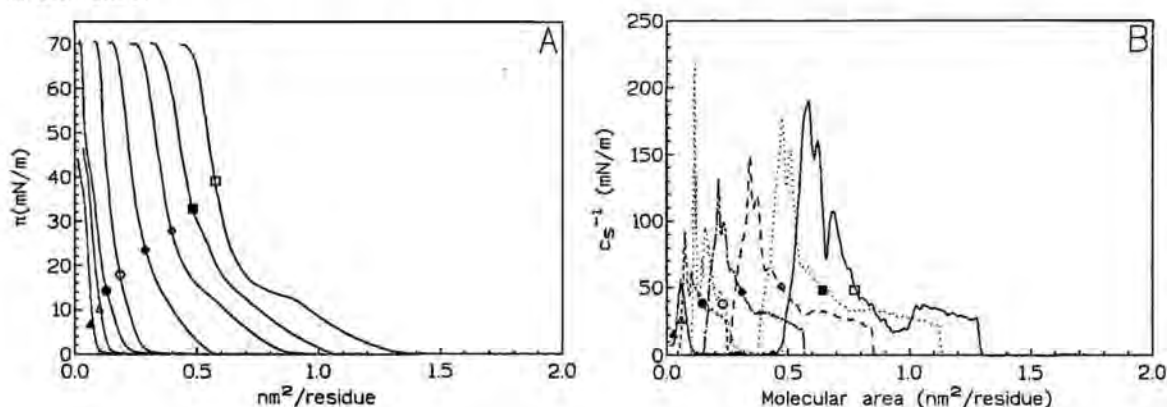


Figura 4.2 Isotermas de Compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP3 con DPPC a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (A). Módulo de Compresibilidad vs. área molecular de las monocapas mixtas (B). $X_{\text{lípido}} = (\blacktriangle) 0, (\Delta) 0.04, (\bullet) 0.1, (\circ) 0.2, (\blacklozenge) 0.4, (\diamond) 0.6, (\blacksquare) 0.8, (\diamond) 1$.

En la figura 4.2 B se representa el módulo de la compresibilidad (C_s^{-1}), dónde para fracciones molares altas de péptido $X_{\text{lípido}} \leq 0.6$, éste queda registrado en el perfil gráfico. Por tanto, el péptido se mantiene en la monocapa a pesar del punto de inflexión. Para las

fracciones lipídicas X_{lipido} (0.6 y 0.8) se observa el cambio de fase de líquido expandido a líquido condensado, al ir comprimiendo la monocapa. Cuando la X_{lipido} es de 0.4, 0.2 y 0.1 el valor máximo del módulo de compresibilidad es 149, 131 y 119 mN/m, respectivamente. Al ser valores superiores a 100 mN/m, las monocapas en fase líquido expandido pasan a estado líquido condensado antes de alcanzar el colapso.

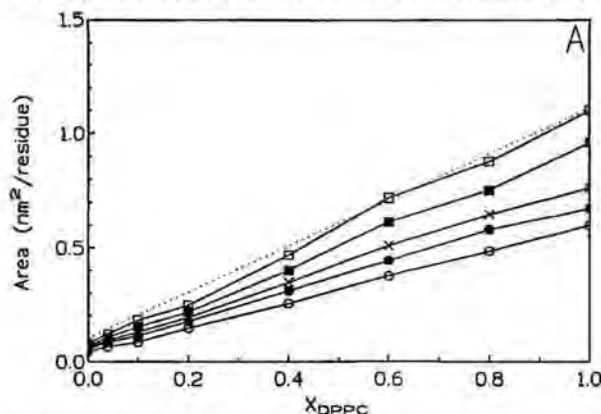


Figura 4.3 Miscibilidad de DPPC/MAP₄VP3 en monocapas mixtas extendidas sobre subfase PBS. Áreas ocupadas por residuo (nm²/residuo) a presiones superficiales de (□)5 mN/m, (■)10 mN/m, (×) 15 mN/m, (●) 20 mN/m, y (○)32 mN/m.

Para caracterizar la interacción entre los componentes DPPC y MAP₄VP3 en las monocapas mixtas formadas, se registra el área media en función de la fracción de lípido. La desviación en el área media de la regla de la aditividad nos muestra la miscibilidad entre dichos componentes. A la presión de 5 y 10 mN/m existen desviaciones negativas y su valor es cuantitativamente mayor, cuando la fracción molar de péptido es alta. Si la presión considerada es superior a 15 mN/m el sistema se comporta como ideal.

Cálculos termodinámicos

Los valores del exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y el parámetro de interacción (α) se muestran en la tabla 4.2. A presión de 5 mN/m y al considerar fracciones molares $X_{\text{lipido}} > 0.2$, todos estos valores son pequeños y positivos. Por tanto, las desviaciones observadas para la aditividad (figura 4.3), no son significativas, ya que los valores de energía de mezclas son menores al valor 2474 Jmol⁻¹ a 25 °C. Además, al ser las energías de interacción positivas a la presión de 20 mN/m a excepción de las fracciones $X_{\text{lipido}} > 0.4$, presentarán ligeras atracciones entre las moléculas que constituyen la película.

Tabla 4.2 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/MAP₄VP3 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m.

Fracción Molar DPPC/MAP ₄ VP3	5 mN/m			20 mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04:96	-0.04	-0.0006	-0.63	2.76	0.0300	35.97
10:90	-1.09	-0.0022	-2.76	1.76	0.0100	9.80
20:80	-0.04	-0.0017	-0.21	7.54	0.0200	23.61
40:60	0.54	0.0009	1.13	-0.33	-0.0006	-0.71

60:40	0.29	0.0005	0.59	6.53	0.0100	13.61
80:20	1.01	0.0025	3.14	4.44	0.0100	13.90

4.4.2 Miscibilidad de MAP₄VP3 con DPPC-PI (9:1)

Las isothermas de compresión del sistema mixto formado por DPPC-PI/ MAP₄VP3 se muestran en la figura 4.4 B.

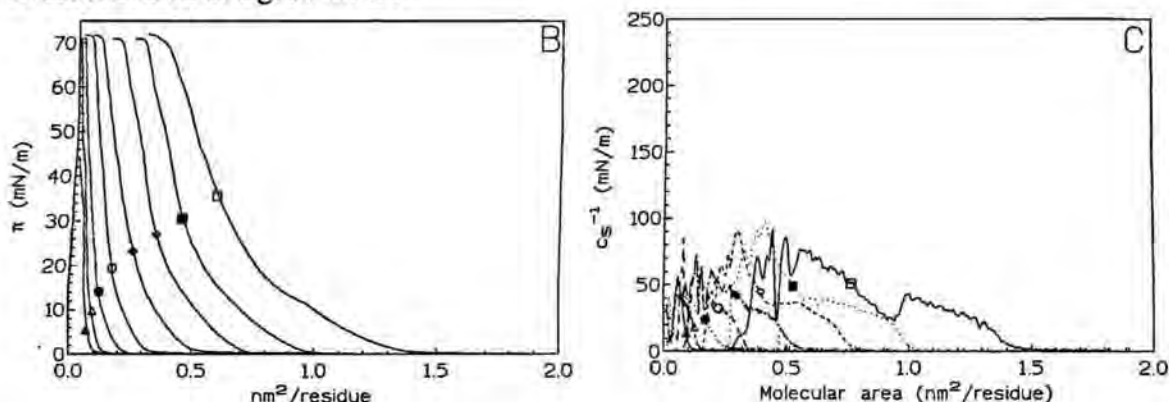


Figura 4.4 Isothermas de Compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP3 con DPPC/PI (9:1) a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (C). Módulo de Compresibilidad vs. area molecular de las monocapas mixtas DPPC/PI (9:1)-MAP₄VP1 (D).). X_{lipido}= (▲) 0, (Δ)0.04, (●) 0.1, (○) 0.2, (◆) 0.4, (◇)0.6, (■) 0.8, (◇) 1.

La presión de colapso (π_c) para toda la serie de isothermas mixtas es de 70 mN/m, de manera que dichas películas al tener la π_c alta serán más estables. Cuando la proporción de péptido en la monocapa es elevada se observa un punto de inflexión alrededor de 42-44 mN/m que coincide con la presión de colapso del péptido puro, lo que puede suponer la expulsión parcial del péptido de la monocapa. Al observar el gráfico C (figura 4.4), el valor de la compresibilidad máxima para cualquier fracción molar $X_{lipido} > 0.04$ se encuentra entre 50-100 mN/m. Así, al ir comprimiendo las capas monomoleculares sus moléculas pasarán del estado gas a un estado líquido expandido y después, a un estado más condensado llamado líquido intermedio. Esta transición de fase LE a LI queda reflejada en el registro gráfico C (figura 4.4), con un mínimo solamente para fracciones molares $X_{lipido} > 0.6$.

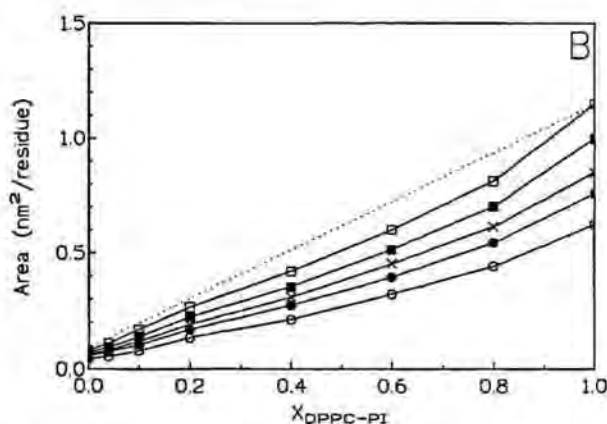


Figura 4.5 Miscibilidad de DPPC/PI (9:1)/MAP₄VP3 en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Areas ocupadas por residuo (nm²/residuo) a presiones superficiales de (□)5 mN/m, (■)10 mN/m, (×) 15 mN/m, (●) 20 mN/m, y (○)32 mN/m.

En la figura 4.5 se muestra la desviación del área media por residuo respecto a la fracción molar considerada a una determinada presión, para monocapas de DPPC-PI(9:1)/MAP₄VP3. A las fracciones molares $X_{lipido} > 0.2$ y a todas las presiones se observan desviaciones negativas de la regla de la aditividad, lo que indica la existencia de fuerzas de tipo atractivo.

Cálculos termodinámicos

En la tabla 4.3 se detallan los valores del exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y el parámetro de interacción (α) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m, para el sistema formado por DPPC/PI (9:1)-MAP₄VP3.

Tabla 4.3 Energía de mezcla en exceso (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/PI (9:1)-MAP₄VP3 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m.

Fracción Molar DPPC-PI/ MAP ₄ VP3	5 mN/m			20 mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04:96	-0.04	0.0005	-0.67	1.84	0.0200	24.07
10:90	0.50	0.0022	2.76	4.69	0.0200	26.17
20:80	0.29	0.0007	0.88	5.02	0.0100	15.7
40:60	4.31	0.0100	9.01	29.72	0.0500	61.97
60:40	3.18	0.0100	6.61	33.12	0.0600	69.04
80:20	0.33	0.0008	1.05	3.31	0.0100	10.38

El valor del exceso de energía libre de mezcla es un valor positivo, pero cuando la proporción de lípido presente en la monocapa es 0.4 o 0.6 este valor es mayor tanto a la presión de 5 mN/m como a la de 20 mN/m. Sin embargo, al ser dicho valor menor que el producto de RT diremos que las desviaciones de la regla de la aditividad no son significativas.

4.4.3 Miscibilidad de MAP₄VP3 con DPPC-SA(9:1)

Las isotermas de compresión así como los módulos de la compresibilidad para el sistema constituido por DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP3 se detallan en la figura 4.6 gráfico C y gráfico D, respectivamente.

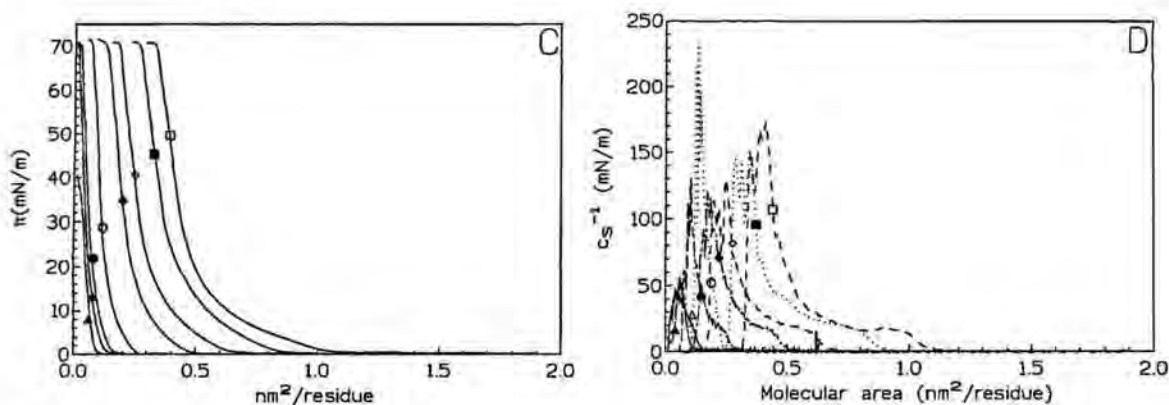


Figura 4.6 Isotermas de Compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP3 con DPPC/SA (9:1) a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (E). Módulo de Compresibilidad vs. area molecular de las monocapas mixtas DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP3 (F). X_{lipido} = (▲) 0, (Δ) 0.04, (●) 0.1, (○) 0.2, (◆) 0.4, (◇) 0.6, (■) 0.8, (◇) 1.

Todas las isotermas mixtas presentan una presión de colapso alrededor de 70 mN/m. En el registro del módulo de la compresibilidad (gráfico D) no se observa ningún cambio de fase marcado, pero las moléculas al ir comprimiendo la película pasan de gas a líquido expandido y luego a líquido comprimido, donde las moléculas están más cohesionadas. La compresibilidad máxima (C_s^{-1}) para éstas isotermas mixtas >100 mN/m.

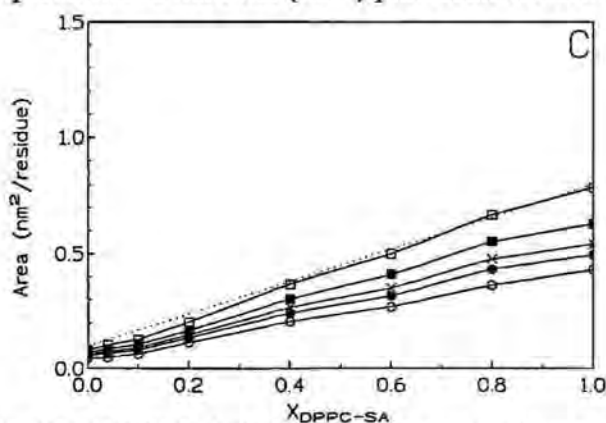


Figura 4.7 Miscibilidad de DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP3 en monocapas mixtas extendidas sobre subfase PBS. Areas ocupadas por moléculas ($nm^2/molécula$) a presiones superficiales de (□) 5 mN/m, (■) 10 mN/m, (×) 15 mN/m, (●) 20 mN/m, and (○) 32 mN/m.

La miscibilidad de éste sistema triple DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP3 el cuál se muestra en la figura 4.7 no muestra desviaciones de la regla de la aditividad con ello nos hace pensar en una miscibilidad total o bien en una inmiscibilidad, donde las moléculas ocuparán espacios contiguos.

Cálculos termodinámicos

En la tabla 4.4 se recogen los parámetros termodinámicos calculados para el sistema formado por DPPC-SA (9:1)/ MAP₄VP3. Los valores del exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH) y los valores del parámetro (α) a las presiones superficiales (π) de 5 y 20 mN/m, a casi todas las fracciones molares son positivas con un valor muy pequeño. A excepción de la X_{60:40} a presión de 5 mN/m, cuyo valor es negativo. Así pues entre las moléculas se establecerán ligeras repulsiones, pero estas al ser todos los parámetros <RT diremos que no son significativas.

Tabla 4.4 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP3 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m.

Fracción Molar DPPC-SA/ MAP ₄ VP3	5 mN/m			20 mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04:96	0.04	0.0005	0.63	1.93	0.0200	24.83
10:90	1.72	0.0100	9.50	1.01	0.0045	5.53
20:80	0.08	0.0003	0.33	2.01	0.0100	6.24
40:60	0.13	0.0002	0.21	2.39	0.0039	4.94
60:40	-0.33	-0.0006	-0.71	0.96	0.0016	2.05
80:20	0.29	0.0008	0.96	2.22	0.0100	6.91

Consideraciones finales de los estudios de miscibilidad de MAP₄VP3 con tres composiciones lipídicas en monocapas mixtas.

La construcción peptídica de MAP₄VP3 muestra una monocapa estable con una presión de colapso de 43 mN/m. Los registros gráficos de presión superficial respecto al área por residuo de las monocapas mixtas origina gráficos intermedios a los de los componentes puros. Al disminuir la cantidad de lípido presente en la monocapa de 1 a 0, la isoterma tiende a áreas menores y la presión de colapso también disminuye hasta la presión de colapso del péptido. A partir del cálculo del módulo de la compresibilidad, el péptido tiene un valor de 50 mN/m y su estado es líquido expandido. La presencia del péptido se marca en las isotermas mixtas a la vez que también en los registros de los módulos de compresibilidad. Las curvas de presión respecto al área están más expandidas si las comparamos con las monocapas mixtas con MAP₄VP1. Al analizar el módulo de compresibilidad para las isotermas mixtas con péptido de DPPC y/o DPPC-SA observamos que al aumentar la cantidad de lípido las monocapas pasan de un estado LE a LC, al ir comprimiendo las moléculas de dichas películas y antes de alcanzar el colapso. Para la monocapa aniónica DPPC-PI al comprimirla pasa de fase expandida a estado líquido intermedios, y su módulo de compresibilidad se reducen al aumentar la fracción molar de péptido, como resultado de la perturbación de las cargas negativas por parte del péptido.

La miscibilidad se muestra en las figuras 4.3, 4.5 y 4.7, para la monocapa de DPPC a bajas presiones se observa desviaciones pequeñas y negativas del comportamiento ideal en cambio éstas desviaciones son más marcadas para la monocapa de DPPC-PI, sugiriendo la presencia de fuerzas atractivas entre ellas. Al considerar la monocapa de DPPC-SA ésta presenta un comportamiento ideal. Para mejor caracterizar la miscibilidad de los componentes se calculan los parámetros termodinámicos. En las tablas 4.2, 4.3 y 4.4 se muestran los valores del exceso de energía libre de mezcla de todas las mezclas lipídicas, cuyos valores son inferiores al valor del producto RT (2474 J/mol, a 25° C). De modo que al presentar desviaciones de la regla de la aditividad éstas no son significativas según los resultados obtenidos de los cálculos termodinámicos. Por otro lado, la energía de interacción para las tres mezclas de Péptido/DPPC, DPPC-PI o DPPC-SA dan un valor positivo, lo que indica que entre sus moléculas se establecerán fuerzas de repulsión, valores similares han sido obtenidos para el péptido palm-VP3 (110-125) (Sospedra,

2001). Además, este efecto expansor de la monocapa es consistente con la presencia del péptido en la monocapa hasta el colapso. Por otra parte, cuando se estudia el área por residuo para las diferentes fracciones molares a una presión superior a la del colapso del péptido ($\pi = 60$ mN/m) obtenemos desviaciones negativas de la regla de la aditividad para la monocapa de DPPC y DPPC-PI, para esta última la desviación es más marcada. En cambio, la monocapa catiónica se comporta como ideal o bien una ligera desviación positiva a las fracciones molares de 0.4 y 0.8. Así pues, para la monocapa aniónica al tener una desviación negativa a la regla de la aditividad según Taneva et al. (Taneva,1996) es posible la expulsión de moléculas de lípido de la película al ir comprimiendo, o también se puede explicar como un mejor empaquetamiento de las moléculas de péptido MAP₄VP3 y las cadenas alquílicas de lípido. Este fenómeno también se observa para el péptido MAP₄VP1.

En algunos caso es posible para las películas ser miscibles a bajas presiones, y cerca del colapso producirse separación de fases, de manera que podemos estudiar la miscibilidad en el colapso. Cuando dos componentes son miscibles, el colapso varía con la composición y podemos aplicar la ecuación 2 (resultados y discusión). Después de sustituir los valores de la ecuación encontramos un resultado pacticamente 1 (0.99 a 0.98). Esto es indicativo que en el punto de colapso existe miscibilidad ideal.

A pesar de que el comportamiento del péptido es prácticamente ideal, éste muestra una mayor interacción con la monocapa negativa. De todas maneras no es significativa y entre las moléculas de estos sistemas se establecerán interacciones de tipo hidrofóbico dado el carácter anfipático del péptido.

4.3 ISOTERMA DE COMPRESION DEL PEPTIDO MAP₄VP1 (11-25)

El antígeno peptídico multiple MAP₄VP1 (11-25) forma monocapas estables en la interfase aire-agua, con una presión de colapso de 21 mN/m, como se observa en la figura 4.8. La isoterma de compresión de la monocapa presenta una inflexión alrededor de 14 mN/m de presión superficial. Este fenómeno está descrito para polipéptidos poliméricos (Nagy, 1998) para proteínas como la albumina del suero bovino (Cho,1997) y otras proteínas como las del surfactante pulmonar (Taneva,1995), y suele atribuirse al paso de la monocapa a una fase más condensada.

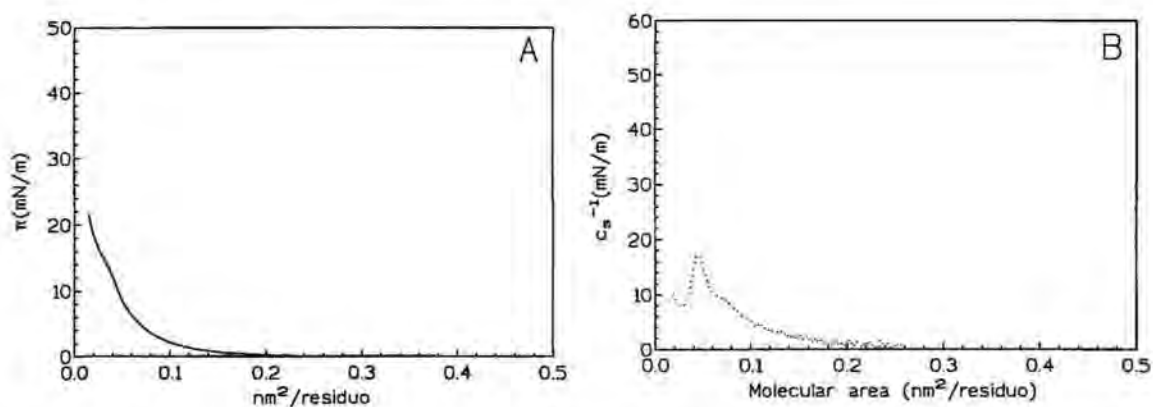


Figura 4.8 Isoterma de compresión de MAP₄VP1 extendida sobre una subfase de PBS a pH 7.4 a temperatura ambiente. Módulo de Compresibilidad vs. área molecular de la monocapa de MAP₄VP1.

El cálculo del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}), que se muestra en la figura 4.8B para las distintas áreas moleculares a lo largo de la compresión, indica que las monocapas de MAP₄VP1 pasan de un estado gaseoso para áreas moleculares superiores a 0.16 nm²/residuo peptídico, a un estado de líquido expandido a áreas inferiores, hasta alcanzar el colapso sin que las moléculas adopten una fase de líquido condensado. Por ello la inflexión observada a 14 mN/m en la isoterma de compresión puede atribuirse a una mayor condensación de las moléculas sin abandonar la fase expandida.

En la tabla 4.5 se muestran los valores de la distintas áreas calculadas para el MAP₄VP1. Los péptidos cuya conformación es una α -hélice presentan un área extrapolada comprendida entre 0.08-0.1 nm²/residuo además de tener una presión de colapso entre 20-30 mN/m (Maget-Dana,1999a; Fidelio,1986). Para la isoterma de compresión del MAP₄VP1 se obtiene un valor de área extrapolada (área límite) de 0.08 nm², éste se correspondería a un área por residuo en la fase más condensada (comprimida) de la monocapa de un péptido anfipático, con estructura secundaria de α -hélice

Tabla 4.5 Valores del área-por residuo obtenidos a partir de las isotermas del péptido.

Área lift-off	Área extrapolada	Área colapso	π_c
0.21 nm ²	0.08 nm ²	0.02 nm ²	20.6 mN/m

4.4 MISCIBILIDAD DE MAP₄VP1 (11-25) CON LÍPIDOS EN MONOCAPAS MIXTAS

La miscibilidad del péptido MAP₄VP1 (11-25) con las mezclas lipídicas escogidas como modelos de membrana DPPC, DPPC-PI (9:1) y DPPC-SA (9:1) se estudia mediante monocapas mixtas extendidas sobre una interfase aire-agua. Al realizar las isotermas de compresión se obtienen los registros de presión superficial respecto al área molecular y también los módulos de compresibilidad, para mezclas con diferentes fracciones molares de lípido ($X_{\text{lípido}}$ 0 a 1). Además, para todos ellos se calculan los parámetros termodinámicos que definen su miscibilidad.

4.4.1 Miscibilidad de MAP₄VP1 con DPPC

Las isotermas de compresión del sistema binario formado por DPPC y MAP₄VP1 se muestran en la figura 4.9.

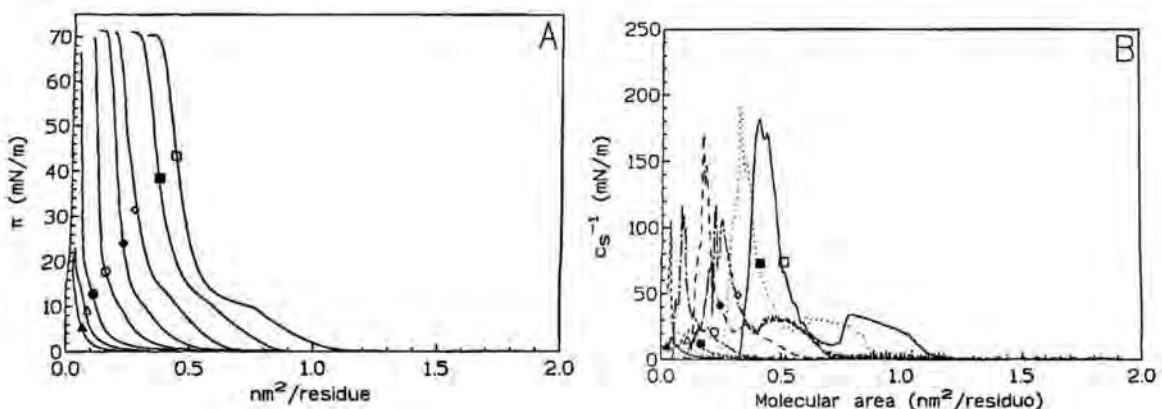


Figura 4.9 Isotermas de compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP1 con DPPC a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (A). Módulo de Compresibilidad vs. área molecular de las monocapas mixtas (B). $X_{\text{lípido}} = (\blacktriangle) 0, (\triangle) 0.04, (\bullet) 0.1, (\circ) 0.2, (\blacklozenge) 0.4, (\diamond) 0.6, (\blacksquare) 0.8, (\diamond) 1$.

En el gráfico A, donde se representa la presión superficial respecto al área por residuo peptídico, observamos a fracciones molares de péptido pequeñas ($X_{\text{lípido}} = 0.4, 0.6$ y 0.8) una presión de colapso alrededor de 70 mN/m . Cuando la presencia de péptido en la monocapa es grande, a las fracciones molares $X_{\text{lípido}}$ de $0.04, 0.1$ y 0.2 , éstas tienen un punto de inflexión a nivel de $14\text{-}18 \text{ mN/m}$. El cual corresponde al punto de inflexión del péptido puro. Por otra parte, la presión de colapso para dichas mezclas es de 22 mN/m , 66.5 mN/m y de 69.7 mN/m respectivamente, y todo ello podría indicar la expulsión del MAP₄VP1 de la interfase durante la compresión. Al observar el módulo de compresibilidad (gráfica B) para las mismas fracciones molares la presencia del péptido queda registrado en el perfil gráfico. Por tanto, la película no muestra signos de expulsión del componente menos estable, en este caso el péptido. Cuando se considera fracciones $X_{\text{lípido}} \geq 0.6$ se evidencia en el perfil del registro gráfico B (figura 4.9) con un mínimo el cambio de fase, de líquido expandido a líquido condensado.

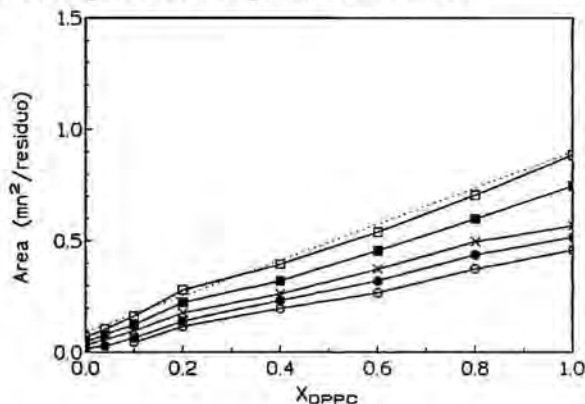


Figura 4.10 Miscibilidad de DPPC/MAP₄VP1 en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por residuo ($\text{nm}^2/\text{residuo}$) a presiones superficiales de $(\square) 5 \text{ mN/m}$, $(\blacksquare) 10 \text{ mN/m}$, $(\times) 15 \text{ mN/m}$, $(\bullet) 20 \text{ mN/m}$, y $(\circ) 32 \text{ mN/m}$.

La miscibilidad entre MAP₄VP1 (11-25) y DPPC viene representada en la figura 4.10. Para las presiones superficiales de 5 y 10 mN/m la desviación de la regla de la aditividad es ligeramente negativa a fracciones molares lipídicas mayores de 0.2 . Resultados similares se obtuvieron en estudios de miscibilidad de la proteína SP-B, del surfactante pulmonar, con DPPC (Taneva, 1994), e indican que a pesar de que parcialmente puede producirse una cierta exclusión de péptido de la monocapa a presiones superiores a 20 mN/m , parte del MAP₄VP1 extendido inicialmente permanece en las monocapas. El hecho de que a presiones inferiores a 20 mN/m , las desviaciones de la actividad, si las hay sean negativas, sugieren la existencia de fuerzas de atracción entre moléculas de DPPC y las de MAP₄VP1.

Cálculos termodinámicos

El cálculo de los excesos de energías libres de mezclas (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH) y los valores del parámetro (α) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m , se muestran en la tabla 4.6. Además, se realizó un análisis del cambio de la presión superficial de colapso en función de la composición.

Tabla 4.6 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapas mixtas de DPPC/MAP₄VP1 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m.

Fracción Molar DPPC/MAP ₄ VP1	5 mN/m			20mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04:96	1.13	0.0100	14.65	6.87	0.0700	44.67
10:90	0.63	0.0027	3.39	5.32	0.0200	28.05
20:80	0	0.00001	0.04	2.97	0.0100	9.34
40:60	-0.59	-0.0010	-1.26	-1.42	-0.0024	-2.97
60:40	-1.47	-0.0025	-3.05	-2.47	-0.0042	-5.15
80: 20	-0.67	-0.0017	-2.13	-0.71	-0.0018	-2.26

Los valores de los excesos de energías libres de mezclas no son superiores al producto RT (2474 Jmol⁻¹a 25°C) y además, las energías de interacción son valores positivos para fracciones molares grandes de péptido mientras que para fracciones molares lipídicas mayores de 0.6 dichos valores son negativos. Por tanto, entre las moléculas de MAP₄VP1 y DPPC existen ligeras interacciones atractivo de carácter muy débil, a altas proporciones de lípido.

4.4.2 Miscibilidad de MAP₄VP1 con DPPC-PI (9:1)

Las isotermas de compresión realizadas a partir de las mezclas DPPC-PI (9:1)/MAP₄VP1 muestran una reducción del área por residuo al aumentar la fracción molar de péptido.

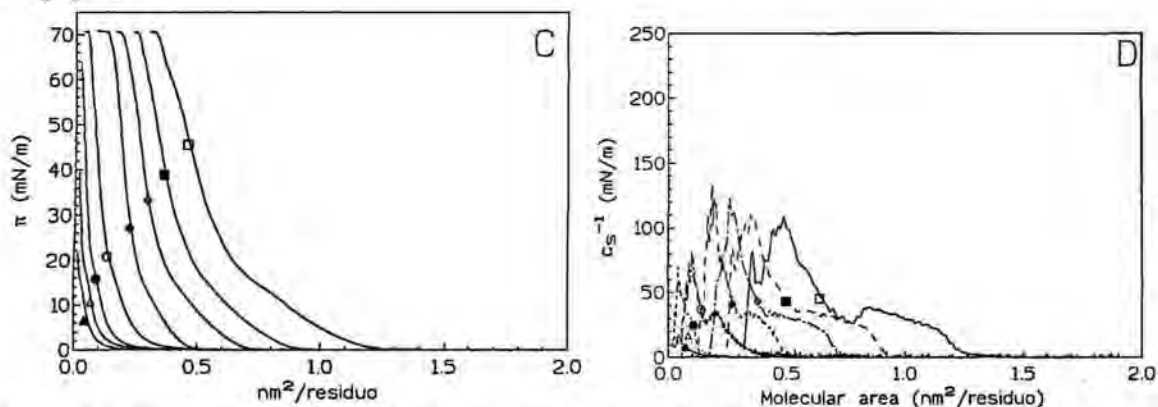


figura 4.11 Isotermas de compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP1 con DPPC/PI (9:1) a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (C). Módulo de Compresibilidad vs. area molecular de las monocapas mixtas DPPC/PI (9:1)-MAP₄VP1 (D). X_{lipido} = (▲) 0, (Δ)0.04, (●) 0.1, (○) 0.2, (◆) 0.4, (◇)0.6, (■) 0.8, (◇) 1.

En la figura 4.11 (izquierda, gráfico C) observamos como la presión de colapso pasa de 20 mN/m a 70 mN/m a medida que se incrementa la proporción de lípido en la monocapa. A fracciones molares de péptido elevadas ($X_{\text{lipido}}= 0.04, 0.1$ y 0.2), las isotermas presentan un punto de inflexión alrededor de 14-20 mN/m, que al disminuir la proporción de péptido en la monocapa, el punto de inflexión pasa a valores de presión superiores. Por otro lado, el registro del módulo de la compresibilidad (gráfico D) para cualquiera de las fracción molares consideradas muestra la compresibilidad máxima entre

50-100 mN/m, propia de mezclas lipídicas con insaturaciones (Smaby, 1997). De este modo, las películas de mezcla pasan de fase líquido expandido a líquido intermedio al comprimir las moléculas del sistema. Ahora bien, al considerar fracciones molares $X_{lipido} \geq 0.1$ el cambio de fase de líquido expandido a líquido intermedio se observa claramente en el registro gráfico D.

Al representar el área por residuo a diferentes fracciones molares de lípido y para varias presiones superficiales (figura 4.12), se observan desviaciones negativas respecto a la regla de la aditividad. Estas desviaciones son máximas a 5 mN/m y en monocapas, con una elevada proporción de lípido este comportamiento sugiere que en este sistema ternario se establecerán interacciones atractivas entre las moléculas, favoreciendo la miscibilidad de los mismos.

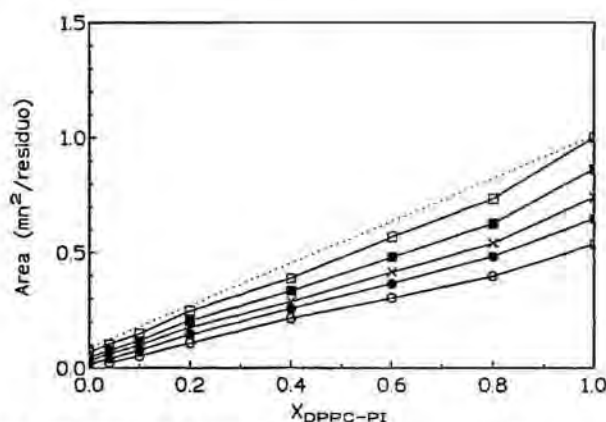


Figura 4.12 Miscibilidad de DPPC/PI (9:1)/MAP₄VP1 en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Áreas ocupadas por residuo (nm²/residuo) a presiones superficiales de (□)5 mN/m, (■)10 mN/m, (×) 15 mN/m, (●) 20 mN/m, y (○)32 mN/m.

Cálculos termodinámicos

En la tabla 4.7 se recogen los parámetros termodinámicos calculados para el sistema formado por DPPC-PI (9:1)/ MAP₄VP1. Los excesos de energías libres de mezclas (ΔG_M^{Ex}), las energías de interacción (ΔH) y los valores del parámetro (α) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m a casi todas las fracciones molares son negativas con un valor muy pequeño. Además, para todas las fracciones molares los parámetros termodinámicos son negativos a excepción cuando la proporción de péptido es elevada. Así, entre las moléculas que constituyen dicha monocapa se establecerán interacciones de tipo atractivo, pero como los excesos de energías libres de mezclas son menores al producto RT, estas no son significativas.

Tabla 4.7 Exceso energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/PI (9:1)-MAP₄VP1 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 10 y 32 mN/m.

Fracción Molar DPPC-Pi / MAP ₄ VP1	5 mN/m			20mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04:96	0.12.	0.0014	1.76	1.09	0.0100	14.23
10:90	-0.71	-0.0031	-3.89	-2.22	-0.0100	-12.43
20:80	-0.75	-0.0019	-2.30	-1.01	-0.0250	-3.14

40:60	-2.51	-0.0043	-5.27	-6.49	-0.0100	-13.56
60:40	-1.76	-0.0029	-3.64	-3.64	-0.0100	-7.54
80:20	-1.01	-0.0025	-3.10	-0.75	-0.0019	-2.43

4.4.3 Miscibilidad de MAP₄VP1 con DPPC-SA(9:1)

Al igual que en las anteriores series de monocapas el registro gráfico de presión superficial (π) respecto al área por residuo peptídico se muestra en la figura 4.13. La presión de colapso para fracciones $X_{\text{lípido}} > 0.1$ es 70 mN/m, la misma que el lípido puro.

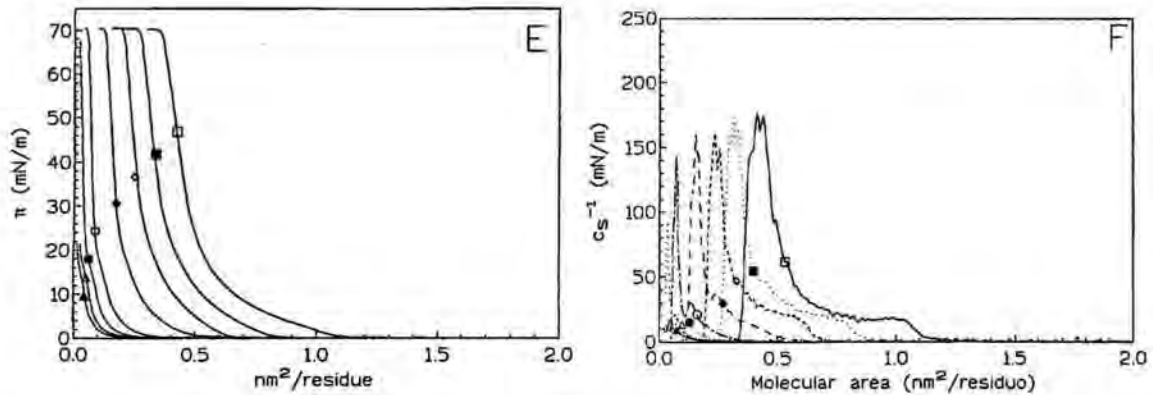


Figura 4.13 Isothermas de compresión de monocapas mixtas de MAP₄VP1 con DPPC/SA (9:1) a diferentes fracciones molares y extendidas sobre una subfase de PBS a pH 7.4 (E). Módulo de Compresibilidad vs. area molecular de las monocapas mixtas DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP1 (F). $X_{\text{lípido}}$ = (▲) 0, (Δ)0.04, (●) 0.1, (○) 0.2, (◆) 0.4, (◇)0.6, (■) 0.8, (◇) 1.

En la figura 4.13 (gráfico E), las fracciones molares de lípido ($X_{\text{lípido}}$ =0.04,0.1,0.2 y 0.4) tienen un punto de inflexión a nivel de 14-20 mN/m. En el módulo de la compresibilidad respecto al área (gráfica F) observamos el perfil del péptido, a casi todas las fracciones estudiadas. Pero al disminuir la cantidad de péptido en la composición de la película, éste se marca menos ($X_{\text{lípido}}$ =0.6 y 0.8). El valor de la compresibilidad máxima es superior a 100 mN/m para $X_{\text{lípido}} \geq 0.1$, de manera que para dichas fracciones molares las moléculas están en fase condensada antes de alcanzar el colapso (romperse). Al comprimir las monocapas sus moléculas pasan de un estado de ordenación fluido a uno más ordenado de manera progresiva sin coexistir en equilibrio la fase líquido expandido y la líquido condensado, como se refleja en los dos gráficos de la figura 4.13.

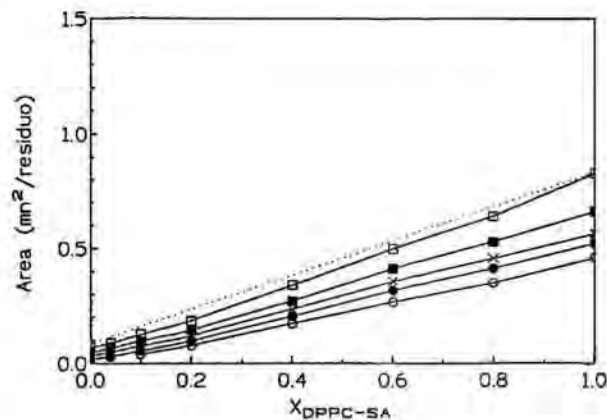


Figura 4.14 Miscibilidad de DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP1 en monocapas mixtas extendidas sobre PBS. Areas ocupadas por residuo (nm²/residuo) a presiones superficiales de (□)5 mN/m, (■)10 mN/m, (×) 15 mN/m, (●) 20 mN/m, and (O)32 mN/m.

Las desviaciones de la regla de la aditividad de las áreas nos da idea del grado de miscibilidad entre los componentes (figura 4.14). A la presión de 5 mN/m se observan desviaciones negativas a todas las composiciones consideradas. Por encima de la presión $\pi=5\text{mN/m}$, no se observan desviaciones de la aditividad, lo que puede indicar mezcla total o bien inmiscibilidad en el sistema.

Cálculos termodinámicos

En la tabla 4.8 se recogen los excesos de las energías libres de mezclas (ΔG_M^{Ex}), las energías de interacción (ΔH) y los valores del parámetro (α) a las presiones superficiales de 5 y 20 mN/m. Además, también para éste sistema se analiza el cambio de la presión superficial de colapso en función de la composición.

Tabla 4.8 Exceso de energía libre de mezcla (ΔG_M^{Ex}), energía de interacción (ΔH), y parámetro de interacción (α) para las monocapa mixta de DPPC/SA (9:1)- MAP₄VP1 extendida sobre una subfase de PBS (pH=7.4) a las presiones superficiales de 5 y 20mN/m.

Fracción Molar DPPC-Sa / MAP ₄ VP1	5 mN/m			20 mN/m		
	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	ΔH (J/mol)
04: 96	-1.51	-0.0200	-19.76	-4.19	-0.0400	-27.30
10: 90	-1.01	-0.0046	-5.65	-1.80	-0.0100	-9.92
20: 80	0.13	0.0003	0.42	0.75	0.0019	2.34
40: 60	-0.71	-0.0012	-1.51	-2.18	-0.0037	-4.56
60: 40	-1.72	-0.0028	-3.52	-3.01	-0.0100	-6.28
80: 20	-4.99	-0.0019	-2.39	-2.39	-0.0100	-7.45

Los valores del exceso de energía libre de mezcla para las diferentes fracciones molares son negativo excepto para la fracción X_{20:80}. Dicho comportamiento es indicativo de una mayor estabilidad de la monocapa. Puesto que, entre las cadenas hidrofóbicas se establecen las fuerzas cohesivas de Van der Waals. Además se establecerán seguramente interacciones de tipo electrostático entre la cabeza polar de las mezclas lipídicas y el péptido cargado negativamente. Pero al ser todos los parámetros termodinámicos (ΔG_M^{Ex} y ΔH) menores al producto de RT, las interacciones encontradas no son significativas.

Consideraciones finales de los estudios de miscibilidad de MAP₄VP1 con tres composiciones lipídicas en monocapas mixtas.

El MAP₄VP1 forma monocapas estables debido a su carácter anfipático (figura 4.8). El análisis del módulo de compresibilidad para el péptido da un valor de 20 mN/m indicando un estado de líquido expandido. La presencia del péptido se marca en la forma de los gráficos compresibilidad vs área molecular, cuando la fracción molar de mezcla lipídica es baja. En la figura 4.9 se muestran las isothermas de compresión de DPPC/MAP₄VP1, así como su módulo de compresibilidad. Para cada mezcla se observa

que al ir aumentando la cantidad de lípido, la monocapa pasan de LE a LC. Para la monocapa aniónica de DPPC-PI el cambio de fase es de estado LE a LI. Al considerar tanto las mezclas lipídicas de DPPC como las de DPPC-PI muestran un cambio de fase de LE a LC o LI, que es más marcado para la monocapa de DPPC y éste desaparece cuando el lípido es remplazado por el péptido. En el caso de la mezcla DPPC-SA con MAP₄VP1 la forma de los registros es continua indicando un mejor empaquetamiento de sus moléculas.

En las isotermas de compresión de los registros gráficos 4.9, 4.11 y 4.13, la presencia del péptido resulta en una reducción del área por molécula que es proporcional al a la fracción molar del péptido. Además, la presión de colapso se incrementa al tiempo que se aumenta la cantidad de lípido presente en la misma. Por otra parte, los valores de área por residuo respecto a la fracción molar de lípido a las diferentes presiones se muestran en las figuras 4.10, 4.12 y 4.14. En todos los casos pequeñas desviaciones negativas del comportamiento ideal se observan, a presiones de 5 y 10 mN/m. Al considerar una presión superior a la de exclusión del péptido, la miscibilidad del mismo con DPPC y DPPC-SA presenta ligeras desviaciones positivas. En cambio, al considerar las fracciones molares 0.6 y 0.8 péptido/DPPC-PI éstas presentan desviaciones negativas, mientras que las restantes mezclas se comportan como ideales. Así pues, entre las moléculas de lípido y las de péptido MAP₄VP1 se establecerán fuerzas de tipo atractivo que darán estabilidad a dichas monocapas. Para el péptido VP3 (110-121) en monocapas mixtas de DPPC y DPPC-DPPG (1:1) se observa un fenómeno similar (Perez, 1995).

En el sentido de caracterizar la miscibilidad de los componentes en la monocapa, los parámetros termodinámicos asociados al proceso se han calculado. Los excesos de energía libre de mezcla se muestran en las tablas 4.6, 4.7 y 4.8 son valores pequeños a cualquier fracción molar y en todos los casos, menores al producto RT (2474 J/mol, a 25° C). Por tanto, las interacciones observadas son mínimas con lo cuál los diferentes componentes forman mezclas ideales. La energía de interacción (ΔH) para las mezclas de péptido/DPPC a fracciones molares de péptido grandes es un valor positivo, por tanto entre sus moléculas existirán cierta repulsión. En cambio, para la mezcla péptido/ DPPC-SA o, DPPC-PI el valor es siempre negativo y se producirá atracción entre las mismas. Interacciones similares se han observado para el péptido VP2 en monocapas de DPPC, DPPE y PI, siendo las mismas no significativas, también (Haro, 1996).

Una vez establecido que no existen desviaciones significativas de la ley de la aditividad nos interesa conocer si los componentes son miscibles o no. Al realizar el análisis del cambio de la presión superficial de colapso en función de la composición de la mezcla (ecuación 3, resultados y discusión). Así, al aplicar la ecuación a los valores experimentales se obtiene que la suma de ambos exponenciales es cercana a 1 y su valor oscila entre 0.96 a 1.001, para todos los sistemas lípidos-péptido estudiados. Así pues, estos sistemas de dos o tres componentes son miscibles.

Como conclusión en la interacción del péptido MAP₄ VP1 con las diferentes monocapas predomina las de naturaleza hidrofóbica, dado el carácter anfipático del péptido y la presencia de un 10 % de carga dentro de la monocapa ésta no influencia la interacción de modo significativo.

4.5 ESTUDIOS DE INCORPORACION DE LAS ESTRUCTURAS PEPTIDICAS A MONOCAPAS

La incorporación de la estructura peptídica MAP₄VP1 y de la estructura peptídica MAP₄VP3 a monocapas formadas por diferentes lípidos puros, y mezcla de ellos a diferentes proporciones se realiza extendiéndolos sobre una interfase aire-agua, de PBS o PBS adicionada de péptido, y a temperatura ambiente. Para estos estudios se realizaron las isotermas de compresión según el apartado 2.1.2.1. de materiales y métodos, obteniéndose los registros de presión superficial respecto al área molecular primero sobre la subfase de PBS y después sobre la subfase PBS a la que se había adicionado péptido a una concentración determinada. Posteriormente, se analiza si la incorporación de dichas estructuras peptídicas producen alteración en los estados de ordenación de las moléculas de la capa monomolecular lipídica.

4.5.1 Isotermas de compresión de un componente, sobre una subfase que contiene MAP₄VP1

La capacidad del péptido para interactuar con monocapas de lípidos puros se estudió en un modelo dinámico. Para ello se extendieron monocapas de los siguientes lípidos DPPC, PI, SA, DPPG, DPPE y CL, a una presión superficial inferior a 0.5 mN/m sobre una subfase de PBS a la cuál se adicionó una solución de péptido, siendo la concentración del mismo en la subfase de 0.28 μ M. Tras la compresión se calculó el área por molécula medida a 5, 10 y 20 mN/m, y también los mismos valores obtenidos en ausencia de péptido.

DPPC

En la figura 4.15 se muestra la influencia de la presencia del péptido en los valores del área por molécula de la isoterma de compresión de DPPC y en los estados de ordenación de la misma.

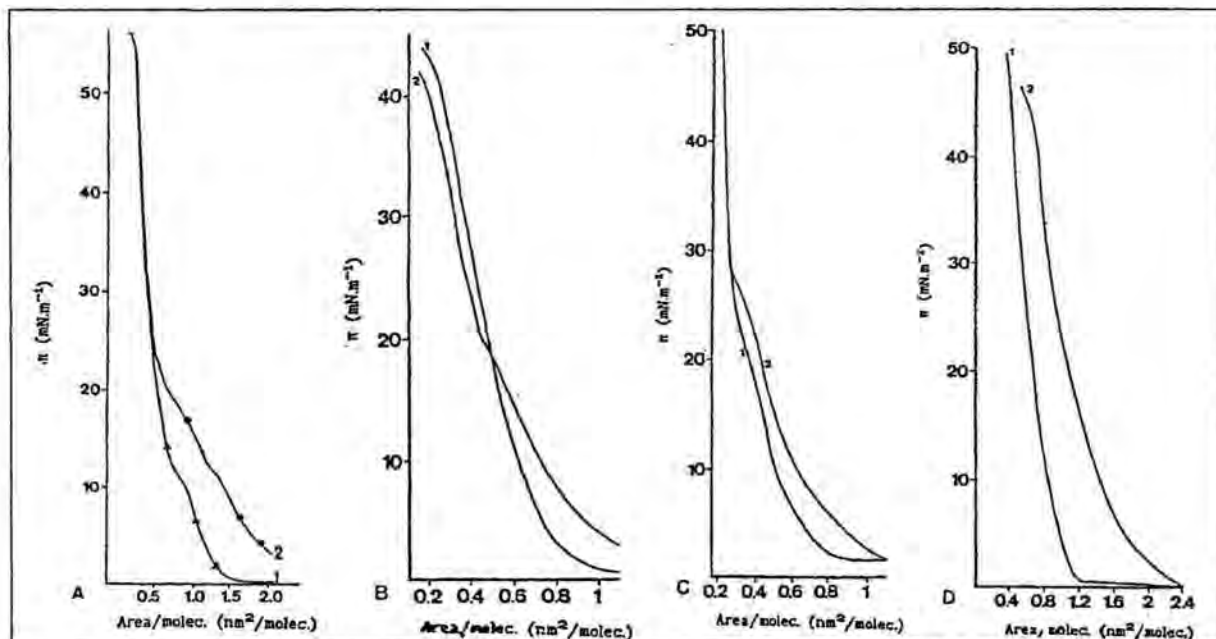


Figura 4.15 Isoterma de compresión del fosfolípido (a-DPPC; b-PI; c-SA; d-DPPG) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄VP1 0,28 μ M (2).

A baja presión el péptido es capaz de interactuar con la monocapa, induciendo una clara expansión de la misma. Pero al comprimir las diferencias se reducen considerablemente, no modificando la presión del colapso.

PI

En el caso del fosfatidilinositol, a baja presiones el péptido expansiona la monocapa de PI, mientras que a altas presiones la comprime. A partir de la presión superficial de 20 mN/m al comprimir la monocapa, la estructura peptídica es expulsada de la misma como ha sido observado por otros péptidos (Sospedra, 1999). La presencia del péptido no modifica la ordenación de los estados de las moléculas en la isoterma y tampoco afecta a la presión de colapso, tal como se observa en la figura 4.15.

SA

La presencia de MAP₄VP1 en la isoterma de compresión de estearilamina le induce una clara expansión a bajas presiones. En cambio, a altas presiones éste no la modifica. Los estados de ordenación de la molécula no varía a presión superficial elevada, pero a bajas presiones desaparece la fase líquido expandido. Desde un mínimo de presión superficial inicial, la molécula permanece en estado líquido condensado, como se observa en la figura 4.15.

DPPG

Cuando el fosfolípido estudiado fué el DPPG se observó que la presencia del péptido expansiona la monocapa a todas las presiones superficiales. También en este caso no se modifica el estado de ordenación de sus moléculas. La presión de colapso se alcanzó a presiones más bajas cuando MAP₄VP1 se encontraba en la subfase, tal como se muestra en la figura 4.15.

DPPE

La incorporación del péptido a la monocapa de DPPE origina una ligera expansión en la isoterma de compresión. Al igual que en el caso anterior tampoco se modifican los estados de ordenación de las moléculas, ver figura 4.16.

CL

Al observar la figura 4.16, la incorporación del péptido a la monocapa de cardiolipina practicamente no la modifica.

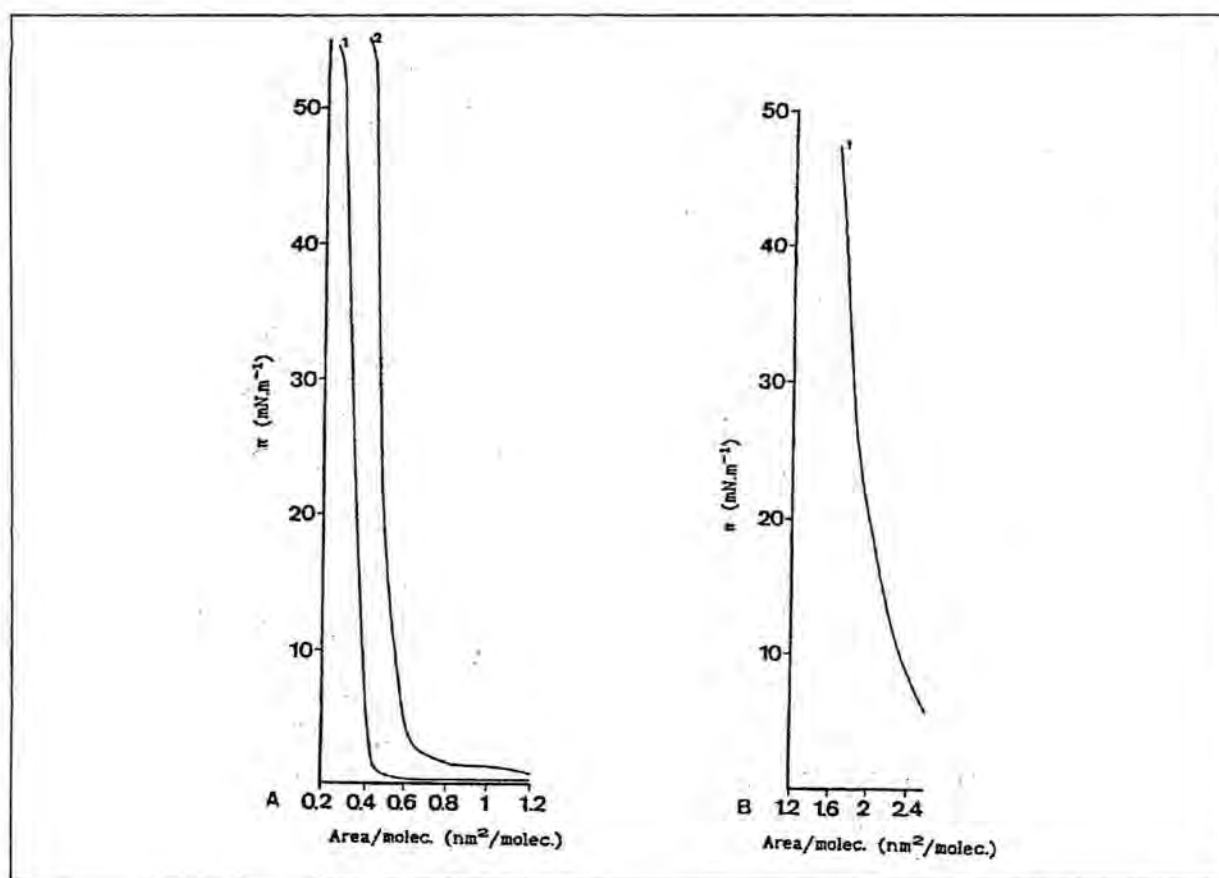


Figura 4.16 Isotherma de compresión de (a-DPPE; b-CL) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄VP1 0,28 μM (2).

En la tabla 4.9 se representan los Δπ superficial alcanzados por los distintos fosfolípidos estudiados a las presiones de 5, 10 y 20 mN/m.

Tabla 4.9 Incrementos del área en monocapas de fosfolípidos inducidos por la presencia de MAP₄VP1 en la subfase de PBS, medidos a diferentes presiones superficiales.

P (mN/m)	ΔArea/moléculax10 ² (nm ² /moléc.)					
	DPPC	DPPE	SA	DPPG	PI	CL
5	54.5	17.78	20	88.37	24	0
10	36.7	13.4	14.9	61.82	11.8	5.29
20	0	8.89	9.97	44	0	0

La cardiolipina ocupa más área pero al ser un fosfolípido doble, no se puede comparar con los otros.

La influencia del MAP₄VP1 en las isothermas de compresión nos viene más influenciado por los estados de ordenación de las moléculas a las diferentes presiones superficiales, que por la carga de los mismos.

A baja presión superficial, el péptido es capaz de insertarse en la monocapa induciendo una clara expansión. Esta resulta más evidente para los fosfolípidos DPPG y DPPC. Al ir comprimiendo la monocapa las diferencia en las isothermas debidas al péptido se reducen. A excepción de la DPPG, la cuál también a alta presión expande la monocapa.

4.5.2 Isothermas de compresión de dos componentes, sobre una subfase que contiene MAP₄VP1

DPPC-PI (9:1)

La presencia del péptido en la monocapa de DPPC-PI induce una ligera compresión a lo largo de todas las presiones superficiales estudiadas. Esta compresión es más marcada a la presión de 10 mN/m, dónde la disminución de área por molécula es de 0.3 nm²/ molécula, mientras que a 20 mN/m la reducción del área es de 0.15 nm²/ molécula. Por otra parte el péptido no influye en el estado de ordenación de las moléculas en la isoterma, como se aprecia en la figura 4.17.

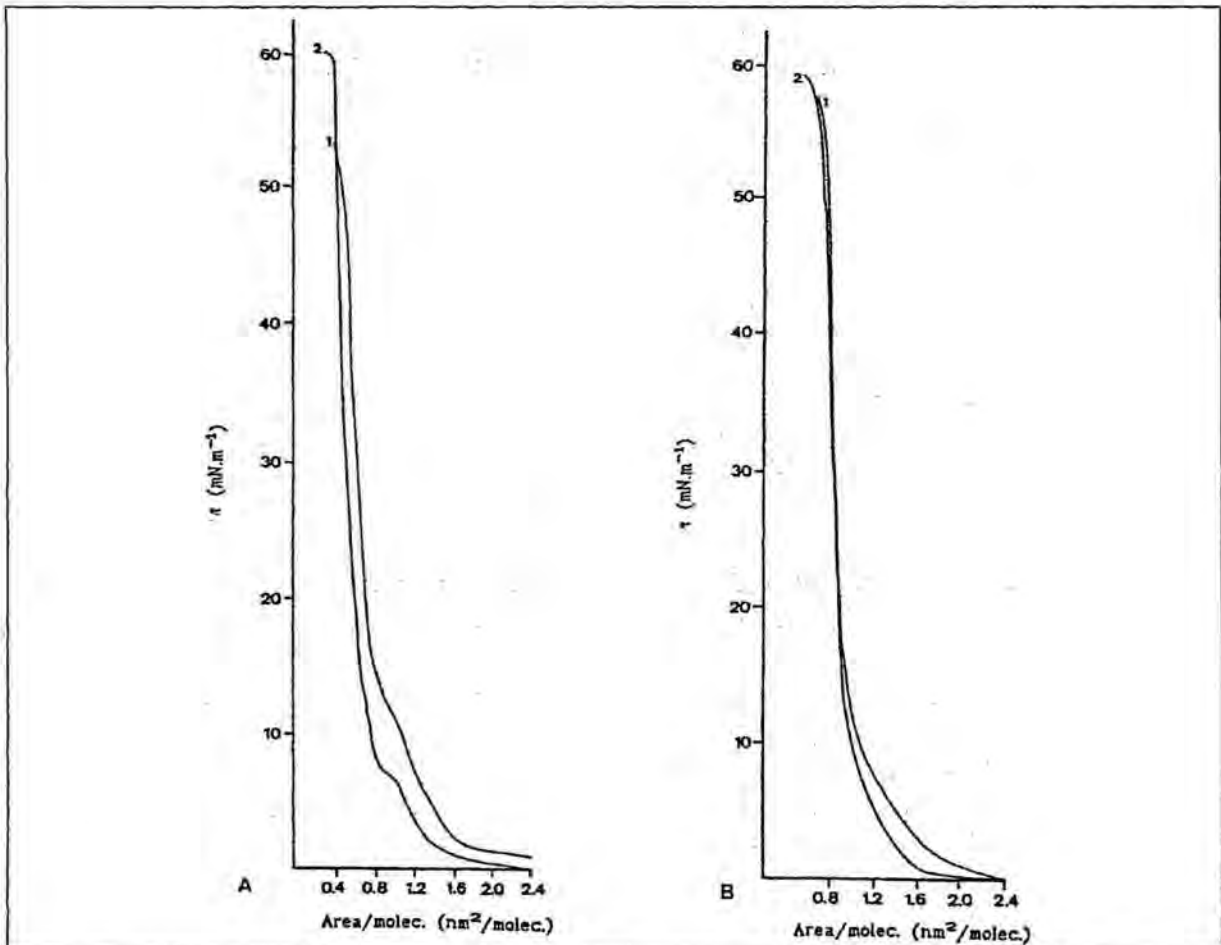


Figura 4.17 Isotherma de compresión de (a- DPPC-PI (9:1); b- DPPC-SA (9:1)) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄VP1 0,28 μ M (2).

DPPC-SA (9:1)

Al igual que en el caso anterior el MAP₄VP1 no modifica el estado de ordenación de las moléculas de la isoterma. A lo largo de las presiones superficiales estudiadas la presencia del péptido induce una ligera expansión (figura 4.17). La expansión producida por la incorporación del péptido en la monocapa es más marcada a la presión de 5 mN/m donde el incremento de área provocado es 0.2 nm²/ molécula. A partir de 20 mN/m la presencia del péptido no modifica el área y prácticamente mantiene la misma área hasta 50 mN/m de presión superficial. A presiones superiores hasta alcanzar el colapso exhibe una ligera reducción del área que podría ser debida a la expulsión del péptido de la monocapa.

4.5.3 Interacción del MAP₄VP1 con monocapas de dos componentes. Isotermas de compresión de monocapas mixtas.

4.5.3.1 DPPC-DPPG subfase PBS y subfase PBS adicionando MAP₄VP1

Se realizaron las isotermas de compresión de monocapas simples de DPPC, DPPG y de las monocapas mixtas obtenidas al mezclar diferentes fracciones molares de los mismos, tanto en subfase PBS como en subfase PBS a la cual se adicionó 0.28 μM de MAP₄VP1.

En la figura 4.18a se representan las isotermas obtenidas al extender 1.19 10¹⁶ moléculas de la serie de soluciones lipídicas sobre subfase PBS. Como puede observarse en la figura, las monocapas mixtas muestran un carácter intermedio al de las monocapas que las originaron. Debe destacarse el hecho experimental que la presencia de DPPG haga desaparecer la meseta de transición (o fase) de la DPPC cuando la fracción molar es 0.2 de DPPG.

Para interpretar las interacciones lípido-lípido en monocapa se utilizaron las desviaciones respecto a una mezcla ideal, representando las áreas por moléculas a diferentes π superficiales frente a las fracciones molares de los componentes. En la figura 4.19a se representan los valores de las áreas moleculares, obtenidos a las presiones superficiales de 5, 10 y 20 mN/m para las diferentes fracciones molares DPPC-DPPG en subfase PBS. No se observa prácticamente desviaciones de la linealidad.

Las isotermas obtenidas sobre subfase adicionada de péptido se muestran en la figura 4.18b. Se observa en las isotermas de composición mixtas un carácter intermedio al de las isotermas que las originaron. Los estados de ordenación de las moléculas para las diferentes composiciones son similares, por tanto la presencia del péptido no las modifica. Pero produce una expansión en todos los casos y una modificación de la presión de la transición que la aumenta cuando la monocapa es la DPPC. Sólo presentan presión de colapso las isotermas de los componentes puros. Las isotermas de compresión en subfase PBS adicionada del péptido muestran una expansión más acusada que en subfase PBS.

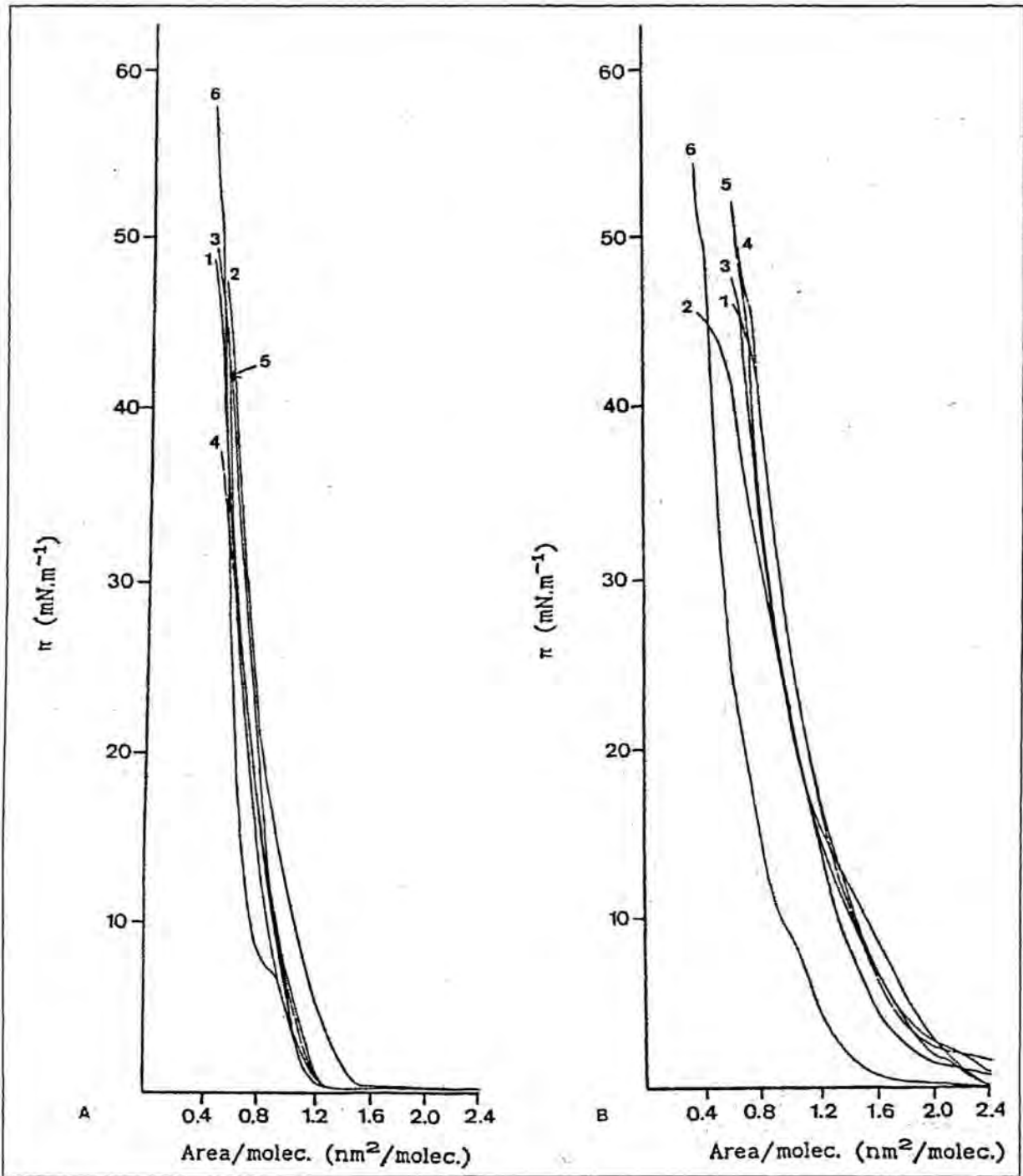


Figura 4.18 Isothermas de compresión de monocapas mixtas DPPC-DPPG a diferentes fracciones molares 1- DPPG; 2- DPPC-DPPG (0.2:0.8); 3- DPPC-DPPG (0.4:0.6); 4- DPPC-DPPG (0.6:0.4); 5- DPPC-DPPG (0.8:0.2); 6- DPPC; a- subfase PBS y b- subfase PBS+MAP₄VP1.

La influencia de la composición de la monocapa, sobre los valores de las áreas moleculares medidos a diferentes presiones superficiales se representa en la figura 4.19b. Las desviaciones de la linealidad a todas las presiones estudiadas fueron positivas. El mayor Δ área($\text{nm}^2/\text{molec.}$) fué para la fracción molar 0.2 DPPG, después se incremento gradualmente.

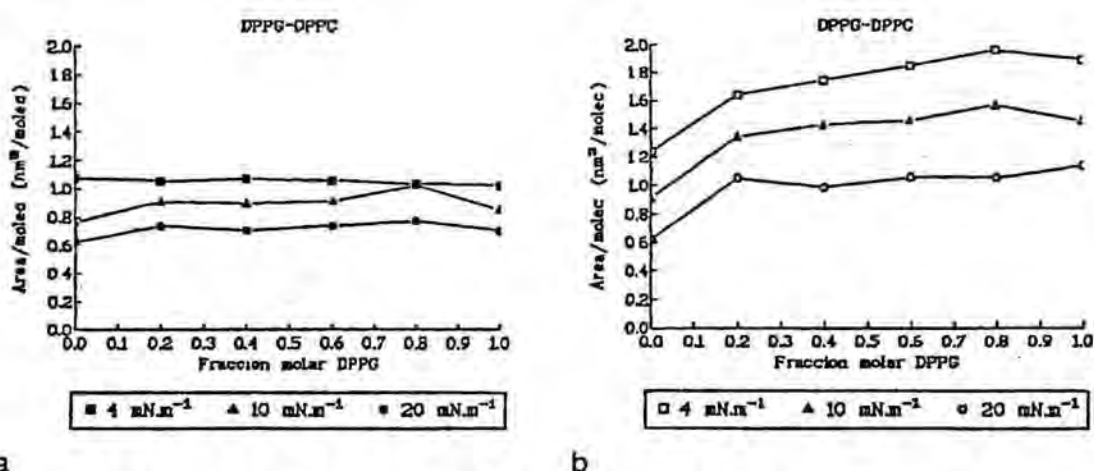


Figura 4.19 Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-DPPG (a-subfase PBS; b-subfase PBS+ MAP₄VP1)

Las monocapas mixtas de DPPC-DPPG extendidas sobre PBS no presentan colapso, de manera que no es posible calcular el número de coordinación Z ni la energía de interacción (ΔH).

Cálculos termodinámicos

Para evaluar los efectos de esta interacción se realizaron los cálculos termodinámicos. Para ello se calcularon las energías libres de exceso de las mezclas (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH), el parámetro de interacción (α) y el número de coordinación (Z) a las presiones de 10 y 20 mN/m.

Las energías de exceso de las mezclas (ΔG_M^{Ex}) calculadas son pequeñas. Las mayores desviaciones de la idealidad representan valores de energías libre de exceso menores que RT (2474 J/mol a 25°C).

Tabla 4.10 Energías libres de exceso de las mezclas (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH), el parámetro de interacción (α) y el número de coordinación (Z) de la mezcla DPPC-DPPG, a 10 y 20 mN/m de presión superficial.

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	Z	ΔH (J/mol)
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	864.51	2.21	-	-
0.4	691.58	1.18	-	-
0.6	680.75	1.16	-	-
0.8	1970.16	5.04	-	-
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	3388.22	8.66	2	10588.2

0.4	2574.13	4.39	2	5362.77
0.6	2504.10	4.27	2	5216.72
0.8	1689.64	4.32	2	5280.13
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	181.66	0.46	-	-
0.4	221.08	0.38	-	-
0.6	216.73	0.37	-	-
0.8	1144.86	2.93	-	-
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	1422.66	8.66	2	4445.76
0.4	1313.48	2.24	2	2736.39
0.6	1488.58	2.54	2	3101.22
0.8	1094.57	2.8	2	3420.57

A partir de los datos de la tabla 4.10 se observa, que sobre subfase PBS el comportamiento es ideal, ya que el ΔG_M^{Ex} es $< RT$. Pero en subfase PBS a la cuál se adicionó el péptido este valor es ligeramente superior y positivo, debido a la incorporación de las moléculas de MAP₄VP1 a la monocapa. Estos valores de desviación positivos sólo se dan a la presión superficial de 20 mN/m y para fracciones molares bajas (0.2 y 0.4). Entonces en el sistema ternario se establecerán repulsiones entre las moléculas que lo constituyen, dado que tanto el lípido como el péptido tienen cargas eléctricas negativas. Así, en subfase PBS adicionada del péptido se encuentran las isotermas más expansionadas.

4.5.3.2 DPPC-DPPE subfase PBS y subfase PBS adicionado MAP₄VP1

Se realizaron las isotermas de compresión de monocapas simples de DPPC y DPPE, y las isotermas correspondientes a las diferentes fracciones molares de los mismos, en subfase PBS y también, en subfase PBS a la cuál se adicionó 0.28 μ M de péptido.

En la figura 4.20a se representan las isotermas obtenidas al extender $4.35 \cdot 10^{16}$ moléculas de las distintas fracciones molares en la subfase PBS. Como puede observarse, el comportamiento de los estados de ordenación de las mismas a bajas presiones pasan de líquido expandido a líquido condensado, y altas presiones están en estado sólido, alcanzándose la presión de colapso tanto para los componentes puros como para sus mezclas.

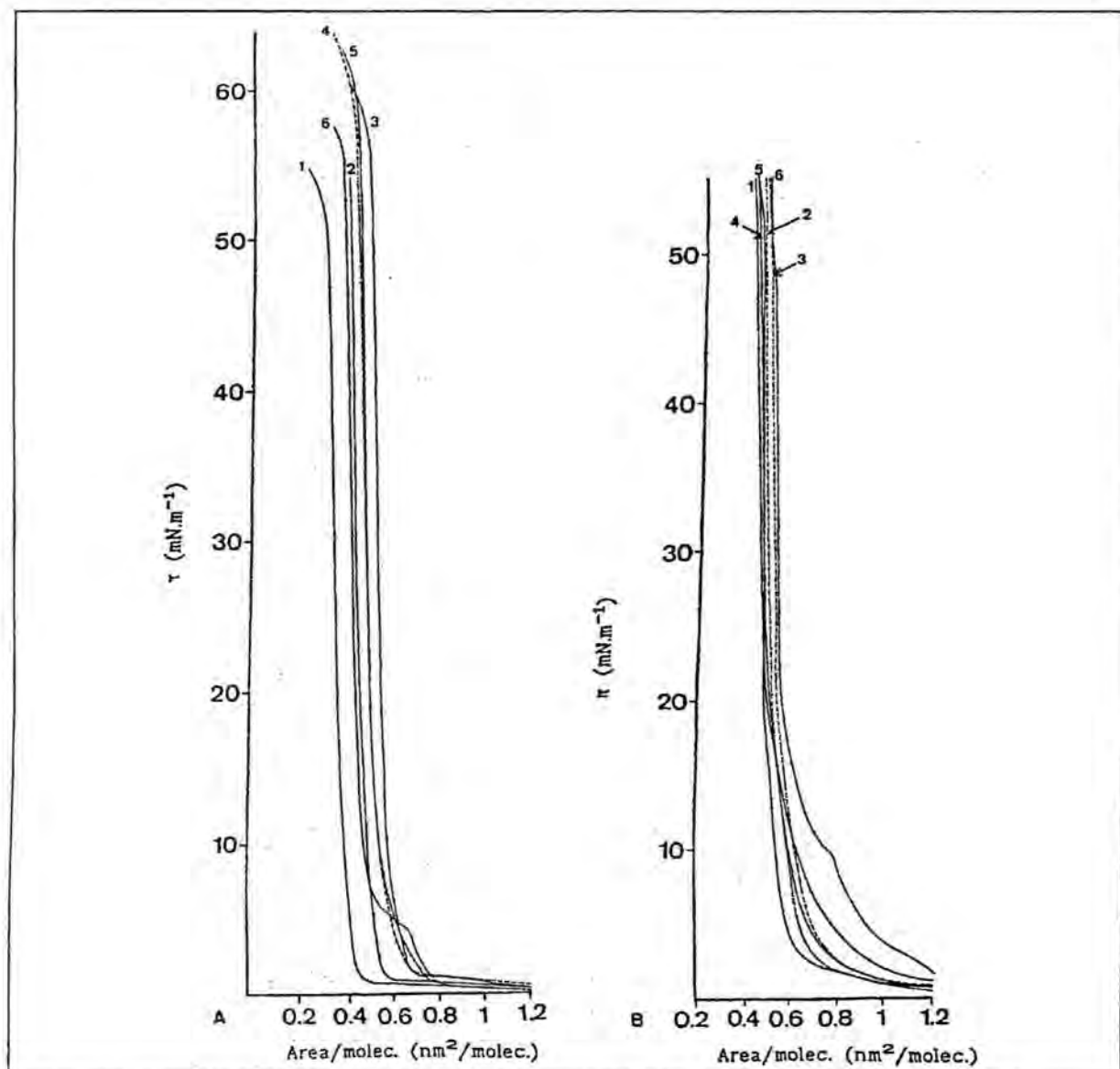


Figura 4.20 Isothermas de compresión de monocapas mixtas DPPC-DPPE a diferentes fracciones molares 1- DPPE; 2- DPPC-DPPE (0.2:0.8); 3- DPPC-DPPE (0.4:0.6); 4- DPPC-DPPE (0.6:0.4); 5- DPPC-DPPE (0.8:0.2); 6- DPPC; a- subfase PBS y b- subfase PBS+MAP₄VP1.

Para interpretar las interacciones de dichas mezclas se representaron las áreas moleculares a las presiones iniciales superficiales de 5, 10 y 20 mN/m frente a su fracción molar. En la figura 4.21a se observaron para todas ellas ligeras desviaciones respecto a la idealidad. A 5 mN/m la desviación fue más acusada.

Cuando se adicionó a la subfase el péptido se obtuvieron las isothermas de compresión de la figura 4.20b. No cambian los estados de ordenación de las moléculas, sí bien se encuentran mucho más expandidas y a bajas presiones presentan presión superficial inicial. La fase de transición de la DPPC aparece a presiones superficiales más elevadas.

La influencia de la composición de la monocapa sobre los valores de las áreas a las presiones superficiales estudiadas se representaron en la figura 4.21b. Se observan desviaciones negativas de la idealidad, a las presiones de 5 y 10 mN/m éstas son marcadas, cuando la fracción molar de $X_{\text{DPPE}} < 0.6$. En cambio a 20 mN/m , el comportamiento fue

similar al observado en subfase PBS, puesto que a $X_{\text{DPPE}} > 0.6$ la desviación de la regla de la aditividad es positiva.

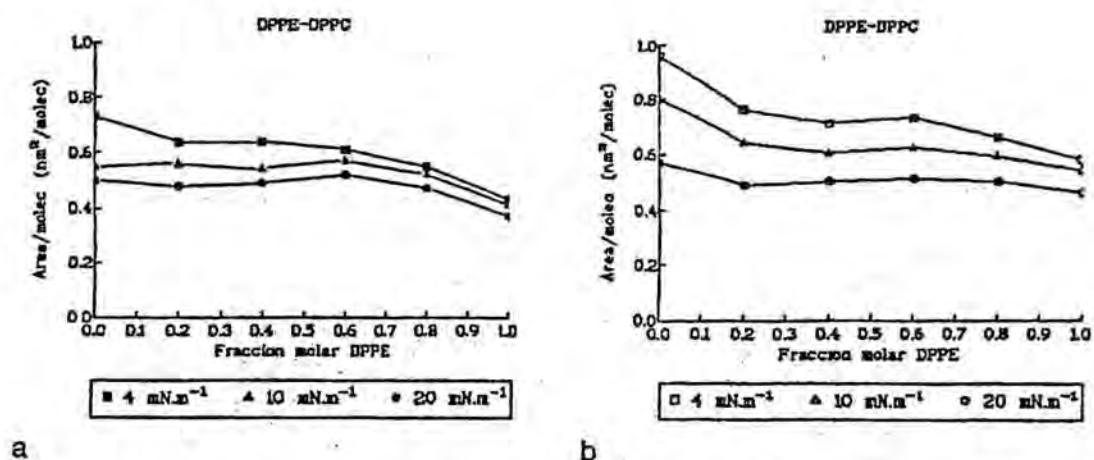


Figura 4.21 Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-DPPE (a-subfase PBS; b-subfase PBS+ MAP₄VP1)

Para evaluar mejor estos resultados se realizaron los cálculos termodinámicos (tabla 4.11).

Cálculos termodinámicos

A todas las presiones estudiadas los ΔG_M^{Ex} en subfase PBS fueron $< RT$ y positivos, por lo tanto siguen un comportamiento ideal. Ahora bien, al incorporar péptido a la subfase éstos resultaron ser negativos, tanto a la presión de 10 mN/m como a la presión de 20 mN/m, pero no son significativos ya que también son $< RT$. Al considerar la subfase de PBS las monocapas se encuentran ligeramente expandidas, al contrario la presencia del péptido en la subfase provoca un ligero efecto condensante.

Tabla 4.11 Energías libres de exceso de las mezclas (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH), el parámetro de interacción (α) y el número de coordinación (Z) de la mezcla DPPC-DPPE, a 10 y 20 mN/m de presión superficial.

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	Z	ΔH (J/mol)
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	34.15	0.09	4	53.38
0.4	159.17	0.27	4	165.78
0.6	407.04	0.69	4	424.01
0.8	312.96	0.80	4	489.18
subfase PBS + 0.28 μM sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				

0.2	-555.56	-1.42	4	-1736.07
0.4	-618.59	-1.05	4	-644.38
0.6	-71.94	-0.12	2	-149.81
0.8	-65.33	-0.12	4	-102.07
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	97.52	0.25	4	152.40
0.4	422.26	0.72	4	439.86
0.6	1016.07	1.73	4	1058.29
0.8	796.49	2.04	4	1244.55
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	-926.20	-2.37	4	-1447.19
0.4	-923.36	-1.57	4	-961.81
0.6	10.32	0.02	4	10.74
0.8	-19.64	-0.05	4	-29.47

4.5.3.3 DPPC-CL subfase PBS y subfase PBS adiconando MAP₄VP1

Las isotermas de compresión se obtuvieron al extender $1.95 \cdot 10^{16}$ moléculas de las diferentes fracciones molares de DPPC-CL y de los componentes puros. En subfase PBS, los estados de ordenación pasan de estado líquido expandido a líquido condensado, alcanzándose la π de colapso sin pasar por estado sólido. La π de transición para DPPC desaparece cuando la fracción molar de cardiolipina vale 0.2. La isoterma de compresión tanto de la CL pura como de la fracción molar 0.8 de CL presentan actividad superficial inicial de 2.16 y 1.92 mN/m respectivamente. Para la CL pura desaparece la fase líquido expandido y en todo el trazado el estado de ordenación de las moléculas es líquido condensado, con una π de colapso 47.5 mN/m.

En las isotermas de compresión sobre subfase adicionada con el péptido, los estados de ordenación no cambian y hay una actividad superficial a las fracciones de CL 0.6 (0.96mN/m), 0.8 (1.92mN/m), 1 (5.76mN/m). La presión de colapso es de 47.0 mN/m.

La influencia de la composición de la monocapas sobre los valores de las áreas moleculares se representaron en la figura 4.22. Las desviaciones de la idealidad son positivas para cada una de las presiones superficiales estudiadas (excepto para la fracción molar 0.6 CL), tanto en subfase PBS como en subfase PBS a la cuál se adicionó el péptido. En subfase PBS a 5 mN/m la desviación fue más acusada. La incorporación del péptido a la subfase origina un incremento del área por molécula a las presiones superficiales estudiadas. De todos modos, el incremento no es significativo, porque al evaluar los

valores mediante los cálculos termodinámicos, éstos se encuentran dentro de los valores admitidos como ideales.

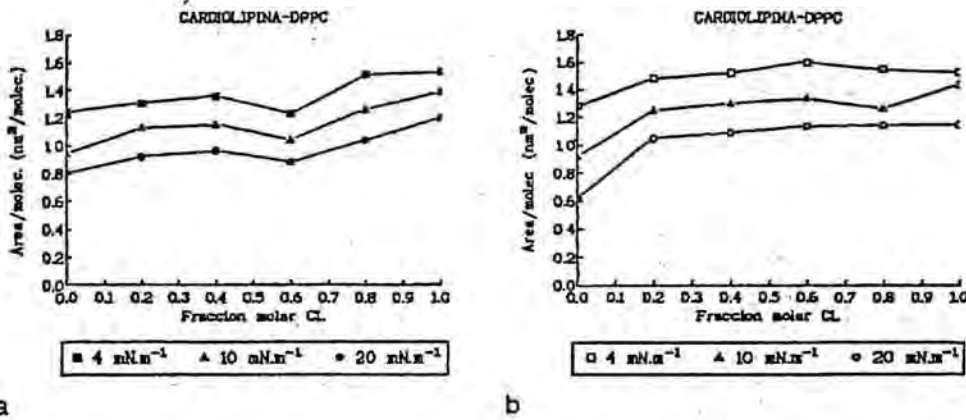


Figura 4.22 Variación del área molecular media (a 5, 10 y 20 mN/m) frente a la composición, para monocapas mixtas DPPC-CL (a-subfase PBS; b-subfase PBS+ MAP₄VP1)

La presencia de la estructura peptídica en la subfase origina un efecto expansionante en las diferentes monocapas mixtas, más marcado a bajas presiones superficiales.

Cálculos termodinámicos

Al realizar los cálculos termodinámicos que se resumen en la tabla 4.12 observamos que tanto las energías libres de exceso de las mezclas, como las energías de interacción son valores $<RT$, cuando en la subfase está presente el péptido. Así, la miscibilidad es ideal pero la máxima interacción se muestra para la fracción molar 0.2 CL que no sigue el comportamiento ideal.

Tabla 4.12 Energías libres de exceso de las mezclas (ΔG_M^{Ex}), la energía de interacción (ΔH), el parámetro de interacción (α) y el número de coordinación (Z) de la mezcla DPPC-CL, a 10 y 20 mN/m de presión superficial

Fracción molar de DPPG	ΔG_M^{Ex} (J/mol)	α	Z	ΔH (J/mol)
10 mN/m				
subfase PBS				
0.2	387.655	0.99	2	1211.36
0.4	305.76	0.52	2	637.03
0.6	-859.53	-1.46	2	-1790.71
0.8	120.51	0.31	2	379.96
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	1063.05	2.62	2	3204.54

0.4	847.07	1.44	4	882.35
0.6	950.36	1.62	2	1979.98
0.8	148.39	0.38	2	231.90
20 mN/m				
subfase PBS				
0.2	801.76	2.05	2	2505.49
0.4	207.07	0.35	2	431.37
0.6	-1916.53	-3.27	2	-3992.73
0.8	-308.90	-0.79	2	-965.33
subfase PBS + 0.28 μ M sol. peptídica (MAP ₄ VP1)				
0.2	2633.81	6.73	2	8230.43
0.4	2164.11	3.69	4	2254.27
0.6	2029.09	3.46	4	2113.66
0.8	398.89	1.02	4	623.28

Los valores de ΔG_M^{Ex} fueron $< RT$ tanto a 10 como a 20 mN/m, pero en presencia del péptido estos fueron más elevados.

4.5.4 Isotermas de compresión de dos componentes, sobre una subfase que contiene MAP₄VP3

La incorporación del péptido MAP₄VP3 a monocapas de mezclas lipídicas se determinó previamente, en un modelo dinámico (Signor, 1994). Para ello se extendieron monocapas de los componentes lipídicos siguientes: zwitteriónico DPPC, aniónico DPPC-PI (9:1) y catiónico DPPC-SA (9:1), sobre una subfase acuosa de solución amortiguadora de PBS. A continuación se repitió la misma operación pero extendiendo las monocapas de diferente carga eléctrica sobre una solución péptido/solución de PBS que contenía una concentración de péptido 0.219 μ M (concentración ligeramente inferior a la saturación calculada a partir de los estudios de la actividad superficial). Tras la compresión se calculó el área por molécula medida a 5, 10 y 20 mN/m, y también los mismos valores obtenidos en ausencia de péptido.

DPPC

En la figura 4.23 A se muestra la influencia de la presencia del péptido en los valores del área por molécula de la isoterma de compresión de DPPC.

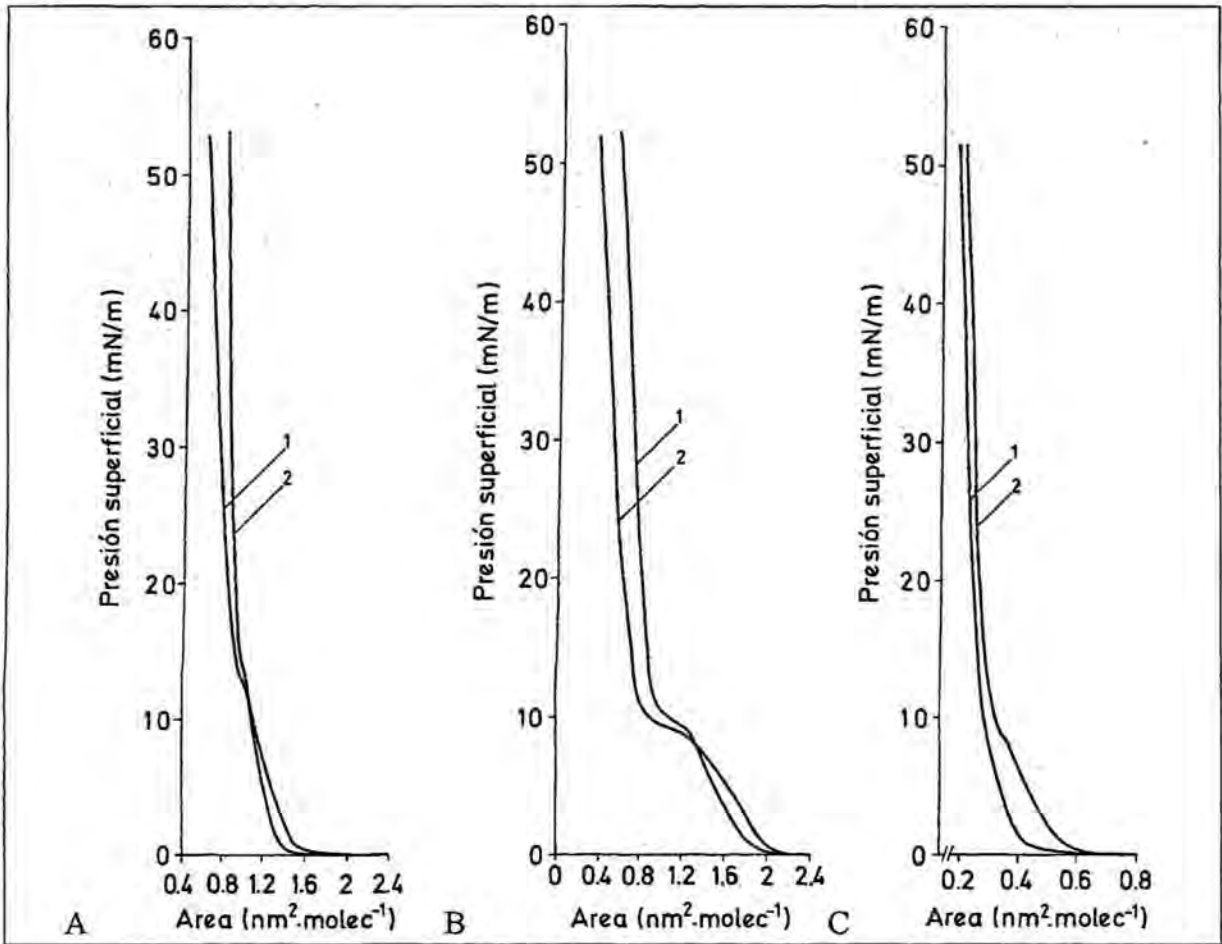


figura 4.23 Isothermas de compresión de (a-DPPC; b-DPPC-PI (9:1); c-DPPC-SA (9:1)) extendida sobre PBS (1) o sobre una solución de MAP₄ VP3 0.22 μ M.

A baja presión el péptido es capaz de interactuar con la monocapa induciendo una contracción de la misma. La reducción del área provocada por la presencia del péptido es de $0.21 \text{ nm}^2/\text{molécula}$. Pero al ir comprimiendo la monocapa en presencia de la estructura peptídica el cambio de fase tiene lugar a una presión ligeramente superior a 11 mN/m . Al seguir con la compresión ésta se muestra más expandida, es decir que la incorporación del péptido en la monocapa de DPPC origina una expansión de la isoterma. La cuál se traduce con un incremento de área $0.13 \text{ nm}^2/\text{molécula}$. Por otra parte, el MAP₄VP3 al incorporarse a la monocapa no varía los estados de ordenación de las moléculas.

DPPC-PI (9:1)

La presencia del péptido en la monocapa de DPPC-PI no influye en el estado de ordenación de las moléculas (figura 4.23 B). A bajas presiones induce una expansión clara en los valores de las áreas de la monocapa del orden de $0.26 \text{ nm}^2/\text{molécula}$. A presiones superficiales elevadas se origina una reducción de las áreas ($0.20 \text{ nm}^2/\text{molécula}$) que es indicativo de la pérdida de las moléculas del péptido. A partir del cambio de fase de líquido expandido a líquido condensado la estructura peptídica ya no se encuentra formando parte de la monocapa.

DPPC-SA (9:1)

En la figura 4.23 C se observa la isoterma de compresión de DPPC-SA(9:1) extendida sobre una subfase de PBS y la misma sobre una subfase de PBS adicionada de péptido. A lo largo de las presiones estudiadas la presencia del péptido en la monocapa induce expansión más marcada a baja presiones superficiales. La cuál se corresponde con un incremento de área de $0.12 \text{ nm}^2/\text{molécula}$, $0.1 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ y $0.02 \text{ nm}^2/\text{molécula}$ respectivamente para las presiones superficial de 5, 10 y 20 mN/m. El MAP₄VP3 al incorporarse a la monocapa de carácter catiónico provoca un ligero cambio de fase de LE a LC cuando la presión superficial es de 9 mN/m. Además, dicha transición entre fases no se observa en la monocapa extendida sobre una subfase de PBS. Por tanto, el péptido varía el estado de ordenación de las moléculas.

IV INTERACCION DE LOS PEPTIDOS CON BICAPAS LIPIDICAS (LIPOSOMAS)

A partir de los estudios de miscibilidad entre los diferentes tipos de lípidos y ácidos grasos escogidos (sección I) se observa que la interacción entre dichos componentes tiene asociada una energía muy baja determinada por cálculos termodinámicos. Ello nos ha permitido seleccionar tres composiciones lipídicas para estudiar su interacción, como monocapas lipídicas, con estructuras peptídicas basadas en las proteínas VP1 y VP3 del VHA. Posteriormente, estos estudios preliminares han sido ampliados con la utilización de las mismas mezclas, para la formación de bicapas lipídicas (liposomas), utilizándose liposomas unilaminares.

Los liposomas son estructuras vesiculares que incluyen un espacio acuoso interno separado del medio exterior por una o varias bicapas de moléculas lipídicas, generalmente fosfolípidos. En este estudio, liposomas unilaminares pequeños (SUVs), es decir formados por una única bicapa de fosfolípidos, se utilizarán como modelo de membrana. La curvatura de la membrana puede ejercer una importante influencia en la interacción con péptidos bioactivos, por ello se prepararán liposomas SUVs por sonicación en un baño de ultrasonidos.

La interacción de las secuencias peptídicas con bicapas se puede abordar de varias maneras. Por un lado, se pueden determinar cambios conformacionales provocados por los lípidos en los péptidos, mientras que por otro lado se pueden estudiar los cambios en la ordenación de los lípidos producidos por la presencia de péptidos.

5. INTERACCION DE MAP₄VP3 (110-121) CON BICAPAS LIPIDICAS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Al utilizar una serie de técnicas espectroscópicas se persigue el objetivo de determinar por un lado la unión de los péptidos a las membranas y por otro su efecto en las propiedades fisicoquímicas de las mismas.

En la interacción lípido-péptido no solo se producen cambios en la estructura de los péptidos como consecuencia de la interacción con la membrana lipídica, sino que dichos cambios van muchas veces acompañados por alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de la membrana, como pueden ser los cambios de fluidez, la temperatura de transición de fase, la permeabilidad, la fusión, etc.

Al interaccionar con la membrana los péptidos bioactivos adoptan la conformación activa y en el caso de antígenos la conformación capaz de unirse a los anticuerpos.

5.1 FLUORESCENCIA INTRINSECA DEL TRIPTOFANO

Los estudios basados en los cambios de las propiedades de emisión de fluorescencia de ciertos residuos de aminoácidos de los péptidos, como consecuencia de la interacción de los mismos con las bicapas lipídicas son una herramienta válida para estudiar las interacciones entre péptidos y lípidos de la membrana (Bentley, 1985; Pécheur, 1999)

La fluorescencia de péptidos y proteínas viene determinada fundamentalmente por tres fluoróforos naturales, que son aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano, siendo éste último el de mayor rendimiento cuántico. En nuestro caso el péptido MAP₄VP3 presenta un residuo de triptófano en su estructura primaria. Por este motivo, al estudiar la interacción entre el péptido y los diferentes tipos de liposomas, se analizan las variaciones de fluorescencia de este aminoácido (Trp), tal como se describe en el apartado 3.2.1 de materiales y métodos. La fluorescencia del triptófano varía en función de la polaridad del entorno, permitiendo de este modo determinar si existe algún tipo de interacción con la bicapa lipídica (Cajal, 1995). De manera que cambios en la intensidad de fluorescencia y en el máximo de emisión nos dará información de la inserción del péptido en la bicapa.

Los estudios de fluorescencia se realizan añadiendo concentraciones crecientes de liposomas de la composición deseada a una disolución de péptido (7 μ M) en solución amortiguadora, registrando el espectro de emisión de fluorescencia de triptófano (excitación 285 nm); controles para corregir la intensidad de fluorescencia de la contribución de la turbidez de la muestra y del efecto del filtro interno se realizaron como esta descrito en el apartado de materiales y métodos 3.2.1. A partir de las curvas obtenidas al representar la variación del máximo de intensidad de fluorescencia respecto a la relación lípido/péptido, por ajuste matemático, se pueden calcular las constantes de afinidad de la unión (Kd).

El residuo de triptófano en entornos altamente polares presenta un máximo de emisión alrededor de 345 nm, mientras que cuando el entorno es extremadamente hidrófobo el máximo se desplaza hasta 310 nm. (Burstein, 1973). La estructura peptídica MAP₄VP3, tiene 4 secuencias iguales donde hay un residuo de triptófano con un máximo de emisión a 355 nm al ser excitada la muestra a 285 nm. Todo ello indica que los residuos de triptófano están muy expuestos a la solución tamponada, sugiriendo que el péptido no presenta una estructura secundaria ordenada en solución.

En la figura 5.1 se observa el máximo de emisión de fluorescencia se desplaza hacia menores longitudes de onda al unirse a los tres tipos de liposomas. Al considerar una relación molar lípido-péptido 45:1 observamos como el máximo de emisión para los liposomas de DPPC es 344 nm, para los liposomas de DPPC-SA es de 347 nm y finalmente para los liposomas de DPPC-PI es de 349 nm, un valor similar ha sido observado para el péptido EBO-GE del virus del ébola con liposomas de PC-PI (Ruiz-argüello, 1998). Todo ello es indicativo de cierto grado de inserción del péptido en el interior de la bicapa.

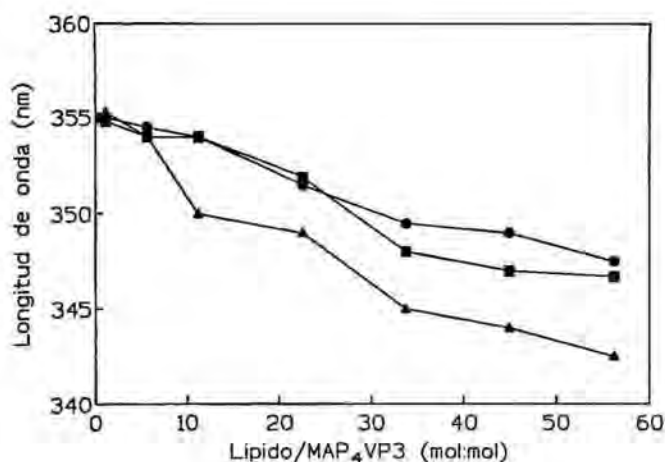


Figura 5.1 Variación en el máximo de la longitud de onda de emisión del triptófano del MAP₄VP3 en presencia de liposomas SUVs de (▲)DPPC, (■)DPPC-SA(9.5:0.5) y (●)DPPC-PI (9:1) en función de la relación molar lípido/péptido. Los experimentos se llevaron a cabo en una solución de Tris 10 mM a pH 7.4 y a 20 °C. La concentración peptídica es de 7 μM. La longitud de onda de excitación es de 285 nm.

El cambio en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 340 nm a diferentes relaciones molares lípido-péptido se muestra en la figura 5.2. Todos los resultados han sido corregidos según se indica en Materiales y Métodos. En el caso de liposomas de DPPC se dan resultados hasta la relación molar lípido-péptido de 45:1, puesto que a concentraciones mayores de lípido la contribución del efecto del filtro interno es muy importante. La unión del péptido a las vesículas zwitteriónicas y catiónicas origina un incremento en la intensidad de fluorescencia al igual que los péptidos VP3-RGD y VP3-RGA con los liposomas catiónicos a pH neutro (Chávez, 2001). Ahora bien para los liposomas de DPPC-PI su unión con el péptido no representa ninguna variación en la intensidad de fluorescencia del triptófano.

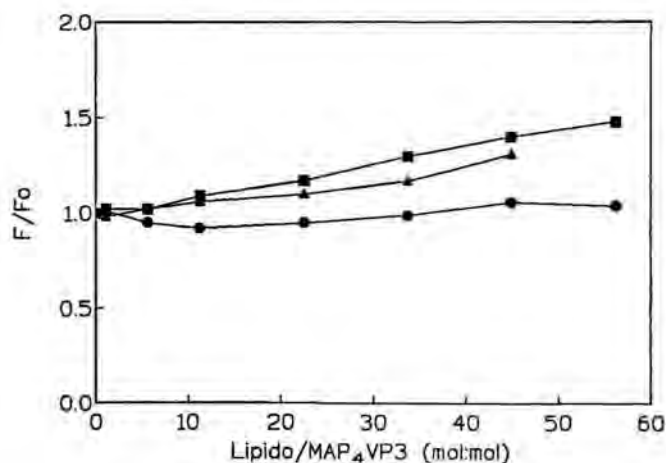


Figura 5.2 Variación en la intensidad de fluorescencia del triptófano del MAP₄VP3 en presencia de liposomas SUVs de (▲)DPPC, (■)DPPC-SA(9.5:0.5) y (●)DPPC-PI (9:1) en función de la relación molar lípido/péptido. Los experimentos se llevaron a cabo en una solución de Tris 10 mM a pH 7.4 y a 20 °C. La concentración peptídica es de 7 μM. La longitud de onda de excitación es de 285 nm.

El péptido se une a los tres tipos de liposomas. Al unirse a liposomas aniónicos y neutros nos indica que existe un componente no electrostático en dicha interacción, ya que si la unión del péptido en la interfase fuese únicamente de naturaleza electrostática, dado el carácter aniónico de MAP₄VP3 no se produciría penetración en las membranas con DPPC y DPPC/PI (9:1).

5.2 ESTEQUIOMETRIA DE UNION LIPIDO-PEPTIDO

La técnica de transferencia de energía por resonancia (T.E.R), utilizando el grupo triptófano en el péptido como dador de fluorescencia y el grupo NBD en la membrana como aceptor (Jain, 1986) se utilizará para calcular la estequiometría de la unión lípido/péptido. Para ello se prepararán liposomas con un 2 % de fosfatidiletanolamina derivatizada con NBD en su cabeza polar (NBD-PE) y se diluirán en solución amortiguadora de Tris hasta una concentración aproximada de 30 μM. A continuación se añadirán cantidades crecientes de péptido (excitación para Trp 285 nm, emisión para NBD 535nm) hasta alcanzar la saturación.

La evidencia de la unión del péptido a las vesículas resulta del seguimiento de la transferencia de energía resonante entre el donador el triptófano del péptido y el aceptor un NBD-Liposoma cuando la distancia entre ellos es de 15 Å o menor (Cajal, 1998by Mosmuller, 1994).

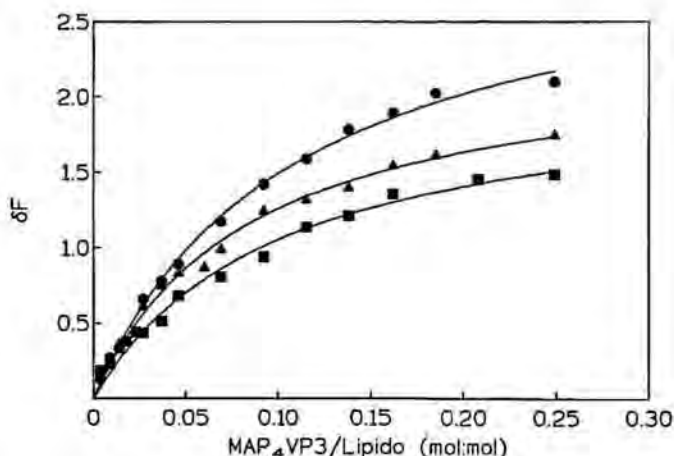


Figura 5.3 Variación de la intensidad de fluorescencia seguido por TER, entre el triptófano del péptido y las vesículas que contienen un 2% de marcador NBD-PE. Emisión a 535 nm, excitación 285 nm. La composición lipídica de las vesículas es (\blacktriangle) DPPC, (\blacksquare) DPPC-SA (9.5:0.5) y (\bullet) DPPC-PI (9:1). Los experimentos se llevaron a cabo en una solución de Tris 10 mM a pH 7.4 y a 20 °C

En la figura 5.3 se muestra la variación de intensidad de fluorescencia por TER a 535 nm respecto a la relación molar péptido/lípido. Al aumentar la cantidad de péptido se incrementa la intensidad de fluorescencia hasta alcanzar un máximo cuando la cantidad de péptido recubre al completo la superficie del liposoma. La estequiometría del proceso se calcula a partir de las gráficas, como el cruce entre la línea definida por los puntos a baja concentración y la línea definida por los puntos a alta concentración donde alcanzan la saturación. Para los liposomas de DPPC, se calcula una estequiometría de 14 moléculas de DPPC por péptido. En los casos de DPPC-SA y DPPC-PI son 16 y 17 moléculas de lípido por péptido, respectivamente. Como conclusión podemos decir que se obtiene la misma estequiometría de unión para los tres liposomas y que es independiente de su carga neta.

5.3 CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA DETERMINADOS POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

La inserción de moléculas en las bicapas lipídicas puede producir cambios en el empaquetamiento de los fosfolípidos que la forman. Este fenómeno puede afectar a la microviscosidad del medio y alterar en consecuencia el movimiento lateral de otras moléculas presentes en las bicapas. Las sondas fluorescentes son unos buenos indicadores de la aparición de estas alteraciones ya que los cambios detectados en la polarización de su fluorescencia reflejan la interacción de otras moléculas con los lípidos constituyentes de la membrana. Si la polarización aumenta significa que el entorno del marcador se ha hecho más rígido y en caso contrario, la alteración sufrida por la bicapa es una fluidificación. Existen varios tipos de sondas fluorescentes cuya polarización de fluorescencia es sensible a la viscosidad del medio, empleándose en estos estudios ANS y DPH.

Los estudios de polarización de fluorescencia utilizando dos marcadores (DPH y ANS) sirven para determinar si los péptidos inducen cambios en la movilidad lateral de los lípidos de la membrana. Estos marcadores se localizan en partes diferentes de la bicapa, concretamente el DPH debido a su carácter hidrófobo, se acumula en la parte interna e hidrofóba, mientras que el ANS se sitúa en la parte más externa, en la zona hidrófila determinada por los grupos polares de los fosfolípidos (Fernandez, 1998). Cambios en la polarización de fluorescencia de estos marcadores reflejan directamente cambios en la fluidez de las bicapas en la zona donde el marcador se encuentre. Además se realizaron medidas de polarización de fluorescencia a diferentes temperaturas, y las curvas resultantes de la polarización con DPH se ajustaron matemáticamente a una sigmoide para calcular una serie de parámetros, incluyendo la temperatura de transición de fase, así como la cooperatividad del proceso. Este ensayo de microviscosidad se realizará tal como está indicado en el apartado de materiales y métodos 3.2.4.

5.3.1 Interacción de MAP₄VP3 con liposomas DPPC

En primer término se realizaron los espectros de fluorescencia para los dos marcadores, ANS y DPH, con el fin de controlar si además de la fluidez de la membrana, se producía algún otro proceso que modifica las propiedades del marcador en función de la temperatura. En la figura 5.4 se muestran la variación de la intensidad de fluorescencia en liposomas de DPPC con respecto a la temperatura para ambos marcadores. La intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura como corresponde ya que la intensidad de emisión de fluorescencia de cualquier fluoróforo depende de la temperatura, en cambio es prácticamente lineal y no se modifica la forma del espectro, ni se desplaza la posición del máximo de emisión, por lo que no se producen interacciones específicas entre el marcador (ANS ó DPH) con los fosfolípidos.

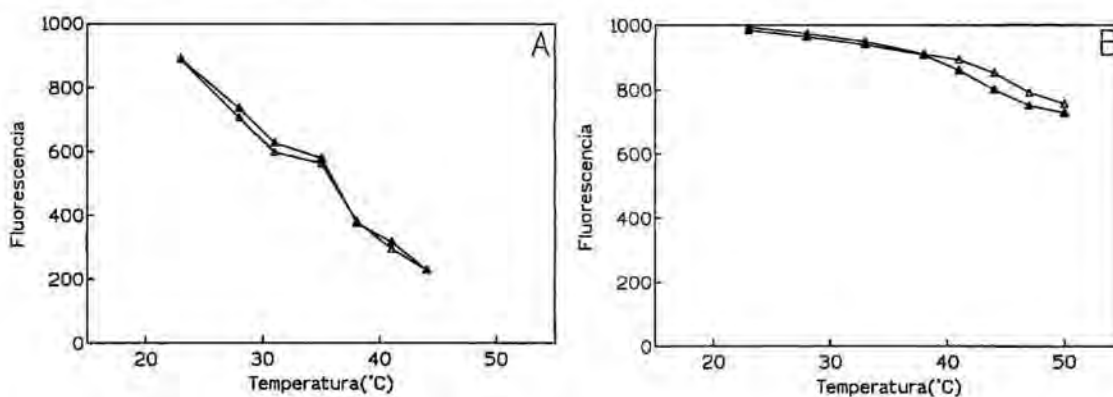


Figura 5.4 Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC con el fluoróforo, A) ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia (Δ) y en ausencia (▲) de MAP₄VP3. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

En la figura 5.5 se muestra la polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs marcados con ANS. A nivel de la región polar de la membrana se observa un incremento de polarización de ANS en presencia del péptido. Este comportamiento se ha observado para Palmitoil-VP3 (102-121) en mezclas de liposomas de DPPC-ANS (García, 1996).

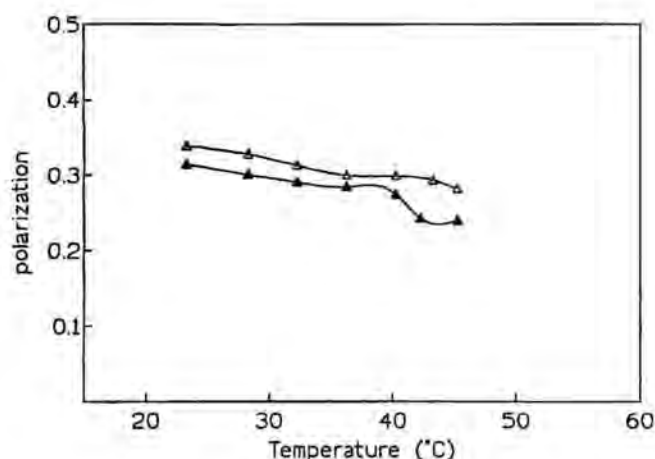


Figura 5.5 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC marcados con ANS en ausencia (▲) o presencia de MAP₄V3 (△). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

La variación en la polarización de fluorescencia de liposomas de DPPC marcados con DPH respecto a la temperatura se muestra en la figura 5.6. Los parámetros experimentales se ajustaron a la ecuación de una sigmoide:

$$P = A + \frac{(B - A) \cdot 10^{D,T}}{10^{D,C} + 10^{D,T}} \quad (10)$$

donde P representa la polarización, T la temperatura, A es el valor inferior de la curva, B es el valor más alto, C es la abscisa en el punto de inflexión (temperatura de transición) y D es el coeficiente de Hill, relacionado con la pendiente de la curva. El análisis de la primera derivada de la curva de polarización ajustada en cada caso permite comparar la amplitud de la transición de fase, considerándose el ancho en la mitad de la altura máxima de la curva derivada. Cambios en la amplitud se correlacionan con la cooperatividad de la transición de fase de las vesículas de gel a cristal líquido en los dos casos, con y sin péptido.

La unión de MAP₄VP3 a las vesículas de DPPC provoca un incremento de la temperatura de transición de fase gel a cristal líquido y a la vez, disminuye la fluidez de la bicapa a nivel de la zona hidrofóbica como se muestra en la figura 5.6 al pasar de 20°C a 50°C. A partir del análisis de la primera derivada observamos como el perfil de la transición de fase no varía con la presencia del péptido indicando que la cooperatividad del proceso se mantiene (figura 5.6; inset).

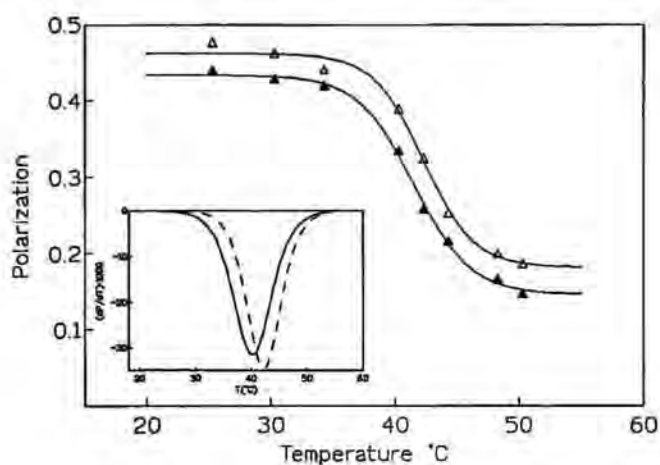


Figura 5.6 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC marcados con DPH en ausencia (\blacktriangle) o presencia de MAP₄V3 (\triangle). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄V3 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la tabla 5.1 se muestran los valores de la polarización de fluorescencia a dos temperaturas diferentes, por debajo y por encima de la temperatura de transición.

Tabla 5.1 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄V3 en los liposomas SUVs de DPPC.

Marcador	T < T _c (30 °C)		T > T _c (47°C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V3	Ausencia	+MAP ₄ V3
DPH	0.432±0.010	0.468±0.005(+)	0.170±0.090	0.198±0.008(+)
ANS	0.300±0.010	0.320±0.006(+)	0.242±0.010	0.282±0.002(+)

En la tabla 5.2 se representa la temperatura de transición en presencia y en ausencia del péptido, valores obtenidos a partir de ajustar a la ecuación de una sigmoide (ecuación 10; apartado 5.3.1, de resultados y discusión) los datos experimentales.

Tabla 5.2 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ V3	I C al 95%
DPPC	41.0	40.3-42.7	42.2	41.3-43.1

5.3.2 Interacción de MAP₄VP3 con liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5)

La intensidad de fluorescencia y posición del máximo de emisión de los liposomas SUVs de DPPC-SA (9.5:0.5) conteniendo la sonda DPH no varía en presencia del péptido a ninguna temperatura en el intervalo del experimento (no se muestra). Cuando el marcador es ANS, figura 5.7, la intensidad de fluorescencia disminuye hasta un mínimo que coincide con la temperatura de transición y después se incrementa. Todo ello indica que en la región polar de la bicapa por efecto de la temperatura se produce una modificación del entorno del marcador, hacia un entorno más hidrófobo.

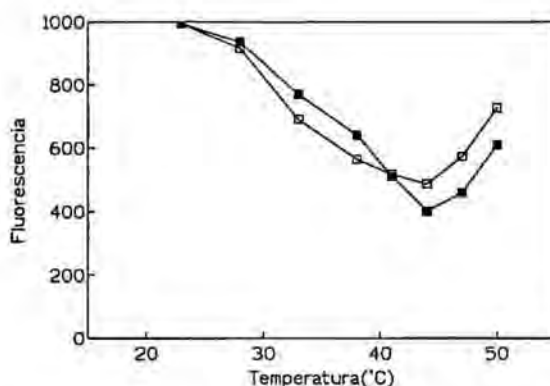


Figura 5.7 Intensidad de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC-SA (9.5:0.1) con el fluoróforo ANS, cuando fueron calentados en presencia (□) y en ausencia (■) de MAP₄VP3. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

Al añadir MAP₄VP3 se mantiene constante este comportamiento anómalo, es decir que la intensidad de fluorescencia por encima de la transición de fase aumenta con la temperatura (figura 5.7). Sin embargo, en esta zona de cristal líquido, la intensidad es superior en presencia del péptido. No obstante, puesto que la posición del máximo de emisión y la forma del espectro de emisión eran idénticos a los obtenidos para los liposomas solos, se consideró que no se producían interacciones específicas péptido-sonda.

Cuando se observa la polarización de fluorescencia del ANS vemos que se mantiene el perfil anómalo observado en la fluorescencia, pero invertido indicando que al aumentar la temperatura por encima de la transición se produce un aumento de la polarización del ANS (figura 5.8), también lo observamos para el péptido VP3 (110-121) con liposomas de DPPC-5%SA (Mestres, 1997). Esto a primera vista es contradictorio, ya que al aumentar la temperatura, aumenta la fluidez de la membrana y por tanto disminuye la polarización de fluorescencia, una explicación podría ser que el ANS, dada su carga negativa interaccionase específicamente con la SA, catiónica, formándose microdominios más compactados.

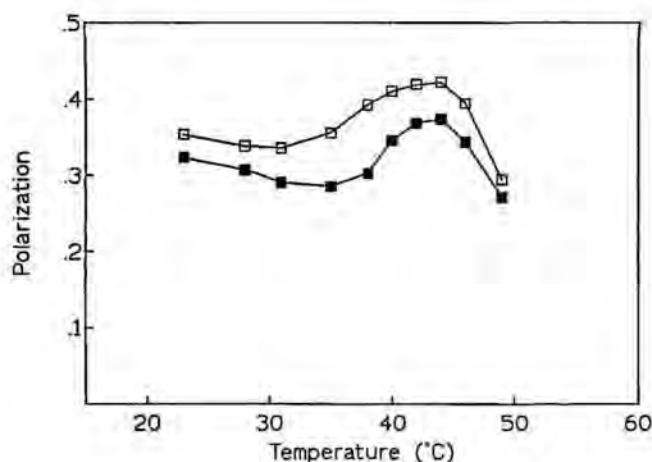


Figura 5.8 Polarización de Fluorescencia respecto a la Temperatura de liposomas SUVs de DPPC/SA (9.5:0.5) marcados con ANS en ausencia (■) o presencia de MAP₄V3 (□). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la figura 5.9 se representa la polarización de fluorescencia del DPH respecto a la temperatura para los liposomas DPPC-SA (9.5:0.5) en presencia o ausencia de MAP₄VP3.

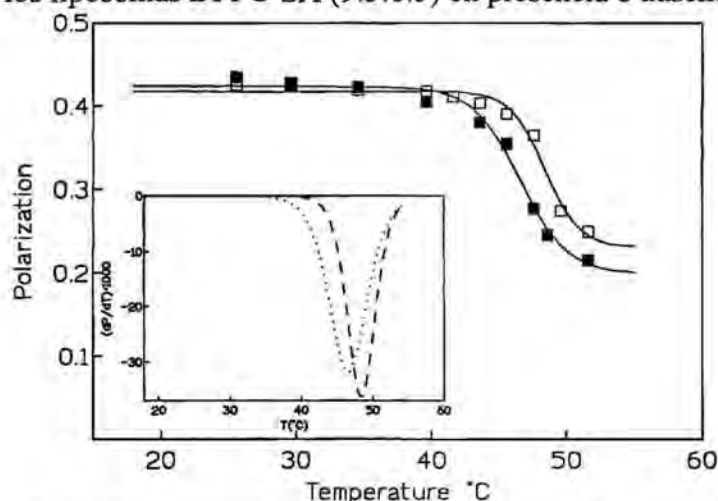


Figura 5.9 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/SA (9.5:0.5) marcados con DPH en ausencia (■) o presencia de MAP₄V3 (□). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea punteada) o en presencia de MAP₄V3 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Al considerar los liposomas de carácter catiónico DPPC-SA (9.5:0.5), la unión del péptido a los mismos provoca un incremento de la temperatura de transición de 2°C y también aumenta el orden o rigidez de la bicapa a temperatura por encima de 40 °C, a la vez que no se observa ningún cambio en la polarización del DPH por debajo de la temperatura de transición (figura 5.9). A partir de la primera derivada vemos como la amplitud del proceso de transición no se modifica en presencia del péptido, ya que esto daría lugar a una disminución de la cooperatividad del proceso de la transición.

En la tabla 5.3 se muestran los valores de la polarización de fluorescencia a dos temperaturas diferentes, por debajo y por encima de la temperatura de transición.

Tabla 5.3 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por MAP₄V3 en los liposomas SUVs de DPPC/SA.

Marcador	T < T _c (30 °C)		T > T _c (49°C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V3	Ausencia	+MAP ₄ V3
DPH	0.420±0.004	0.421±0.004(=)	0.230±0.010	0.272±0.007(+)
ANS	0.300±0.002	0.332±0.005(+)	0.271± 0.002	0.294± 0.008(+)

En la tabla 5.4 se representa la temperatura de transición en presencia y en ausencia del péptido, obtenidos a partir de ajustar los valores experimentales de polarización de fluorescencia con DPH a la ecuación de una sigmoide (ecuación 10; de resultados y discusión).

Tabla 5.4 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-SA .

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ V3	I C al 95%
DPPC-SA	46.5	45.5-47.7	48.5	47.3-49.4

5.3.3 Interacción de MAP₄VP3 con liposomas de DPPC-PI (9:1)

La intensidad de fluorescencia de los liposomas de DPPC/PI (9:1) con ANS o DPH disminuye gradualmente con la temperatura. Cuando el marcador es el ANS la fluorescencia no se modifica en presencia del péptido. Al considerar el ensayo con DPH, la intensidad de fluorescencia es menor en presencia de péptido pero sigue el mismo perfil, de modo que el entorno del marcador no varía. El máximo de la intensidad de fluorescencia no se modifica por la presencia del péptido, tanto para el marcador ANS como para el marcador DPH.

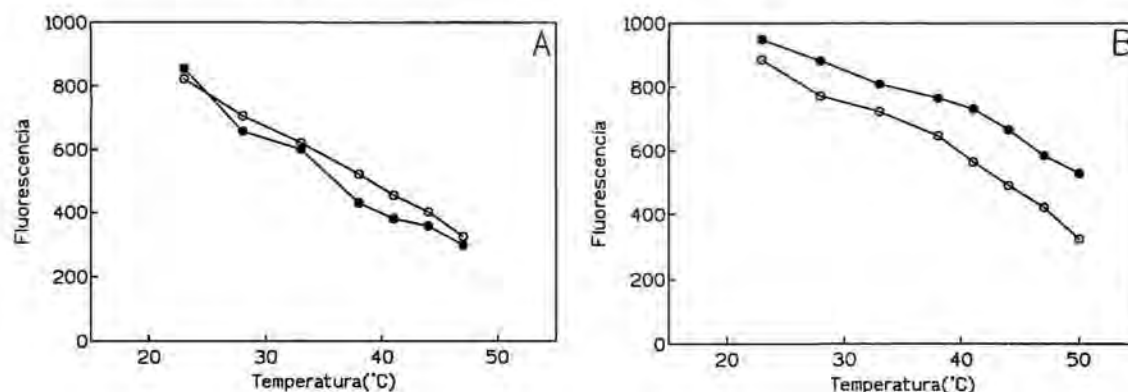


Figura 5.10 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-PI (9:1) con el fluoróforo, A) ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia (○) y en ausencia (●) de MAP₄VP3. Concentración de péptido 5 μ M, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

En la figura 5.11 se muestra la polarización de fluorescencia respecto a la temperatura en la zona hidrófila de la bicapa lipídica, donde la presencia del péptido provoca un incremento de la polarización. Por lo tanto, podemos concluir que en la región externa de la bicapa MAP₄VP3 aumenta la rigidez, disminuyendo la movilidad lateral de las cabezas polares de los fosfolípidos. Este aumento de la polarización de fluorescencia se ha observado para el péptido VP3 (110-121) con liposomas de DPPC-DPPG (1:1) (Perez, 1995b).

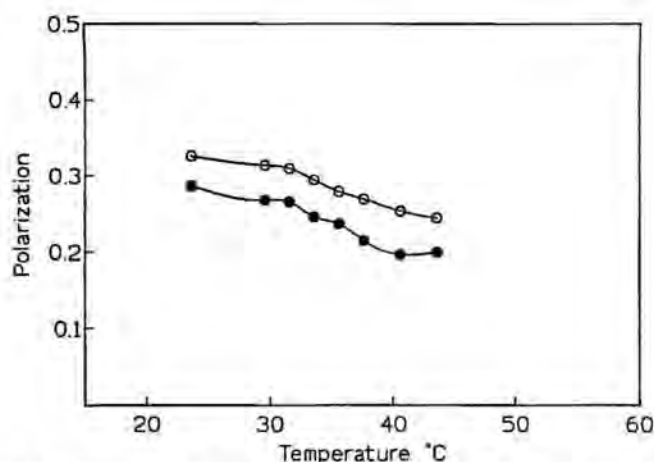


Figura 5.11 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/PI (9:1) marcados con ANS en ausencia (●) o presencia de MAP₄VP3 (○). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la figura 5.12 se muestran la polarización de fluorescencia de los liposomas aniónicos conteniendo DPH en presencia o ausencia del péptido respecto a la temperatura. Se observa un importante incremento de la polarización del DPH inducido por la presencia de MAP₄VP3, fundamentalmente en el intervalo de temperaturas por debajo de 42 °C, es decir en el estado de gel y durante la transición de fase. Estos resultados indican que la inserción de MAP₄VP3 en la bicapa de DPPC/PI induce una rigidificación de la matriz fosfolípídica. El análisis de las curvas de polarización mediante la derivada de las curvas ajustadas (inset figura 5.12) indican que la temperatura de transición aumenta 5°C en presencia de péptido y además la transición ocurre en un intervalo más estrecho de temperaturas lo que refuerza la idea de un efecto de incremento de la ordenación de las moléculas.

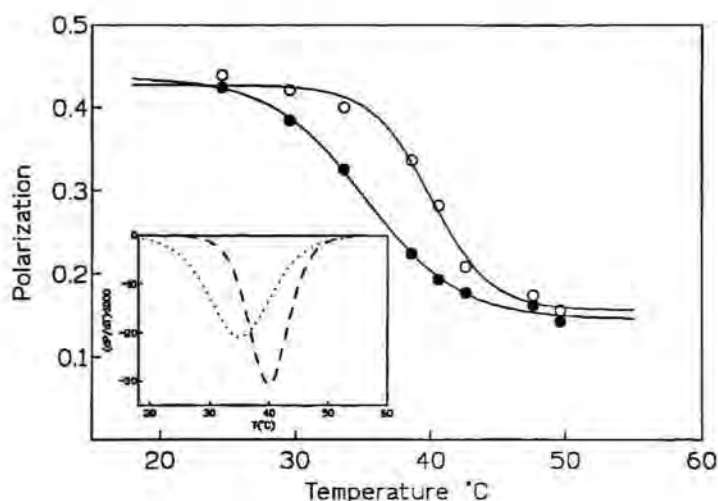


Figura 5.12 Polarización de Fluorescencia respecto a la Temperatura de liposomas SUVs de DPPC/PI (9:1) marcados con DPH en ausencia (●) o presencia de MAP₄V3 (○). Inset: Analisis de la primera derivada en ausencia (línea punteada) o en presencia de MAP₄V3 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Los valores de polarización de fluorescencia a las temperaturas de 30 °C y 50 °C se muestran en la tabla 5.5.

Tabla 5.5 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄V3 en los liposomas SUVs de DPPC/PI.

Marcador	T < T _c (30 °C)		T > T _c (45°C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V3	Ausencia	+MAP ₄ V3
DPH	0.390±0.007	0.424±0.010(+)	0.160±0.005	0.163±0.008(+)
ANS	0.260±0.010	0.317±0.003(+)	0.204±0.005	0.253±0.008(+)

A partir de los datos experimentales de la polarización de fluorescencia con la sonda DPH aplicando la ecuación 10 del apartado 5.3.1 de resultados y discusión, se obtienen los valores de la temperatura de transición que se muestran en la tabla 5.6.

Tabla 5.6 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-PI.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ VP3	I C al 95%
DPPC-PI	35.0	34.1-36.2	40	38.9-41.1

5.4 INTEGRIDAD DE LAS VESÍCULAS EN PRESENCIA DE MAP₄VP3

Existen una serie de ensayos que nos permiten determinar si las vesículas lipídicas permanecen íntegras en presencia de los péptidos o por el contrario, se vuelven permeables o bien tiene lugar un movimiento de fosfolípidos entre las monocapas que constituyen la bicapa lipídica (flip-flop).

5.4.1 Liberación de Carboxifluoresceína encapsulada en el interior de las vesículas

Con el fin de determinar si la interacción de los péptidos con bicapas inducía la permeabilización de las vesículas se incubaron liposomas SUV de diferente composición DPPC, DPPC-PI (9:1) y DPPC-SA (9:1) que contenían en su interior carboxifluoresceína con MAP₄VP3 y se determinó la cantidad liberada de esta sonda a diferentes tiempos (Figura 5.13).

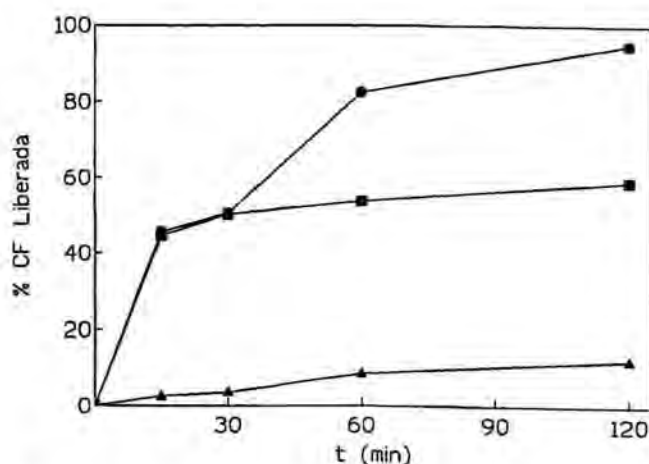


Figura 5.13 Liberación de carboxifluoresceína de los liposomas (▲)DPPC, (■)DPPC/SA (9.5:0.5) (●)DPPC/PI(9:1) al ser incubados con MAP₄VP3 a una relación lípido -péptido 14:1 (mol:mol). Concentración lipídica de 71 μM. Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C con una solución de acetato 0.25 M a pH 7.4 y con agitación mecánica.

Al considerar los liposomas de DPPC, la liberación de CF es menos de un 5 % después de 30 min. de incubación, y a las 2 h es aproximadamente un 10 %.

En vesículas de DPPC-SA la unión del péptido origina una liberación de CF. A los 30 minutos de incubación el 50 % de la CF se libera del liposoma, después prácticamente no se producen más pérdidas del marcador. Todo ello nos indica la pérdida de poder desestabilizante por parte de la construcción MAP, ya sea por formación de un complejo oligomérico o bien por un cambio conformacional, iguales efectos han sido observados para los péptidos lineales y sus análogos cíclicos respectivamente; éstos péptidos tienen carácter anfipático, estructura en hélice α y actividad citolítica (Oren, 2000).

En vesículas aniónicas de DPPC-PI se observa una liberación de CF constante y gradual hasta alcanzar el 100% a las 2 horas de la adición de MAP₄VP3. De modo que dicha membrana dependiente del tiempo se permeabiliza.

5.4.2 Accesibilidad de fosfolípidos de la monocapa interna

Otra forma de estudiar la interacción de los péptidos con las membranas de los liposomas y su efecto en la estabilidad de las vesículas es la determinación de la fluorescencia de una sonda fluorescente que se encuentra a ambos lados de la bicapa como puede ser el NBD. Este fluoróforo que presenta excitación a 465 nm y emisión a 535nm. Al entrar en contacto con un agente reductor como el ditionito, que reduce el grupo nitro NO₂ de la posición 4 de su estructura, dejando de emitir fluorescencia.

La parte experimental se realizará según el ensayo descrito por McIntyre (McIntyre, 1991), con algunas modificaciones (Cajal, 1997). Para ello se incubaron diferentes concentraciones de péptido con los diferentes tipos de liposomas marcados con NBD a los que se trató con ditionito y tritón X-100, según el apartado 3.2.6.2 de materiales y métodos.

La adición de ditionito a los liposomas de composición deseada conteniendo un 0.6 mol% NBD-PE resulta en una disminución de la fluorescencia del NBD esperada si solamente la prueba se encontrara en la monocapa externa del liposoma. La reacción empieza inmediatamente después de la adición del ditionito y tiene dos componentes un proceso rápido que se completa en menos de 100 s y un proceso lento tiempo dependiente (Figura 5.14). La reacción rápido es debida a la reducción del lípido expuesto en la monocapa externa del liposoma. La lenta es debida a la permeabilidad de la membrana al reactivo y a la reducción del lípido de la monocapa interna. El porcentaje de lípido presente en la exterior se calcula como se explica en materiales y métodos.

Liposomas de DPPC la fracción de ditionito apantallada por NBD no cambia por la presencia de péptido ni siquiera a alta concentración de péptido 10 mol%.

La unión a las vesículas catiónicas resulta en un incremento de la cantidad de lípido que es accesible al reactivo sugiriendo a la vez liberación o disrupción de las vesículas o lipid flip-flop. El 56% del lípido reacciona con el ditionito y este valor se incrementa hasta un 66% cuando la concentración de péptido es de 5 mol% y de 70 % con un 15%mol de péptido (Figura 5.14)

Al considerar las vesículas aniónicas éstas son totalmente permeables al ditionito con o sin péptido.

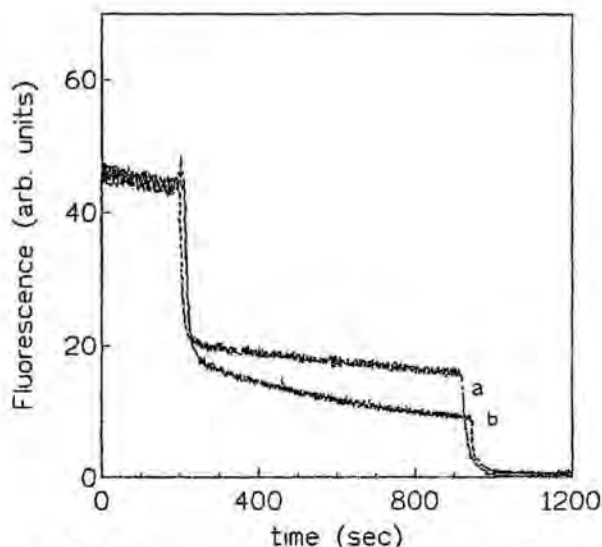


Figura 5.14 Registro de la pérdida de fluorescencia de NBD-PE (0.6% en liposomas de DPPC-SA SUVs) al adicionar ditionito (indicado por flecha). Ditionito se adiciona a una suspensión de liposomas de $16\mu\text{M}$ en $10\text{ mM Tris pH } 7.4$ sin péptido (a) o con la presencia de $15\% \text{ mol}$ péptido en (b) la disminución de fluorescencia del NBD se mide en función del tiempo. Las vesículas de DPPC con un $10\% \text{ mol}$ péptido son igual que a). Al final de la reacción se añade el deoxicolato a una concentración de 2.2 mM para que se reduzca el NBD de la monocapa interna.

5.5 MEZCLA DE LÍPIDOS ENTRE VESÍCULAS DETERMINADA POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA (T.E.R)

Para evaluar la agregación de las vesículas y/o la mezcla de lípidos entre diferentes membranas, se utiliza un ensayo basado en la transferencia de energía por resonancia (TER) entre dos fosfolípidos con grupos fluorescentes unidos covalentemente, donde uno actúa como dador (NBD-PE) y el otro como aceptor (Rh-PE). La distancia de Förster del par es de 55 \AA (Van der Meer, 1994).

Los fosfolípidos fluorescentes se incorporaron a la bicapa lipídica de dos poblaciones diferentes de liposomas en una proporción de 0.6% . Al mezclar ambas poblaciones de vesículas en igual proporción molar, la distancia entre el dador y el aceptor es grande, puesto que están en membranas diferentes, y por tanto no se produce T.E.R. La existencia de un proceso de agregación y en mayor medida de mezcla entre vesículas provocada por la adición del péptido, origina el acercamiento entre las dos sondas fluorescentes lo que se traduce en una mayor eficiencia de la transferencia de energía por resonancia del dador al aceptor (Suck, 1981).

El ensayo de mezcla de lípidos seguido por T.E.R. entre NBD y Rh es muy específico puesto que no se produce intercambio de los marcadores entre vesículas con el tiempo.

En estos ensayos se evaluó la mezcla de lípidos entre vesículas de diferentes composiciones: zwitteriónica (DPPC), aniónica (DPPC-PI (9:1) y catiónica (DPPC-SA (9.5:0.5), originada por el péptido MAP_4VP_3 . Los ensayos se realizaron según los protocolos descritos en materiales y métodos apartado 3.2.5.

En la figura 5.15 se muestran espectros de emisión de fluorescencia típicos, en este caso para liposomas de DPPC-SA.

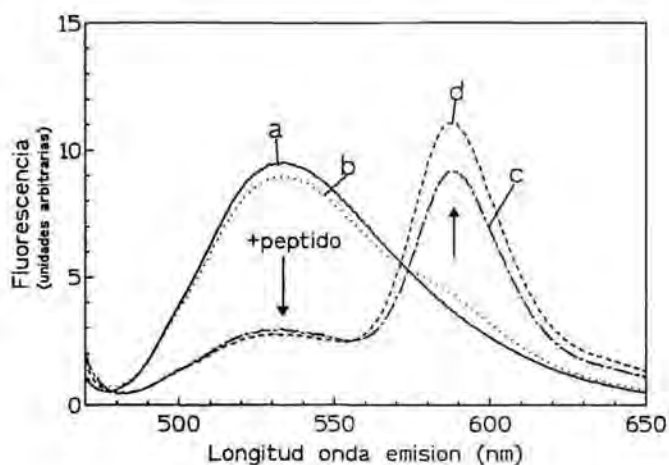


Figura 5.15 Espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla equimolar de vesículas de DPPC-SA (9.5:0.5) con NBD (a), con Rh (b), en presencia de péptido (c) y liposomas control marcados con 0.3 NBD y 0.3 Rh (d) Excitación 460 nm.

En la figura 5.15 se observa que al mezclar los liposomas de DPPC-SA con NBD (espectro a) con la misma concentración de liposomas con Rh (espectro b), la fluorescencia del NBD prácticamente no varía. Sin embargo, al añadir MAP₄VP3, en este ejemplo a una relación molar de 65:1 se produce una importante disminución de la intensidad de fluorescencia de NBD, y un aumento simultáneo de la emisión de Rh por T.E.R. (espectro c) indicando que se ha producido una agregación, o más probablemente una mezcla de lípidos entre membranas. El máximo de mezcla correspondería a liposomas de igual composición pero incorporando un 0.3% de los dos marcadores (espectro d) que coincide con el espectro obtenido al añadir tritón a la mezcla c.

Como era de esperar no se produce efecto fusogénico es decir mezcla de lípidos en los liposomas de DPPC. En cambio para liposoma catiónicos si se produce una importante mezcla de lípidos

Las representaciones gráficas de la mezcla de lípidos en función del tiempo se muestran en la figura 5.16. En las vesículas de DPPC-SA la fase inicial de mezcla es muy rápida después de la adición del péptido y su magnitud depende de la concentración del mismo. En los primeros segundos se observa una desestabilización de las membranas, y a partir de estos se produce una lenta mezcla de lípidos gradual con el tiempo, que es característica de un proceso de fusión de membranas.

Sin embargo, para los liposomas aniónicos no se produce mezcla de lípidos a pesar de que el péptido induce liberación del contenido acuoso de los mismos (figura 5.16; c). Un comportamiento similar ha sido descrito para vesículas con un 20 % o más de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) que liberaran CF lo cuál no está relacionado con la fusión de liposomas en presencia de arbutinina (Hincha, 1999).

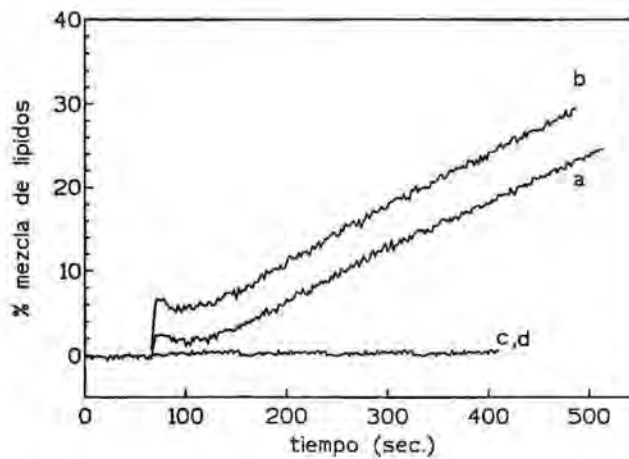


Figura 5.16 Cinética de mezcla de lípidos provocada por MAP₄VP3 en función de la fracción molar de péptido en liposomas DPPC-SA (9.5:0.5) cuando a) 1.5 mol% péptido b) 3 mol% péptido; c) en liposomas DPPC-PI (9:1) y d) en liposomas DPPC, los dos tipos de vesículas con un 6 mol% péptido. El péptido se añade a una mezcla de vesículas con .0.6%NBD-PE y Rh-PE en solución tamponada de Tris 10 mM pH 7.4. Concentración de lípido es 134 μ M. Excitación a 460 nm y emisión a 530 nm.

Al adicionar péptido a las vesículas zwitteriónicas no se produce fusión de membranas (figura 5.16; d), lo cuál concuerda con la mayor estabilidad encontrada para este tipo de liposomas en el ensayo de liberación del contenido acuoso.

Interacción de MAP₄VP3 con vesículas lipídicas: consideraciones finales

La construcción peptídica a estudio tiene carácter anfipático y al pH de estudio presenta carga neta negativa. Los resultados de los ensayos realizados muestran que el MAP₄VP3 se une a los tres liposomas de diferente composición y carga eléctrica. Por lo tanto, La unión muestra un importante componente hidrofóbico. Sin embargo, la estequiometría es aproximadamente la misma (14-16 moléculas de lípido por péptido) para cualquier vesícula pero la forma de unión es diferente. La unión del péptido a los liposomas de DPPC incrementa el empaquetamiento de la bicapa sin alterar la permeabilidad, ni inducir fusión de vesículas o bien solubilización de las mismas. Por otro lado la unión de péptido a las vesículas catiónicas da lugar a desestabilización, induciendo un incremento de la permeabilidad de la bicapa, también mezcla de lípidos tiempo dependiente y una importante liberación del contenido acuoso de sus vesículas. De este modo, el péptido induce fusión de los liposomas catiónicos a pH neutro. Lo que nos indica que la interacción tiene un componente electrostático al igual que nos lo muestran los ensayos con monocapas (Alsina, 1997). Este proceso de desestabilización de la membrana ocurre sin perder la estructura de bicapa ya que se incrementa el orden y la temperatura junto con un aumento de la cooperatividad de la fase de transición. A la vez que el péptido por su carácter anfipático favorece su incorporación a la zona hidrofóbica de la membrana, lo cuál redundaría en una mayor respuesta inmune como ya se ha visto para otros péptidos (Mecheri, 1990; Cajal, 1998a) Cuando se consideran los liposomas aniónicos su unión al péptido origina una liberación del contenido acuoso pero sin producir mezcla de lípidos. Además incrementa la cooperatividad del proceso de transición ya que se incrementa en 5°C la temperatura de transición lo que indica la posibilidad de solubilización o bien de formación de micelas. En otras palabras el péptido induce permeabilización de la membrana pero manteniendo intacta la estructura de la bicapa como también sucede para la mellitina con liposomas zwitteriónicos (Benachir, 1995)

6. INTERACCION DE MAP₄VP1 (11-25) CON BICAPAS LIPIDICAS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La construcción MAP₄VP1 no contiene residuos de triptófano en su secuencia peptídica por lo que los ensayos de transferencia de energía, T.E.R., entre dicho aminoácido y el grupo aceptor de fluorescencia NBD no se podrán realizar.

La interacción péptido-bicapas lipídicas depende tanto de la estructura química como del estado físico de los fosfolípidos que la constituyen (Castuma, 1989). Por ello en esta parte del estudio nos centraremos en los cambios que se producen en las propiedades fisicoquímicas de las mismas, como son: la fluidez de la bicapa por polarización de fluorescencia, la permeabilidad de la bicapa por liberación del contenido acuoso, y por último la fusión de membranas por la presencia del péptido.

6.1 CAMBIOS EN LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA DETERMINADOS POR POLARIZACION DE FLUORESCENCIA

La interacción del MAP₄VP1 con bicapas de fosfolípido a nivel de su cabeza polar se estudió, empleando el 8-Anilinaftalen sulfonato sódico, ANS, como marcador fluorescente y para determinar la influencia del MAP₄VP1 en las bicapas de fosfolípidos a nivel de las cadenas alquílicas se empleó como marcador fluorescente el 6-difenil-8-hexatrieno, DPH. Tal como se indica en la parte experimental de este estudio se utilizaron liposomas unilaminares, SUV, cuyo diámetro era menor de 100 nm. En esta serie de experimentos se determina la intensidad de fluorescencia, la posición del máximo de la banda de emisión, y la variación de la polarización de fluorescencia en función de la temperatura. La temperatura de transición se obtiene al aplicar la ecuación de una sigmoide a los datos experimentales de polarización, y la cooperatividad del proceso se estima a partir del análisis de la primera derivada de esta curva.

6.1.1 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC

Los espectros de fluorescencia del ANS muestran que la intensidad de emisión disminuye al aumentar la temperatura. En presencia de MAP₄VP1 no se observan diferencias significativas ni en la posición del máximo de emisión del ANS ni en la intensidad de fluorescencia (figura 6.1.A). Lo mismo ocurre con los liposomas de DPPC conteniendo la sonda DPH (figura 6.1.B). Esto indica que no se producen interacciones específicas del péptido con estas sondas fluorescentes.

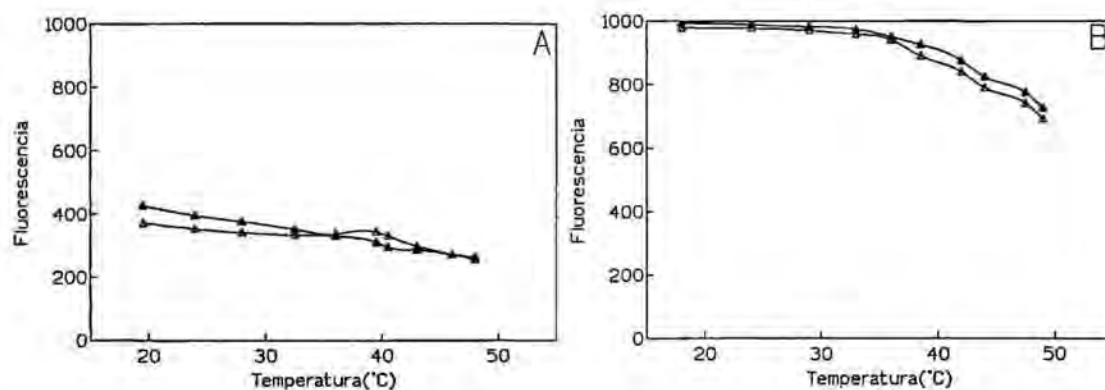


Figura 6.1 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC con el fluoróforos, A) ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia(Δ) o ausencia (\blacktriangle) de MAP_4VP1 . Concentración de péptido $5 \mu M$, concentración de lípido 0.4 mM . Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4 .

En la figura 6.2 se muestra como la polarización de la sonda ANS medida a diferentes temperaturas para los liposoma de DPPC no varía en presencia de MAP_4VP1 . Esto implica que la fluidez de la bicapa a nivel de la zona polar no se ve afectada por el péptido, puesto que la polarización de fluorescencia se mantiene invariable.

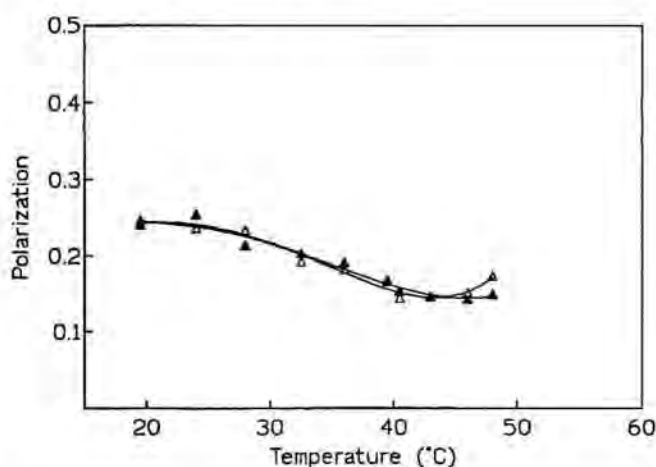


Figura 6.2 Polarización de fluorescencia respecto a la Temperatura de liposomas SUVs de DPPC marcados con ANS en ausencia (\blacktriangle) o presencia de MAP_4VP1 (Δ). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4 . Relación molar lípido/péptido $90:1$.

Por el contrario, los valores de polarización de fluorescencia de DPH en presencia del péptido indican que éste es capaz de interactuar con las cadenas alquílicas de la DPPC, disminuyendo su rigidez. En la figura 6.3 se puede apreciar que esta tendencia se mantiene a lo largo de todo el intervalo de temperaturas estudiado. A partir de la primera derivada de la curva obtenida ajustando los valores de polarización versus temperatura según la ecuación 10 (resultados y discusión), se observa como MAP_4VP1 no influye en la cooperatividad del proceso de transición de fase gel a cristal líquido. Este efecto ha sido observado para péptidos lipofílicos de la hepatitis B derivados de la secuencia preS (120-145) (Cajal, 1995).

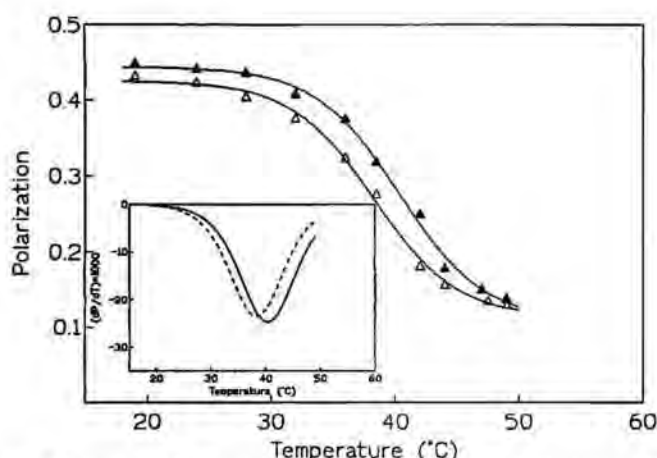


Figura 6.3 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC marcados con DPH en ausencia (\blacktriangle) o presencia de MAP₄V1 (\triangle). Inset: Analisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄V1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Los valores de polarización de fluorescencia a dos temperaturas diferentes, una por encima y otra por debajo de la temperatura de transición, se muestran en la tabla 6.1.

Tabla 6.1 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄V1 en los liposomas SUVs de DPPC.

Marcador	T < T _c (30 °C)		T > T _c (47 °C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V1	Ausencia	+MAP ₄ V1
DPH	0.424±0.010	0.405±0.001(-)	0.150±0.002	0.145±0.010(-)
ANS	0.213±0.005	0.214±0.009(=)	0.149±0.010	0.150±0.007(=)

En la tabla 6.2 se representa la temperatura de transición en presencia y en ausencia del péptido, valores obtenidos a partir de ajustar a la ecuación de una sigmoide (ecuación 10; apartado 6 de resultados y discusión) los datos experimentales.

Tabla 6.2 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	IC al 95%	+MAP ₄ V1	IC al 95%
DPPC	40.3	39.1-41.6	38.3	37.3-39.2

6.1.2 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC-PI (9:1)

Los valores de intensidad de fluorescencia del fluoróforo ANS para los liposomas de DPPC con fosfatidilinositol en presencia de MAP₄VP1 son menores respecto en ausencia del mismo (figura 6.4 A). En la figura 6.4 B se muestra la variación de la intensidad de fluorescencia de los liposomas saturados con DPH. En estos liposomas la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura y en ausencia de péptido su valor es ligeramente mayor. Por otra parte, la posición del máximo de emisión no varía en ninguna de las muestras ensayadas. Esta variación de fluorescencia del ANS en

presencia de MAP₄VP1 indica la existencia de algún tipo de interacción específica entre la sonda y el péptido.

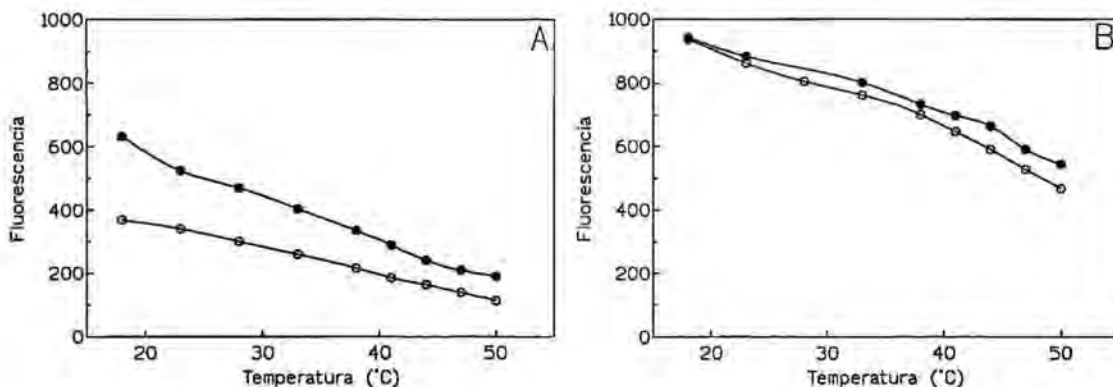


Figura 6.4 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-PI (9:1) con el fluoróforo, A)ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia(○) o ausencia (●)de MAP₄VP1. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

La polarización de fluorescencia de los liposomas de DPPC-PI /ANS no varía en presencia de MAP₄VP1 (figura 6.5) en el rango de temperaturas de 18 a 50 °C. Estos resultados indican que el péptido no modifica la fluidez de los fosfolípidos en la zona externa de la bicapa, determinada por las cabezas polares de PC y PI.

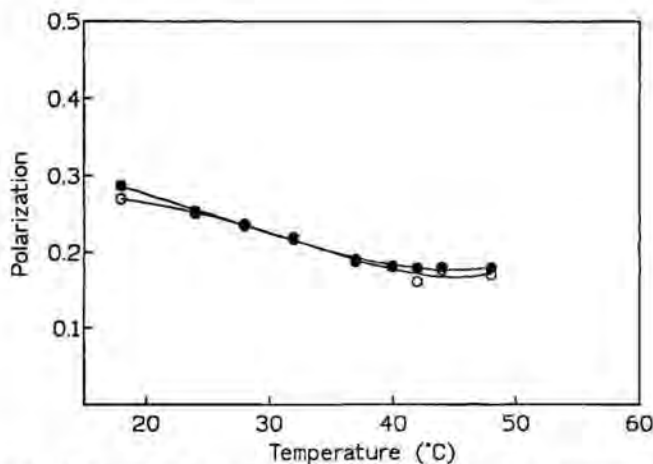


Figura 6.5 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/PI (9:1) marcados con ANS en ausencia (●) o presencia de MAP₄VP1 (○).Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Por otra parte, la polarización de fluorescencia del marcador DPH incorporado a los liposomas de DPPC-PI se modifica ligeramente en presencia de MAP₄VP1 (figura 6.6). Se observa un efecto fluidificante de la membrana a bajas temperaturas, cuando los lípidos se encuentran en fase de gel y también en la fase de cristal líquido. Sin embargo, en la zona de la transición no se observan diferencias respecto a los liposomas sin péptido. No obstante, este efecto es poco acusado, y no conlleva una desorganización de la estructura de bicapa, ya que la cooperatividad del proceso de transición de fase se mantiene, como se deduce del análisis de las curvas de transición de fase (figura 6.6, inset). Además, la T_c se incrementa ligeramente en presencia del péptido.

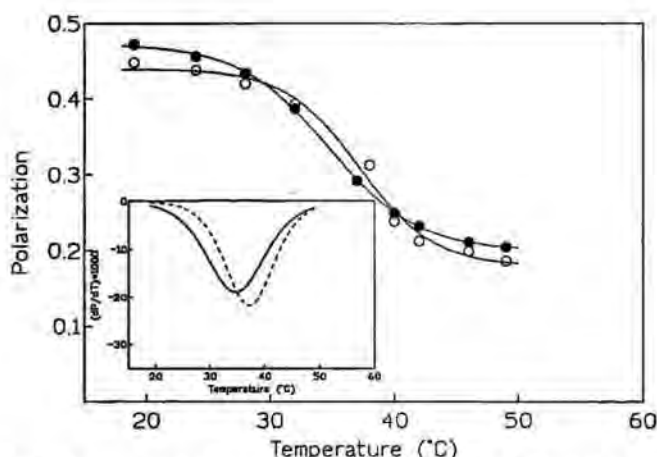


Figura 6.6 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/PI (9:1) marcados con DPH en ausencia (●) o presencia de MAP₄V1 (○). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄V1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1

En la tabla 6.3 se muestran valores de polarización de fluorescencia de liposomas de DPPC-PI conteniendo las sondas DPH y ANS a temperatura inferior o superior a la T_c.

Tabla 6.3 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄V1 en los liposomas SUVs de DPPC-PI.

Marcador	T < T _c (29 °C)		T > T _c (49 °C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V1	Ausencia	+MAP ₄ V1
DPH	0.429±0.008	0.426±0.009(-)	0.198±0.010	0.192±0.007(-)
ANS	0.235±0.008	0.234±0.010(=)	0.180±0.005	0.178±0.008(=)

En la tabla 6.4 se representa la temperatura de transición en presencia y en ausencia del péptido, valores obtenidos a partir de ajustar a la ecuación de una sigmoide (ecuación 10; apartado 5.3.1 de resultados y discusión) los datos experimentales.

Tabla 6.4 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-PI.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	IC al 95%	+MAP ₄ V1	IC al 95%
DPPC-PI	34.7	34.3-35.0	37.1	35.4-38.9

6.1.3 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5)

La intensidad de fluorescencia de los liposomas de DPPC conteniendo estearilamina y marcados con ANS disminuye la fluorescencia de forma acusada (figura 6.7 A). Sin embargo, esta tendencia se invierte para temperaturas superiores a 41°C. Este comportamiento anómalo se podría explicar por la atracción electrostática entre la SA, ácido graso de carga positiva, y el ANS, marcador aniónico a pH 7.4. Esta atracción de cargas daría lugar a una distribución preferente del ANS en microdominios enriquecidos en SA cuando la bicapa se encuentra en el estado de fluido, de mayor movilidad de los fosfolípidos. Este comportamiento se mantiene en presencia de MAP₄VP1, produciéndose

además un aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia a todas las temperaturas. La intensidad de fluorescencia del DPH disminuye en función de la temperatura, siendo esta disminución más acusada en presencia del péptido y cuando los valores de temperatura son superiores a 40°C (figura 6.7.B). Sin embargo, en ningún caso se puede observar modificación de la longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}).

En la figura 6.7 A viene representada la evolución de esta magnitud en función de la temperatura, tanto en ausencia como en presencia de péptido aparece un mínimo alrededor de 41°C, que se recupera lentamente a temperaturas superiores. En este caso la presencia de péptido con carga neta negativa puede atraer a la SA cuya carga neta es positiva, originando un entrono más hidrófobo dónde la fluorescencia de dicho marcador se incrementa. Además no se han visto interacciones entre el MAP₄VP1 y el ANS cuando se incuban a diferentes temperaturas sin liposomas, dándonos idea de que no existen agregados o micelas de péptido.

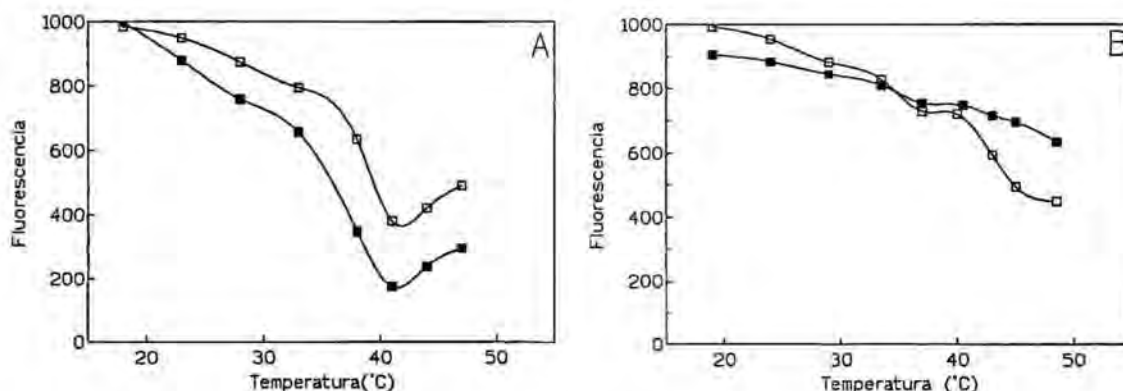


Figura 6.7 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-SA (9.5:0.5) con el fluoróforo, A)ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia (□) o ausencia (■) de MAP₄VP1. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

Los valores de polarización de fluorescencia de los liposomas SUVs de DPPC-SA presenta un un máximo alrededor de 40°C (figura 6.8). Esta discontinuidad es menos acusada en presencia del péptido, ya que en este caso la temperatura del máximo se encuentra alrededor de 37-38°C. El máximo de polarización encontrado para la DPPC-SA(9.5:0.5)/ANS, tanto en ausencia como en presencia de MAP₄VP1 coincide con el mínimo de fluorescencia. Así dicho incremento de polarización refleja en vez de una mayor movilidad de la zona polar de las bicapas esperada al ser $T > T_c$, una compactación a este nivel originada por la distribución asimétrica del ANS (aniónico) en dominios de SA (catiónico) por atracción.

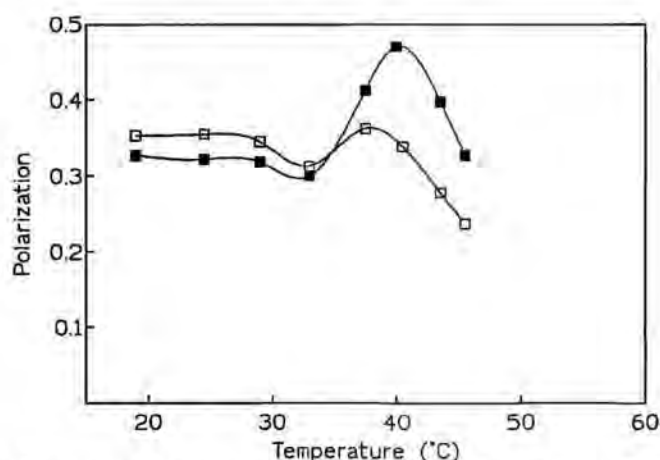


Figura 6.8 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/SA(9.5:0.5) marcados con ANS en ausencia (■) o presencia de MAP₄V1 (□). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Las curvas de polarización de fluorescencia del DPH respecto a la temperatura de la figura 6.9 muestran un efecto fluidificante a nivel de las cadenas alquílicas de la bicapa de DPPC-SA por efecto del MAP₄V1. La temperatura de transición de la bicapa catiónica disminuye en 2°C y la cooperatividad del proceso se acentúa en presencia del péptido, indicando que la estructura de la bicapa no se pierde en presencia de MAP₄V1.

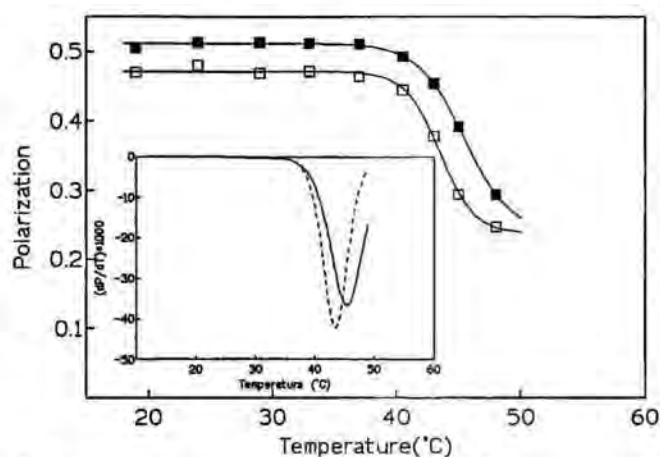


Figura 6.9 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/SA(9.5:0.5) marcados con DPH en ausencia (■) o presencia de MAP₄V1 (□). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄V1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la tabla 6.5 se detallan los valores de polarización de fluorescencia de los marcadores ANS y DPH a dos temperaturas diferentes, una superior y otra inferior a la temperatura de transición.

Tabla 6.5 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄V1 en los liposomas SUVs de DPPC-SA.

Marcador	T < T _c (29 °C)		T > T _c (47°C)	
	Ausencia	+MAP ₄ V1	Ausencia	+MAP ₄ V1
DPH	0.496±0.001	0.469±0.005(=)	0.281±0.009	0.247±0.010(-)
ANS	0.318±0.002	0.345±0.010(+)	0.327±0.030	0.236±0.020 (-)

En la tabla 6.6 se representa la temperatura de transición en presencia y en ausencia del péptido, valores obtenidos a partir de ajustar a la ecuación de una sigmoide (ecuación 10; apartado 5.3.1 de resultados y discusión) los datos experimentales de los liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5).

Tabla 6.6 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-SA .

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ VP1	I C al 95%
DPPC-SA	45.5	44.7-46.2	43.5	43.1-43.8

6.1.4 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC-PG (9:1)

La intensidad de fluorescencia de las vesículas de DPPC-PG con la sonda ANS disminuye con la temperatura. La presencia de MAP₄VP1 en el sistema aumenta ligeramente los valores de fluorescencia (Figura 6.10, A). Al comparar la silueta de los espectros emisión de ANS y la posición del máximo de emisión se observa como la presencia del péptido induce un desplazamiento a longitudes de onda menores dependiente de la temperatura. Este desplazamiento llega a ser como máximo de 8 nm. Esta variación es debida a la localización de la sonda en un entorno más hidrófobo. Este fenómeno resulta difícil interpretarlo, ya que el resto de fosfolípidos aniónicos no les sucede y por lo tanto no parece tener ninguna significación especial.

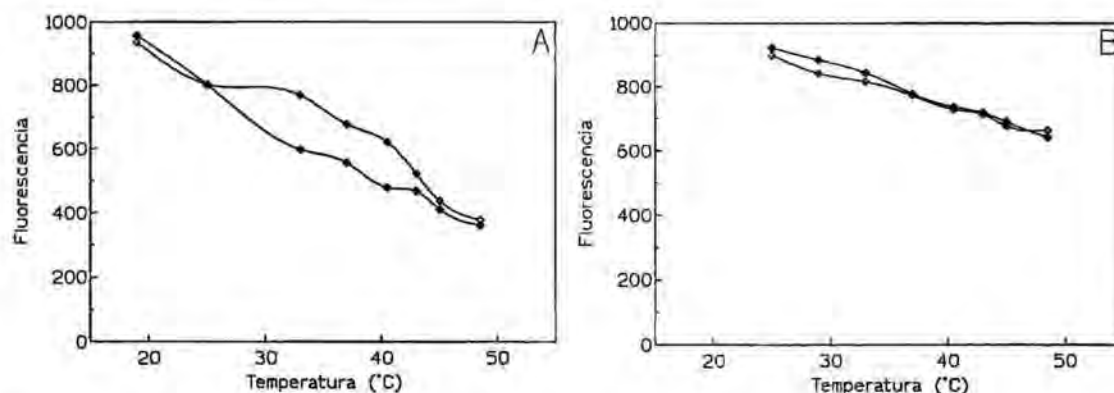


Figura 6.10 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-PG (9:1) con el fluoróforo, A) ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia(◇) o ausencia (◆)de MAP₄VP1. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

Al considerar el marcador DPH de la figura 6.10;B, la intensidad de fluorescencia permanece invariable en presencia de MAP₄VP1. La posición del máximo de emisión no se altera por la presencia de MAP₄VP1, de manera que el entorno de la sonda no se modifica.

La polarización de fluorescencia del ANS de las bicapas de DPPC-PG (9:1) en presencia de MAP₄VP1 muestra un efecto rigidificante a T<T_c, pero alrededor de 30°C se produce una inversión del fenómeno, el cuál ha sido descrito para el péptido VP2 (96-107) con liposomas de DPPC-DPPG (Haro, 1996). El valor de polarización de fluorescencia es

menor, induciendo una fluidificación en la región polar de la bicapa por efecto del péptido. Sin embargo, estos cambios de fluidez son poco importantes y probablemente carecen de significación.

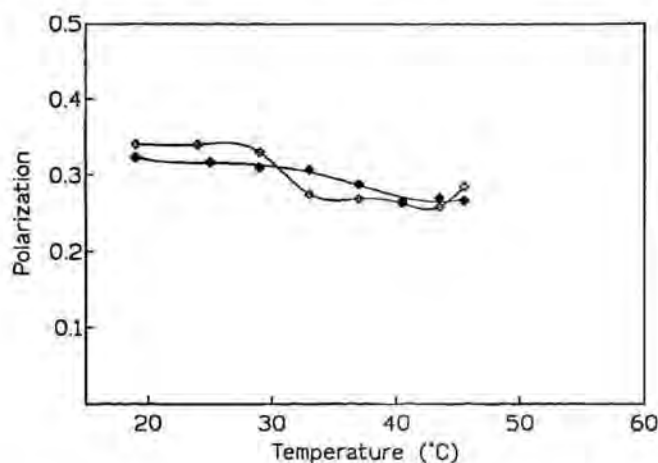


Figura 6.11 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/ PG (9:1) marcados con ANS en ausencia (◆) o presencia de MAP₄V1 (◇). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la figura 6.12 se muestran los perfiles de polarización del DPH en estos liposomas. En presencia de MAP₄VP1 se obtienen unos valores de polarización de fluorescencia menores en todo el rango de temperatura respecto a los liposomas control de DPPC-PG (9:1). La movilidad de las bicapas lipídicas disminuye a nivel de la zona hidrófoba de la bicapa. La cooperatividad de la transición de fase de gel a cristal líquido prácticamente no se modifica.

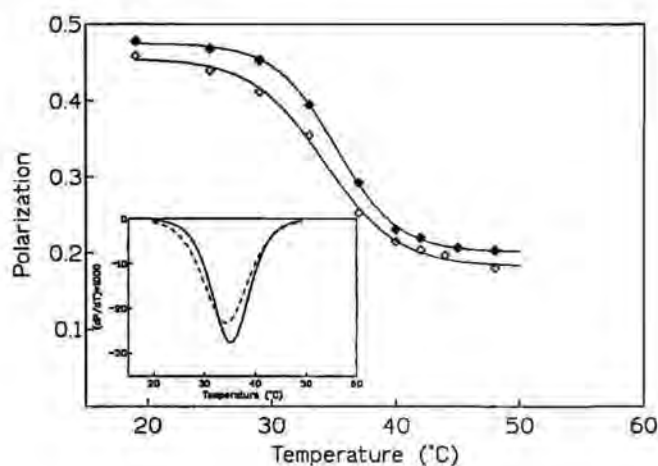


Figura 6.12 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/ PG (9:1) marcados con DPH en ausencia (◆) o presencia de MAP₄VP1 (◇). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄VP1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

Los valores de polarización de fluorescencia se detallan en la tabla 6.7 a dos temperaturas diferentes, que se corresponden con el estado gel y cristal líquido, respectivamente.

Tabla 6.7 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄VP1 en los liposomas SUVs de DPPC-PG.

Marcador	T < T _c (30 °C)		T > T _c (47°C)	
	Ausencia	+MAP ₄ VP1	Ausencia	+MAP ₄ VP1
DPH	0.468±0.007	0.412±0.010(-)	0.213±0.002	0.198±0.008(-)
ANS	0.317±0.003	0.347±0.008(+)	0.264±0.001	0.285±0.010(+)

Al analizar las primeras derivadas de los gráficos resultantes de ajustar los valores experimentales a la ecuación 10 (apartado 5.3.1, de resultados y discusión), obtenemos los valores de las temperaturas de transición para las muestras ensayadas (tabla 6.8), observándose que esta no se modifica en presencia de MAP₄VP1.

Tabla 6.8 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-PG.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ VP1	I C al 95%
DPPC-PG	35.2	34.9-35.5	34.2	33.4-35.0

6.1.5 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC-DPPE (9:1)

En los liposomas de DPPC-DPPE conteniendo ANS, la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura (figura 6.13A). Al adicionar MAP₄VP1 al sistema se produce un incremento anómalo de la fluorescencia, en el intervalo de temperatura, 35 °C - 45 °C, presentando un máximo a 40°C. A partir de esta temperatura la polarización disminuye de manera regular. Los espectros de emisión de fluorescencia no muestran desplazamientos del máximo de emisión. La intensidad de fluorescencia de la sonda DPH de la figura 6.13 B muestra como la presencia del péptido da un valor considerablemente menor respecto a los liposomas de DPPC-DPPE control (ausencia de péptido). En los dos casos la intensidad disminuye con la temperatura y la posición de los máximos de emisión no varía. La bicapa es estable y las moléculas de DPH están presentes a nivel de la zona hidrofóbica de la misma.

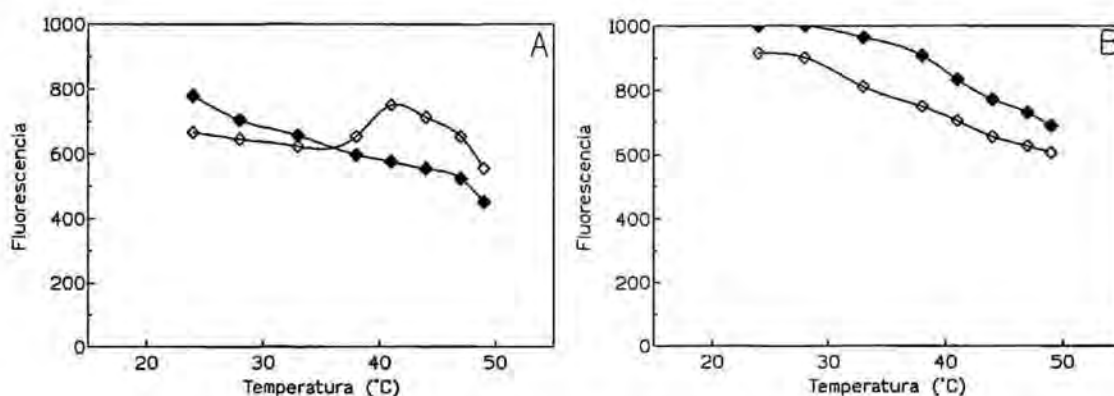


Figura 6.13 Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-DPPE (9:1) con el fluoróforo, A)ANS y B) DPH, cuando fueron calentados en presencia (◊), o ausencia (◆)de MAP₄VP1. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

Los valores de polarización de fluorescencia para las vesículas de DPPC-DPPE con ANS se muestran en la figura 6.14. La interacción del MAP₄VP1 a nivel de la zona polar de la bicapa origina una fluidificación. Los valores de polarización, en ausencia o presencia de péptido, disminuyen a partir de T>35⁰C y alcanzan un valor mínimo alrededor de 41⁰C, después vuelven aumentar ligeramente. Sin embargo, la variación de polarización de fluorescencia del ANS es mucho menor en ausencia de péptido.

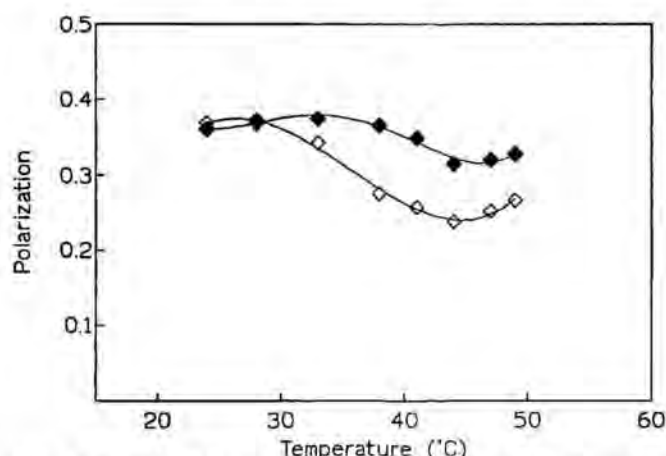


Figura 6.14 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/DPPE (9:1) marcados con ANS en ausencia (♦) o presencia de MAP₄V1 (◊). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4, Relación molar lípido/péptido 90:1.

La polarización del marcador DPH en este sistema indica que la presencia péptido fluidifica las membranas aumentando la movilidad lateral de las cadenas de ácido palmítico de los fosfolípidos, especialmente cuando esta se encuentra en estado de gel, por debajo de la T_c. La cooperatividad de proceso de transición de fase disminuye como se corresponde con el aumento de la fluidez de la fase de gel por efecto del MAP₄VP1.

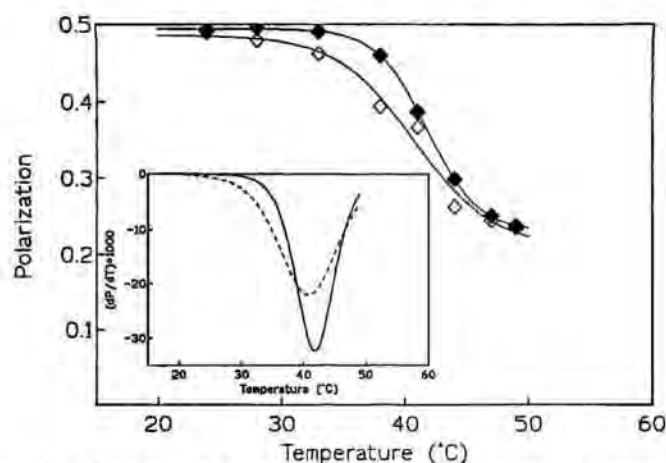


Figura 6.15 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/DPPE (9:1) marcados con DPH en ausencia (♦) o presencia de MAP₄V1 (◊). Inset: Análisis de la primera derivada en ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄V1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la tabla 6.9 se detallan los valores de polarización de fluorescencia en estado gel y en estado cristal líquido, para las sondas DPH y ANS.

Tabla 6.9 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄VP1 en los liposomas SUVs de DPPC-DPPE.

Marcador	T < T _c (29 °C)		T > T _c (47 °C)	
	Ausencia	+MAP ₄ VP1	Ausencia	+MAP ₄ VP1
DPH	0.496±0.007	0.480±0.009(-)	0.247±0.006	0.244±0.005(=)
ANS	0.378±0.003	0.377±0.003(=)	0.328±0.004	0.266±0.007(-)

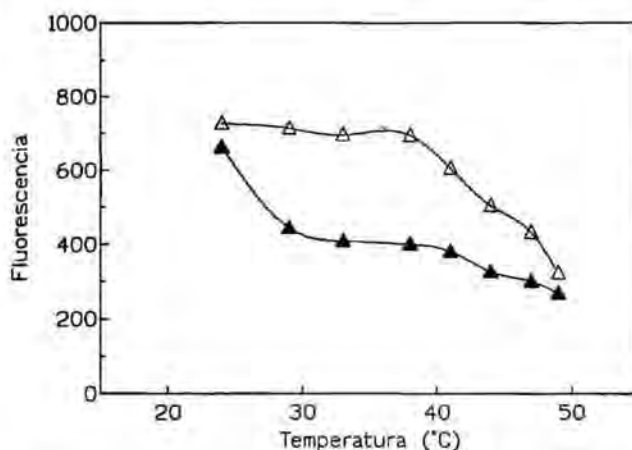
Al ajustar las curvas de polarización de fluorescencia a la ecuación 10 (apartado 5.3.1 de resultados y discusión) se calculan las temperaturas de transición (T_c). Los valores de la temperatura de transición para las vesículas de DPPC-DPPE no varían en presencia o ausencia de MAP₄VP1 (tabla 6.10).

Tabla 6.10 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-PE.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ VP1	I C al 95%
DPPC-PE	41.8	41.6-41.9	40.8	38.0-43.5

6.1.6 Interacción de MAP₄VP1 con liposomas de DPPC-CL (9:1)

La intensidad de fluorescencia de los liposomas DPPC-CL con ANS depende de la temperatura, ya que disminuye con ella. La presencia MAP₄VP1 da valores de fluorescencia mayores en todo el rango de temperatura y la intensidad empieza a disminuir alrededor de 41 °C. En los liposomas de DPPC-CL control, la fluorescencia se reduce rápidamente a T < T_c y luego disminuye más paulatinamente. La posición del máximo de emisión situado alrededor de 465 nm no varía en ninguna de las muestras ensayadas, lo cual indica que el entorno de las moléculas de ANS no se modifica con la temperatura. Además la presencia del péptido MAP₄VP1 con carga negativa favorecerá las interacciones repulsivas con las cargas negativas de la cardiolipina.

**Figura 6.16** Intensidad de fluorescencia de liposomas SUVs de DPPC-CL(9:1) con el fluoróforo, A)ANS, cuando fueron calentados en presencia (Δ) o ausencia (▲)de MAP₄VP1. Concentración de péptido 5 μM, concentración de lípido 0.4 mM. Experimentos realizados en solución de acetato (TAC) 0.25 M pH 7.4.

La intensidad de fluorescencia para la sonda DPH (no se muestra) disminuye al aumentar la temperatura de modo gradual y la presencia de péptido no afecta a la intensidad. La posición del máximo de fluorescencia tampoco varía. A nivel del interior de las bicapas lipídicas el entorno del DPH no se modifica.

En la figura 6.17 se muestra la polarización de fluorescencia del ANS respecto a la temperatura para liposomas, DPPC-CL control o con MAP₄VP1. El péptido interactúa a nivel de la región polar, fluidificando la bicapa. De manera que la movilidad de las cabezas polares de los fosfolípidos se ve incrementada en presencia del péptido, como también sucede para la arbutinina en presencia de liposomas aniónicos conteniendo un 20% de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) (Hincha, 1999).

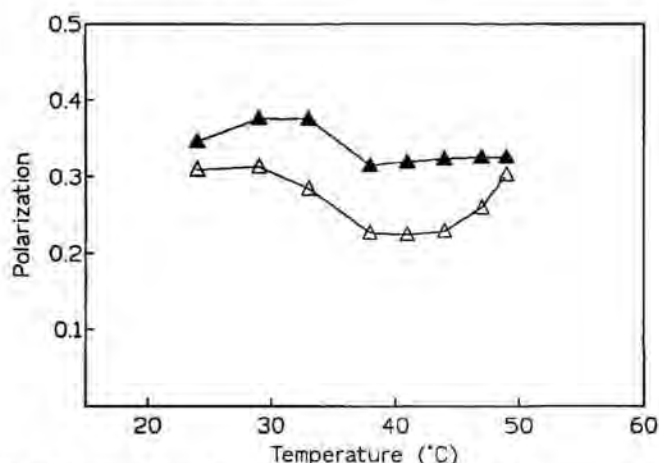


Figura 6.17 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/ CL (9:1) marcados con ANS en ausencia (▲) o presencia de MAP₄VP1 (△). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la figura 6.18 se muestra la variación de polarización de fluorescencia respecto a la temperatura a nivel de la zona hidrófoba de la membrana de DPPC-CL. La presencia del MAP₄VP1 reduce la temperatura de transición T_c en 2.4°C. El péptido en su interacción con la bicapa aumenta la movilidad de las cadenas alquílicas de los lípidos en el intervalo de temperaturas en que se produce la transición de fase, pero no se observan modificaciones de fluidez previamente a la transición ni una vez producida.

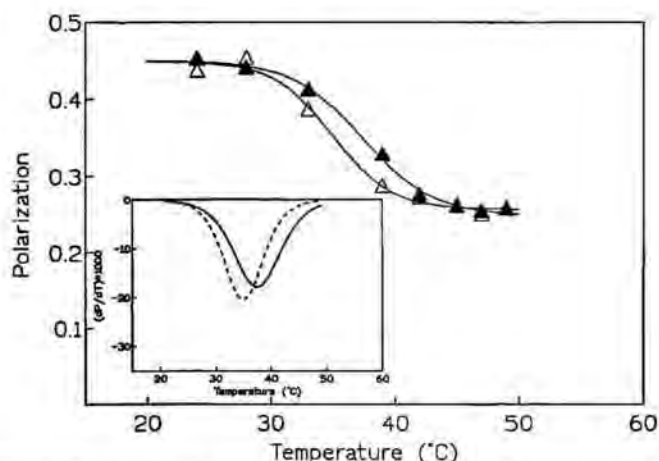


Figura 6. 18 Polarización de fluorescencia respecto a la temperatura de liposomas SUVs de DPPC/ CL (9:1) marcados con DPH en ausencia (▲) o presencia de MAP₄VP1 (△). Inset: Análisis de la primera derivada en

ausencia (línea continua) o en presencia de MAP₄VP1 (línea discontinua). Experimentos realizados en solución de acetato 0.25 M pH 7.4. Relación molar lípido/péptido 90:1.

En la tabla 6.11 observamos que tanto en estado gel como cristal líquido no se producen cambios de fluidez de la bicapa para la sonda DPH por efecto del péptido.

Tabla 6.11 Cambios en la fluidez de la membrana (Polarización) inducido por el MAP₄VP1 en los liposomas SUVs de DPPC-CL.

Marcador	T < T _c (29 °C)		T > T _c (49 °C)	
	Ausencia	+MAP ₄ VP1	Ausencia	+MAP ₄ VP1
DPH	0.450±0.006	0.452±0.008(=)	0.256±0.001	0.257±0.004(=)
ANS	0.376±0.003	0.313±0.002(-)	0.325±0.001	0.302±0.009(-)

Al ajustar las curvas de polarización de fluorescencia a la ecuación 10 (apartado 5.3.1 de resultados y discusión) se calculan las temperaturas de transición (T_c). Los valores de la temperatura de transición para las vesículas de DPPC-CL varía en presencia o ausencia de MAP₄VP1 (Tabla 6.12).

Tabla 6.12 Valores de temperatura de transición de la fase gel a la de cristal líquido para liposomas SUVs de DPPC-CL.

Liposomas	T _c (°C)			
	Ausencia	I C al 95%	+MAP ₄ VP1	I C al 95%
DPPC-CL	37.4	36.3-38.6	35.0	33.2-36.8

6.2 INTEGRIDAD DE LAS VESICULAS EN PRESENCIA DE MAP₄VP1

6.2.1 Liberación de Carboxifluoresceína (CF) encapsulada en el interior de las vesículas

En esta parte del estudio se determinó si la interacción de MAP₄VP1 con los distintos tipos de liposomas SUVs inducía alteraciones de la permeabilidad de las vesículas. Para ello, los liposomas de la composición deseada se prepararon encapsulando en su interior el marcador fluorescente carboxifluoresceína (CF) a una concentración elevada, suficiente para que se produzca el efecto de autoapantallamiento, y se estudió la liberación de CF con el tiempo en presencia del péptido, siguiendo el aumento de la intensidad de fluorescencia al diluirse el marcador en el medio acuoso. Para estos experimentos la concentración de lípido fue 71 μM y de péptido 5 μM, y se realizaron en solución de acetato 0.25 M, pH 7.4.

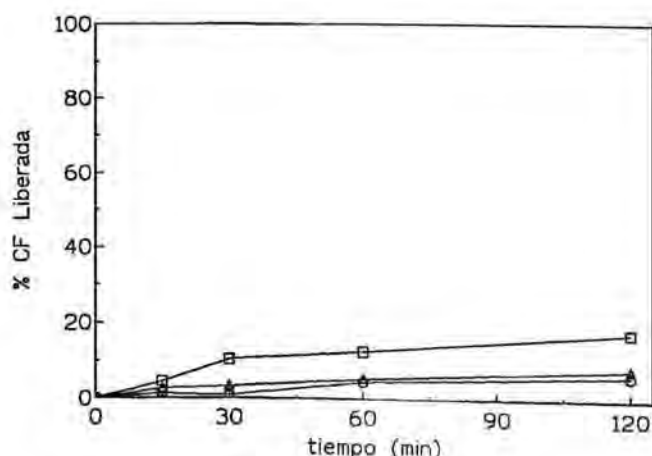


Figura 6.19 Liberación de carboxifluoresceína de los liposomas DPPC, DPPC-SA(9.5:0.5) DPPC/PI (9:1) al ser incubados con MAP₄VP1 a un relación lípido-péptido 14:1 (mol:mol). Concentración lipídica de 71 μ M. Los experimentos se llevaron a cabo a 20°C con una solución de acetato 0.25 M a pH 7.4 y con agitación mecánica.

En la figura 6.19 se muestran las cinéticas de liberación de CF de los diferentes liposomas. Se puede observar que en los liposomas catiónicos de DPPC-SA se produce la mayor permeabilización, con un 10 % de liberación a los 30 minutos de la adición de MAP₄VP1, que alcanza un 20% a las dos horas. La permeabilización es lenta, lo que sugiere un proceso de fusión de membranas. En liposomas de DPPC y DPPC-PI se observa muy poca permeabilización en presencia del péptido, siendo esta insignificante durante los primeros 20 minutos, y alcanzando menos de un 5% a los 60 minutos.

6.2.2 Accesibilidad de los fosfolípidos de la monocapa interna

La interacción de MAP₄VP1 con las membranas de liposomas SUVs DPPC, DPPC-PI (9:1), DPPC-SA (9.5:0.5), además de su efecto sobre la estabilidad de las mismas se determina mediante la fluorescencia de la sonda NBD que se encuentra a ambos lados de la membrana. Al entrar en contacto la sonda NBD con el agente reductor ditionito este deja de emitir fluorescencia con el tiempo. El ensayo se realiza según se describe en el apartado 3.2.6.2 de materiales y métodos.

Al considerar liposomas de DPPC observamos que la fracción de ditionito apantallada por NBD no cambia en presencia de MAP₄VP1 ni siquiera a alta concentración de péptido 10 mol%.

La unión a las vesículas catiónicas resulta en un incremento de la cantidad de lípido que es accesible al reactivo sugiriendo a la vez liberación o disrupción de las vesículas o lípid flip-flop. El 55% del lípido reacciona con el ditionito y este valor se incrementa hasta un 64% cuando la concentración de péptido es de 5 mol% y de 68 % con un 15%mol de péptido (Figura 6.20)

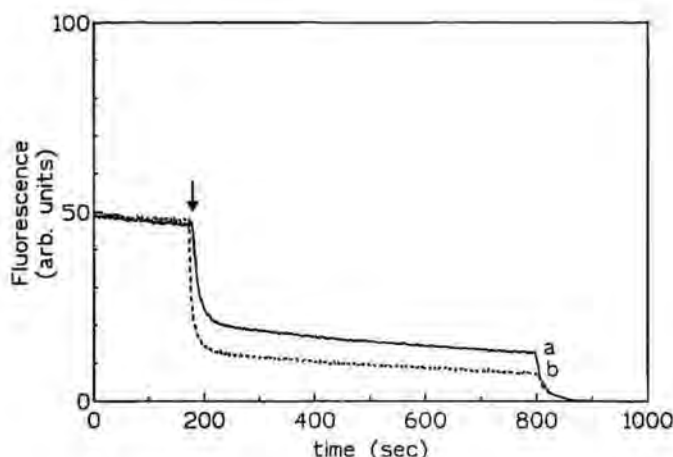


Figura 6.20 El registro de la pérdida de fluorescencia del NBD-PE por acción del ditionito en función del tiempo. El ditionito se adiciona a una suspensión de vesículas de DPPC-SA(16 μ M) en 10 mM Tris a pH 7.4 sin MAP₄VP1 y en presencia de 15 mol% de MAP₄VP1. Al final se añade deoxicolato a una concentración final de 2.2 mM para que se reduzca el marcador de la monocapa interna.

En cambio para las vesículas aniónicas se observa como éstas son totalmente permeables al ditionito con o sin péptido.

6.3 MEZCLA DE LÍPIDOS ENTRE VESÍCULAS DETERMINADA POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA POR RESONANCIA (T.E.R)

El ensayo basado en la transferencia de energía por resonancia TER entre dos fosfolípidos con grupos fluorescentes entre diferentes vesículas DPPC, DPPC-PI (9:1) y DPPC-SA (9.5:0.5) originado por el péptido MAP₄VP1 para evaluar si existe agregación o mezcla de lípidos entre ellas se realiza según el apartado de materiales y métodos 3.2.5. Las representaciones gráficas de las mezclas de lípido en función del tiempo se muestran en la figura 6.21.

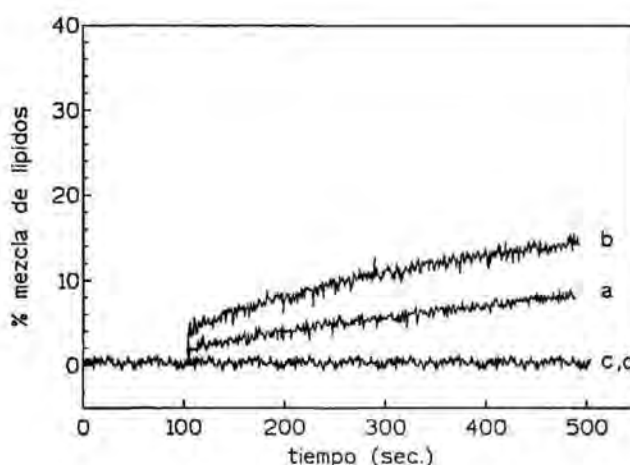


Figura 6.21 Cinética de mezcla de lípidos provocada por MAP₄VP1 en función de la fracción molar de péptido en liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5) cuando a) 1.5 mol% b) 3 mol%, c) en liposomas de DPPC-PI con un 6 mol% péptido y d) en liposomas de DPPC con un 0.6 mol%. El péptido se añade a una mezcla de vesículas con 0.6% NBD-PE y Rh-PE en solución tamponada de Tris 10 mM pH 7.4. Concentración de lípido es de 134 μ M. Excitación a 460 nm y emisión a 530 nm.

En las vesículas zwitterónicas de DPPC no se produce fusión es decir, no se mezclan los fosfolípidos de membrana. Al igual que en el ensayo de liposomas de DPPC-PI (9:1) tampoco se produce mezcla de lípidos (figura 6.21; c,d). Sin embargo, en los dos casos se produce una liberación mínima del contenido acuoso, sobre un 10 % para las vesículas neutras y en menor extensión para las aniónica

Al considerar los liposomas de DPPC-SA (9.5:0.5) cuando a estos se adiciona MAP₄VP1 primero se desestabiliza la membrana de forma rápida, y después se produce una fusión lenta, que se caracteriza por una mezcla de lípidos dependiente del tiempo.

Interacción de MAP₄VP1 con las vesículas lipídicas: consideraciones finales.

El MAP₄VP1 tienen carácter anfipático y al pH del estudio presenta carga neta negativa. La unión del péptido a los liposomas zwitterónicos de DPPC disminuye el empaquetamiento de la bicapa sin alterar la permeabilidad, ni inducir fusión de vesículas, al igual que se observa para un fragmento de laminina con liposomas de DPPC (Juvé, 1998). Cuando se consideran los liposomas de DPPC-DPPE (9:1) también disminuye el empaquetamiento de la bicapa, pero se pierde cooperatividad en el proceso de cristal líquido a gel. Por otro lado la unión del péptido a las vesículas catiónicas da lugar a una desestabilización de la bicapa, producida por una permeabilización de la misma junto con una mezcla de lípidos tiempo dependiente y con liberación del contenido acuoso de sus vesículas. Así, el péptido induce fusión de los liposomas catiónicos a pH neutro. Este proceso de desestabilización de la bicapa se produce con una fluidificación de la bicapa disminuyendo la temperatura de transición pero manteniendo la cooperatividad del proceso. Todo ello nos indica que entre el péptido y los liposomas existe interacción con un importante componente electrostático. Al estudiar el efecto del péptido en las vesículas aniónicas en el caso de las de DPPC-PI (9:1) son totalmente permeables al ditonito pero sin producir fusión ni liberación del contenido acuoso. Por otro lado la presencia de MAP₄VP1 tiene poco efecto en la fluidez de las cadenas alquílicas, a nivel del interior de la bicapa ya que no se producen cambios significantes en la movilidad del marcador DPH. De manera que MAP₄VP1 no se inserta en las vesículas aniónicas del mismo modo que sucede en los estudios de cinéticas donde la presión límite es 21 mN/m para las monocapas de DPPC-Pi/péptido. Al considerar a los restante liposomas de carácter aniónico DPPC-PG (9:1) y DPPC-CL (9:1) en los dos casos disminuye la rigidez de las bicapas, y su temperatura de transición, aunque la cooperatividad del proceso por la presencia del péptido solo se incrementa para las vesículas de DPPC-CL. Al considerar a las vesículas aniónica y al ser el péptido también aniónico entre ellos se establecen repulsiones electrostáticas lo que dificulta la inserción de MAP₄VP1 a dichas membranas.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los tetrámeros peptídicos MAP₄VP1 (11-25) y MAP₄VP3(110-121) presentan una importante actividad superficial y forman monocapas estables en la interfase aire/agua, como corresponde a su carácter anfipático.
2. Los componentes de los modelos de membrana utilizados en este estudio, DPPC-PI y DPPC-SA, forman mezclas ideales en la interfase agua/aire. Las pequeñas desviaciones de la regla de la aditividad que se producen en determinadas mezclas llevan asociadas energías muy débiles, y el análisis termodinámico proporciona valores de ΔG_M^{Ex} y ΔH indicativos de mezclas ideales.
3. Se han obtenido imágenes por AFM de monocapas de DPPC, DPPC-PI (9:1) y DPPC:SA (9:1) seleccionadas a partir de los ensayos de miscibilidad, transferidas en un soporte de mica. Las imágenes son en general consistentes con la formación de mezclas ideales de los componentes, si bien se observan diferentes estados de ordenación o fases según la composición.
4. Las monocapas mixtas de MAP₄VP1(11-25) o MAP₄VP3(110-121) con DPPC, DPPC/PI (9:1) o DPPC/SA (9:1) son estables, y los péptidos permanecen unidos a la monocapa incluso a elevadas presiones superficiales.
5. Todas las mezclas lípido/péptido ensayadas cumplen la regla de la aditividad, con pequeñas desviaciones no significativas, como se deduce de los parámetros termodinámicos calculados a partir del análisis de las isothermas de compresión de las monocapas mixtas.
6. Tanto MAP₄VP1(11-25) como MAP₄VP3(110-121) se incorporan a monocapas de diferente carga eléctrica: zwitteriónicas (DPPC), aniónicas (DPPC/PI) y catiónicas (DPPC/SA). Esto sugiere que la interacción de estos péptidos con la membrana presenta un importante componente hidrofóbico. Sin embargo, la penetración es más importante en monocapas catiónicas, lo que implica la existencia de un componente electrostático que se explica por el carácter aniónico de ambos péptidos al pH de los experimentos (pH 7.5).
7. MAP₄VP3(110-121) se incorpora a liposomas unilaminares de DPPC, DPPC/SA 9:1 y DPPC/PI (9:1), modificando las propiedades fisicoquímicas de la membrana. La estequiometría de unión no depende de la composición de la membrana, lo que confirma la importancia del componente hidrofóbico en la interacción. Sin embargo, el péptido adopta formas con diferente actividad en función de la carga eléctrica de la membrana.
 - En las vesículas catiónicas se produce una disminución de la movilidad lateral de los lípidos y un incremento de la temperatura de transición de fase, lo que indica que no se altera la estructura de bicapa. Sin embargo, se produce fusión de membranas con pérdida del contenido encapsulado.
 - En vesículas zwitteriónicas también aumenta el grado de empaquetamiento de los fosfolípidos, pero no se observa la desestabilización de las vesículas.

- En vesículas aniónicas, la unión del también aniónico MAP₄VP3(110-121) da lugar a una mayor rigidez de la membrana, y un incremento en la cooperatividad del proceso de transición de fase y de la temperatura de transición. Estos cambios van acompañados de la permeabilización de la membrana sin que se produzca fusión ni solubilización de las vesículas.
8. MAP₄VPI(11-25) se une a liposomas unilaminares de DPPC, DPPC/SA (9:1) y DPPC/PI (9:1).
- En los tres casos, el péptido induce la fluidificación de las membranas tanto en el estado de gel como en el de cristal líquido. El efecto es más importante a nivel del interior hidrofóbico de la membrana que en la zona determinada por las cabezas polares de los fosfolípidos.
 - En vesículas catiónicas, se produce una mezcla de lípidos entre vesículas acompañada de la permeabilización de la membrana, lo que sugiere la inducción de la fusión de membranas.
 - En vesículas zwitteriónicas y aniónicas, la unión del péptido no tiene un efecto desestabilizador de las membranas.

Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Abousalham, A. Fotiadu, F. Buono, G. Verger, R. 2000. Surface properties of unsaturated non-oxidized and oxidized free fatty acids spread as monomolecular films at an argon/water interface. *Chem.Phys.Lipids* **104**:93-99.

Albrecht, O., Gruler, H., Sackmann, E. 1978. Polymorphism of phospholipid monolayers. *Le Journal de Physique* **39**: 301-313.

Allison, A.C. and Gregoriadis, G. 1974. Liposomes as immunological adjuvant. *Nature* **252**:252.

Alsina, M.A.; Mestres, C.; Rabanal, F.; Busquets, M.A.; Reig, F. 1993. Miscibility of HBV peptides and dipalmitoylphosphatidylcholine in monolayers. *Langumir* **9**(4):1129-1133.

Alsina, M.A.; Mestres, C.; García-Antón, J.M.; Espina, M.; Haro, I.; Reig, F. 1991. Interaction energies of cholesterol phosphatidylserine and phosphatidylcholine in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Langumir* **7**: 975-977.

Alsina, M.A. Perez, J.A. Garcia, M. Reig, F. Haro, I. 1997. Interactions of tetraavalent branched peptide from VP3 capsid protein of hepatitis A virus with monolayers as biomembrane models. *Supramolec.Sci.* **4**:195-199.

Alving, C.R., Steck, E.A. Chapman, W.L. Waits, V.B. Hendricks, L.D. Swartz, E.M. and Hanson, W.L. 1978. Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposomes-encapsulated drugs. *Proc. Nactl. Acad. Sci. USA* **75**:2959-2963.

Alving, C.R. 1987. In liposomes: from biophysics to therapeutics. Ostro, M.T., Marcel Dekker, Eds. NewYork. p-178.

Alving, C.R. 1991. Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J. of Immunological Methods* **140**:1-13.

Alving, C.R. 1992. Immunological aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigen. *Biochem.Biophys. Acta* **1113**: 307-372.

Arnon, R. 1991. Synthetic peptides as the basis for vaccine design. *Mol. Immunol.* **28**: 209-215.

Bangham, A.D. & Horne, R.W. 1964. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* **8**: 660-668.

Barenholz, Y. Amselem, S. Lichtenberg, D. 1979. A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes). *FEBS Lett.* **99**: 210-214.

Barlett, G.R.J. 1959. Phosphorous assay in column chromatography. *J Biol.Chem.* **234**:466-468.

Bashford, L., Morgan, Ch.G. & Radda, G.K. 1976. Measurement and interpretation of fluorescence polarization in phospholipids dispersions. *Biochem.Biophys. Acta* **426**:157-172.

Batzri, S., Korn, E.D. 1979. Interaction of phospholipid vesicles with cells. Endocytosis and fusion as alternate mechanism for the uptake of lipid-soluble and water-soluble molecules. *J.of cell biol.* **66**(3):621-634.

Benachir, T., Lafleur, M. 1995. Study of vesicles leakage induced by melittin. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**(2):452-460.

Benga, G. 1985. *Structure and Properties of Cell Membranes* vol.III. CRC Press, Boca Raton.

Bentley, K.L. Thompson, L.K. Klebe, R.J. and Horowitz, P.M. 1985. Fluorescence polarization: a general method for measuring ligand binding and membrane microviscosity. *BioTechniques* **3**(5):356-366

Binning, G.; Quate, C.F.; Gerber, Ch. 1986. Atomic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **56**:930 – 933.

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

Birdi, K.S.1986. Dipalmitoyllecithin monolayers at air/water interface. *Langmuir* **3**:132-133.

Birdi, K.S. Vu, D.T. 1994. Structures of collapsed lipid monolayers investigated as langmuir-blodgett films by atomic force microscopy. *Langmuir* **10**:623-625.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. & Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth-disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* (London) **298**:30-33.

Blodgett, K.B. 1935. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**:1007-1022.

Bosch, A., González-Dankaart, J.F., Haro, I., Gajardo, R., Pérez, J.A. and Pintó, R.M. 1998. A new continuous epitope of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **54**: 95-102.

Brandsch, R., Bar, G., Whangbo, M.H. 1997. On the factors affecting the contrast of height and phase images on tapping mode atomic force microscopy. *Langmuir* **13**: 6349-6353.

- Briand, J.P., Muller, S. & Van Regenmortel, M.H.V. 1985. Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immunol. Methods* **78**:59-69.
- Brockman, H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?. *Curr. Opin. Structural Biol.* **9**:438-443.
- Burstein, E.A. Vedenkina N.S. Ivkova, M.N. 1973. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* **18**:263-279.
- Bustamante, C., Erie, D.A., Keller, D. 1994. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr. Opin. Structur. Biol* **4**: 750-760.
- Cadenhead, D.A. Muller-Landau, F. Kellner, B.M.J. 1980. Phase transitions in insoluble one and two component films at the air/water interface. In Ordering in two dimensions. Sinha, S.K. ed. Elsevier North Holland, Amsterdam. 73-81.
- Cajal, Y., Rabanal, F., Alsina, M.A. and Reig, F. 1995. A fluorescence and CD study on the interaction of synthetic lipophilic hepatitis B virus preS (120-145) peptides analogues with phospholipid vesicles. *Biopolymers* **38**: 607-618.
- Cajal, Y. Boggs, J. Jain, M. K. 1997. Salt-triggered Exchange of Phospholipids and Hemifusion by Myelin Basic Protein. *Biochemistry* **36**:2566-2576.
- Cajal, Y., Alsina, M.A., Reig, F., Rodriguez, L., Mestres, C. and Haro, I. 1998a. Interaction of a multiple antigenic peptide of hepatitis A virus with monolayers and bilayers of acidic, basic and zwitterionic phospholipids. *J. Col. and Interface Science* **198**:78-86.
- Cajal, Y. Prat, J. Svendsen, A. De Bolós, J. Alsina, M. A. 1998b. Spectroscopic studies on the interfacial binding of Humicola lanuginosa lipase. *Analyst* **123**:2229-2233.
- Cappuzzi, G., Lo Nostro, P., KulKarni, K., Fernández, J.E. 1996. Mixtures of stearyl-6-O-ascorbic acid and α -Tocopherol: a monolayer study at gas /water interface. *Langmuir* **12**:3957-3963.
- Castuma, C.E. Brenner, R.R. 1989. The influence of fatty acid unsaturation and physical properties of microsomal membrane phospholipids on UDP-glucosyltransferase activity. *Biochem.J* **258**:723-731.
- Castuma, C.E. Crooke, E. Kornberg, A. 1993. Fluid membranes with acidic domains activate DnaA, the initiator protein of replication in escherichia coli. *J. Biol. Chem* **263**:24665-24668.
- Caaveiro, J.M. Echabe, I. Gutierrez-Aguirre, I. Nieva, J.L. Arrondo, R.. González-Mañas, J.M. 2001. Differential interaction of Equinatoxin II with model membranes in response to lipid composition. *Biophys. J.* **80**(3):1343-1353.
- Chapman, D. 1975. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Quant. Rev. Biophys.* **8**(2): 185-235.

Chávez, A.; Pujol, M.; Haro, I.; Alsina, M.A.; Cajal, Y. 1999. Miscibility of the hepatocyte membrane. Lipids at the air/water interface and interaction with the sequence (110-121) of the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. *Langmuir* **15**(4): 1101-1107.

Chávez, A. Pujol, M. Haro, I. Alsina, M.A. Cajal, Y. 2001. Membrane fusion by an RGD-containing sequence from the core protein VP3 of Hepatitis A virus and RGA – analogue: implications for viral infection. *Biopoly* **58**:63-77

Chi, L.F. Fuch, H.; Jonhston, R.R. Ringsdorf, H. 1994. Investigations of phase separated Langmuir-Blodgett films by atomic force microscopy. *Thin solid film* **242**:151-156.

Cho, D. Narsimhan, G. Franses, E.I. 1997. Interactions of spread lecithin monolayers with bovine serum albumin in aqueous solution. *Langmuir* **13**:4710-4715.

Cowgill, R.W. 1967. Fluorescence and protein structure. X. Reappraisal of solvent and structural effects. *Biochim.Biophys.Acta* **133**: 6-18.

Crane, J.; Putz, G.; Stephane, B.H. 1999. Persistence of phase coexistence in disaturated phosphatidylcholine monolayers at high surface pressures. *J. Biophys.* **77**: 3134-3143.

Cromeans, T., Sobsey, M.D. & Fields, H.A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **22** (1): 45-56.

Cserhádi, T., Szögyi, M. 1992. Interaction of phospholipids with proteins and peptides. New advances 1990. *Int.J.Biochem.* **24**(4): 525-537.

Damen, J.A., Regts, J., Scherphof, G. 1976. *Biochim.Biophys.Acta* **443**:629-634.

Davies, J.T.; Rideal, E. K. 1963. *Interfacial Phenomena*, 2nd ed.; Academic Press: New York and London. p 265.

Davies, R.J., Jones, M.N. 1986. The interaction of liposomes containing intrinsic erythrocyte membrane proteins with lipid monolayer at air/water and oil/water interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* **858**: 135-144.

Davis, D. And Gregoriadis, G. 1989. Primary immune response to liposomal tetanus toxoid in mice: The effect of mediators. *Immunology* **68**(2): 277-282.

Deamer, D.W., Bangham, A.D. 1976. Large volumen liposomes by an ether vaporization method. *Biochim. Biophys. Acta* **443**:629-634.

Deinhardt, F. 1992. Prevention of viral hepatitis A: past, present and future. *Vaccine* **10** (suppl.1):10-14.

Deleu, M.; Paquot, M.; Jaques, P.; Thonart, P.; Adriaensen, Y.; Dufrière, Y.F. 1999.

Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers. *J. Biophys.* **77**: 2304-2310.

Dervichian, D.G. 1939. A new technique for spreading of proteins and spreading number. *Nature* **144**:25-34.

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

DeWolf, C.; Leporatti, S.; Kirsch, C.; Klinger, R.; Brezesinski, G. 1999. Phase separation in phosphatidylinositol/phosphatidylcholine mixed monolayers. *Chem. and Phys. of Lipids* **97**: 129-138.

Digital Instruments (di).
<http://www.di.com/AppNotes/TapMode/Main.html>, 1998.

Di Marchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. & Mowat, N. 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**:639-641.

Dowhan, W. 1997. Molecular basis for Membrane phospholipid diversity: Why are so many lipids?. *Annu.Rev.Biochem.* **66**: 199-232.

Dufrêne Y.F.; Barger, W.R.; Green, J-B. D.; Lee, G.U. 1997. Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers. *Langmuir* **13**: 4779—4784.

Düzgünes, N., Allen, T.M., Fedor, J., and Papahadjopoulos, D. 1987. Lipid mixing during membrane aggregation and fusion. Why fusion assays disagree. *Biochemistry* **26**: 8435.

Edelman, R.M. 1980. Vaccine adjuvants review. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 370-383.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. & Boger, J. 1985. Induction of Hepatitis A virus neutralizing antibodies by a virus specific synthetic peptide. *J. Virol.*, **55**:836-839.

Epanand, R.M. 1993. En: The amphipathic helix. ed. CRC Press. p.174.

Epanand, R.M. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim.Biophys.Acta.* **1376**:353-368.

Fang, J.; Knobler, C.M. 1995. Control of density in self assembled organosilane monolayers by langmuir-blodgett deposition. *J.Phys.Chem.* **99**: 10425-10429.

Farhood, H.; Servina, N.; Huang, L. 1995. The role of dioleoylphosphatidylethanolamine in cationic liposomes mediated gene transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1235**: 289-295.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop,

J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 7413.

Fernandez, A. Alsina, M.A. Haro, I. Galantai, R. Reig, F. 1998. Synthesis and Physicochemical characterization of cyclic laminin related peptide. *Langmuir* **14**:3625-3630

Fidelio, G.D., Austen, B.M., Chapman, D., Lucy, J.A. 1986. Properties of signal-sequencepeptides at an air-water interface. *Biochem. J.* **238**: 301-304.

Fields, G.B. & Noble, R.L. 1990. Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35** (3): 161-214.

Forssen, E.A., Tökes, Z.A.. 1979. In vitro and in vivo studies with adriamycin liposomes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **91**: 1295-1301.

Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., Mc Ginn, B., Rowlands, D.J., Brown, F. 1989. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD(arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.* **70**: 625-637.

Francis, M.J., Hastings, G.Z., Brown, F., Mc Dermod, J., Lu, Y.-A. & Tam, J.P. 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* **73**: 249.

Francki, R.I.B., Fauquet, M., Knudson, D.L.K. & Brown, F., (Eds). 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth report international committee on taxonomy of virus. *Arch. Virol.* **2** (suppl.2): 320-26.

Freifelder, D. 1991. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Ed Reverté mexicana. Chap.15: 477-497.

Frosner, G.G. 1983. En *Viral hepatitis: Laboratory and Clinical Science*, F. Deinhardt, J. Deinhardt (eds), Marcel Dekker, Inc., New York. pp.201-213..

Gaines, G.L. 1966a. The properties of liquid surfaces. En *Insoluble monolayers at Liquid-Gas interfaces*. Ed. Wiley- Interscience Publishers: New York. p. 24-25.

Gaines, G.L. 1966b. In *Insolubles monolayers at Liquid-Gas Interfaces*; Wiley-Interscience Publishers: New York. p. 286.

Galvain, S., André, C., Vatrinet, C. Villet, B. 1999. Safety and efficacy studies of liposomes in specific immunotherapy *Current Therapeutic Research* **60**(5): 278-294.

Gao, X. and Huang, L. 1991. A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 280.

García, M. Pujol, M. Reig, F. Alsina, M.A. Haro, I. 1996. Synthesis, lipophilic derivatization and interaction with liposomes of HVA-VP3 (102-121) sequence by using

spectroscopic techniques. *Analyst* **121** :1583-1588.

Garnaes, J., Schwartz, K., Viswanathan, R., Zasadzinski, J.A.N. 1992. Domain boundaries and blucking superstructures in langmuir blodgett films. *Nature* **357**: 54-57.

George, J. 1992. In Preparation of Thin film; Marcel Dekker Inc, New-YorK.

Glastone, S. 1972. In Thermodynamics for Chemists; Ed. Aguilar (spanish version). Chapter XIV.

Gómara, M.J. 2000. Péptidos sintéticos en el diseño de inmunógenos y en el desarrollo de sistemas de diagnóstico de la hepatitis A. Tesis Doctoral: p201.

Goodman-Snitkoff, G., Eisele, L.E., Heimer, E.P., Felix, A.M., Andersen, T.T., Fuerst, T.R. and Mannino, R.J. 1990. Defining minimal requirements for antibody production to peptide antigens. *Vaccine* **8**(3): 257-262.

Goodrich, F.C. 1957. *Proceedings of the 11th International Congress on Surface Activity*, Butterworths, London **85**.

Gorostiza, P. 1994. Tesis de licenciatura: Electroless metal deposition on silicon (100) from HF-solutions studied by AFM.. Universidad de Barcelona.

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

Gregoriadis, G., Tan, L. & Xiao, Q. 1989. The immunoadjuvant action of liposomes: role of structural characteristics. En Gregoriadis, G., Allison, A.C. & Poste, G.: *Immunological Adjuvants and Vaccines*. NATO ASI Series. Series A: Life Sciences **179**:79-94. Plenum Press, New York.

Gregoriadis, G., Florence, A.T. 1993. Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* **45**(1): 15-28.

Hadler, S.C. 1991. In *Viral hepatitis and liver disease*, Hollinger F.B., Lemon, S.M., and Margiolis, H.S., eds., Williams & Wilkins, Baltimore. pp.14-20.

Hagen, A.J., Oliver, C.N. and Sitrin, R.D. 1996. Optimization of poly(ethylene glycol) precipitation of hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. *Biotechnol. Prog.* **12**: 406-412.

Hansma, H.G. 1996. Atomic force microscopy of biomolecules. *J.Vac.Sci.Technol.B* **14**: 1390-1394.

Hansma, H.G., Kim, K.J., Laney, D.E, Garcia, R.A., Argaman, M., Allen, M.J., Parsons, S.M. 1997. Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: a review. *J.of Structural biology* **119**: 99-108.

Haro, I., Pintó, R.M., González-Dankaart, J.F., Pérez, J.A., Reig, F. And Bosch, A. 1995. Anti-Hepatitis A virus response elicited in mice by different forms of a synthetic VP1. *Microbiol. Immunol.* **39**, 485-490.

Haro, I.; Busquets, M.A.; Ortiz, A.; Reig, F.; Alsina, M.A. 1995. Analysis of perturbation of phospholipid model membranes by a multiple antigenic peptide. *Analytica Chimica Acta* **303**: 57-64.

Haro, I. Pérez, J.A. Reig, F. Mestres, C. Egea, M. A. Alsina, M.A. 1996. Solid-phase synthesis of the exposed capsid peptide VP2 (96-107) of hepatitis A virus. Study of its physicochemical Interactions with phospholipids. *Langmuir* **12**(21):5120-5125

Hilde, A.R.; Demel, A.R.; Van der Eerden, J.P.J.M.; de Kruijff, Ben. 1999. Blistering of langmuir-blodgett bilayers containing anionic phospholipids as observed by atomic force microscopy. *J. Biophys.* **77**(3): 1638-1693.

Hincha, D. Olivr, A. Crowe, J. 1999. Lipid composition determines the effect of arbutin on the stability of membranes. *Biophys.J.* **77**:2024-2034.

Hitzemann, R.J. 1987. Effect of ganglioside, GM1 on the order of phosphatidylcholine-cholesterol multilamellar liposome. A fluorescence polarization study. *Chem.and Phys.of Lipids* **43**: 25-38.

Hoekstra, D. Martin, O.C. 1982. Transbilayer redistribution of phosphatidylethanolamine during fusion of phospholipid vesicles. Dependence on fusion rates, lipid phase separation, and formation of nonbilayer structures. *Biochemistry* **21**:6097-6103.

Hoekstra, D. Buist-Arkema, R. Klappe, K. Reutelingsperger, C.P.M. 1993. Interaction of annexins with membranes: The N-terminus as governing parameter as revealed with a chimeric annexin. *Biochemistry* **32**(51):14194-14202.

Hoekstra, D. Engberts. J.B.F.N. 1995. Vesicle-forming synthetic amphiphiles. *Biochim.Biophys.Acta.* **1241**: 323-340.

Hollars, C.W.; Dunn, R.C. 1998. Submicron structure in L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers and bilayers probed with confocal, atomic force, and near-field microscopy. *J. Biophys.* **75**(1): 342-353.

Hopp, T.P. & Woods, K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:3824-3828.

Huang, C.H. 1969. Studies of phosphatidylcholine vesicles, formation and physical characteristics. *Biochemistry* **8**: 344-352.

Hui, G.S., Chang, S.P., Gibson, H., Hashimoto, A., Hashiro, C., Barr, P.J. and Kotani, S. 1991. Influence of adjuvants on the antibody specificity to the plasmodium

falciparum major merozoite surface protein, gp195. *J.Immunol.* **147**: 3935-3941.

Hui, S.W., Langner, M., Zhao, Y.L., Ross, P., Hurley, E., Chan, K. 1996. The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys.J.* **71**:590-599.

Jacobs, R.E. & White, S.H. 1989. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: Implications for the insertion of transbilayer helices. *Biochemistry* **28**:3421-3437.

Jain, M. K. DeHaas, G. H. Marecek, J. F. Ramirez, F. 1986. The affinity of phospholipase A2 for the interface of the substrate and analogs. *Biochem.Biophys.Acta* **860**:475-483.

Jilg, W., Dienhardt, F., Hilleman, M. 1994. Hepatitis A Vaccine, In: Vaccines, (Stanley A. Plotkin & Edward A. Mortimer, Eds.), 2nd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, P. pp.583-595.

Joos, P. 1969. *Bull. Soc. Belg.* **78**: 207-217.

Joos, P.; Ruysen, R.; Miñones, J.; García Fernández, S.; Sanz Pedrero, P. 1969. *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.* **66**:1665.

Joos, P. & Demel, R.A. 1969. The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* **183**:447-457.

Joshi, U.M., Kodavanti, P.R.S., Lockard, V.G. & Mehendale, H.M. 1989. Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis. *Biochem. Biophys. Acta* **1004**:309-320.

Just, M., Berger, R., Drechster, H., Brantschen, S. & Glück, R. 1992. A single vaccination with an inactivated hepatitis A liposome vaccine induces protective antibodies after only two weeks. *Vaccine* **10**:737-739.

Juvé, A. Rodríguez, L. Haro, I. Alsina, M.A. Reig, F. 1998. Location of laminin peptide fragment in phospholipid mono and bilayer. *Colloid and Surf.A* **142**: 1-7.

Kaiser, E.T. Kédzy, F.J. 1984. Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science* **223**: 249-255.

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

Katsu, T., Tasaka, K., Fujita, Y. 1984. Effect of compound 48/80 on the phase transition membrane temperature and permeability of liposomal membrane. *Chem.Pharm.Bull.* **32** (3): 1228-1231.

Kagarwa, Y., Racker, E. 1971. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative

phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **246**: 5477-5487.

Kersten, G.F.A. and Crommelin, D.J.A. 1995. Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**: 117-138.

Kim, S.W., Martin, G.M. 1981. Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution. *Biochim. Biophys. Acta* **649**: 1-9.

Kimura, S. & Erne, D.R. 1992. Interaction of glucagon with artificial lipid bilayer membranes. *Int. J. Peptide Protein R.* **39**:431-442.

Kirby, C., Gregoriadis, G. 1984. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* **2**: 979-984.

van Klompenburg, W., de Kruijff, B. The role of anionic lipids in protein insertion and translocation in bacterial membranes (topical review). 1998. *J. Membrane Biol.* **162**: 1-7.

Koppenol, S. Hyuk, Y. Zografi, G. 1997. Mixing of saturated and unsaturated phosphatidylcholines and phosphatidylglycerols in monolayers at the air/water interface. *J. Colloid. Inter. Sci.* **189**:158-166.

Koppenol, S. Francis, H.C. Tsao, H.Y. Zografi, G. 1998. The interaction of lung annexin I with phospholipid monolayers at the air/water interface. *Biochim. Biophys. Acta* **1369**:221-232.

Kroon, D.J. Kupferber, J.P. Kaiser, E.T. Kédzy, F.J. 1978. Mechanism of lipid-protein interaction in lipidproteins. A synthetic peptide lecithin vesicle model. *J. Am. Chem. Soc.* **100**: 979-984.

Kuwajima, K. 1995 In *methods in biomolecular biology*, vol.40: Protein Stability and Folding: theory and practice.p.115-135.

Lachman, P.J., Strangeways, L., Vyakarnam, A. and Evan, G.I. 1991. in *Synthetic Peptides as Antigens*. Ciba Foundation Symposium. Eds. Porter, R. and Whelan, J. John Wiley and Sons, England. pp 25-57.

Lakowicz, J.R. 1983a. Protein Fluorescence, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Chap.11. Plenum Press, New York. pp. 341-382.

Lakowicz, J.R. 1983b. Instrumentation for fluorescence spectroscopy, in *Principles of fluorescence spectroscopy*. Chap.2-3. Plenum Press, New York. pp 19-49.

Langmuir, I. 1917. The constitutions and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **39**:1848-1906.

Langmuir, I. 1920. *Trans. Faraday Soc.* **15**:62-74.

Langner, M., Hui, S.W. 1993. Dithionite penetration through phospholipid bilayers as a measure of defects in lipid molecular packing. *Chem.and Phys.of lipids* **65**(1):23-30.

Lee, A.G. 1977. Lipid phase transitions and phase diagrams. I. Lipid phase transitions. *Biochim. Biophys. Acta* **472**(2): 237-281.

Lemetri, M. Bayard, B. Lebleu, B. 1987. Specific antiviral activity of a poly(L-Lysine) conjugated oligodesoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus in protein mRNA initiation site. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* **84**:648.

Lemon, S.M. 1985. Type A viral hepatitis: new developments in an old disease. *Type New Engl. J. Med.* **313**: 1059-1067.

Lemon, S.M. and Robertson, B.H. 1993. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Seminars in Virology* **4**: 285-295.

Leventis, R. and Silvius, J.R. 1990. Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* **1023**: 124.

Lesserman, L.D. Barbet, J. 1982. In *Methodologie des Liposomes*. De. INSERM, Paris. p 135.

Li, L.H., Hui, S.W. 1997. The effect of lipid molecular packing stress on cationic liposome-induced rabbit erythrocyte fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1323**:105-116.

LIPIDAT (di). <http://wwwlipidat.chemistry.ohio.state.edu>

Lipp, M.H., Lee, K.Y.C., Zasadzinski, J.A. and Waring, A. Phase and morphology changes in lipid monolayers induced by SP-B protein and its amino-terminal peptide. 1996. *Science* **273**: 1196-1199.

Lussow, A.R., Barrios,C., Van Embden, J., Van deer Zee, R., Verdini, A.S., Pessi, A., Louis, J.A., Lambert, P.H., and Del Giudice,G. 1991. Mycobacterial heat shock proteins as carrier molecules.*Eur.J.Immunol.* **21**: 2297-2302.

Machy, P., Leserman, L. 1987. Liposomes in Cell Biology and Pharmacology, Ed.INSERM, John Libbey, London. p:44-46.

Maget-Dana, R, Ptak, M. 1996. Behaviour of insect defensin A at air-water interface.*Colloids and surfaces B* **7**:135-143.

Maget-Dana, R. Ptak, M. 1997. Penetration of insect Defensin A into Phospholipid Monolayers and Formation of Ddefensin A-Lipid complexes. *Biophys.J.* **73**: 2527-2533.

Maget-Dana, R. 1999a. The monolayer Technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 109-140.

Maget-Dana, R., Lelievre, D., Brack, A. 1999b. Surface active properties of amphiphilic sequential isopeptides: comparison between α -helical and β -sheet conformations. *Biopolymers* **49**:415-423.

Maget-Dana, R., Bureaud, N., Schoentgen, F. 1999c. Behaviour of the bovine brain phosphatidylethanolamine binding protein at air/water interface. *Mater.Sci.Eng.C* **8-9**:43-46.

Marsh, D. 1996. Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. *Biophys.J.* **70**(5):2248-2255.

Mayer, L.D., Hope, M.J., Cullis, P.R., Janoff, A.S. 1985. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze thawed multilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **817**(1): 193-196.

Mayhew, E., Lazo, R., Vail, W.J., King, J., Green, A.M. 1984. Characterization of liposomes prepared using microemulsifier. *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 169-174.

McClare, C.W.F. 1971. An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Anal.Bio.Chem.* **39**:527-530.

McIntyre, J.C., Sleight, R.G. 1991. Fluorescence assay for phospholipid membrane asymmetry *Biochemistry* **30**:11819-11827.

Mecheri, S., Dannecker, G., Denning, D., Hoffmann, M.K. 1990. Immunogenic peptides require an undisturbed phospholipid cell membrane environment and must be amphipathic to immobilize IA on B cells. *J.of Immunol.* **144** (4):1369-1374.

Melnick, J.L. 1992. Properties and classification of hepatitis A virus. *Vaccine* **10** (1): 524-526.

Meloen, R.H., Casal, J.I., Dalsgaard, K. And Langeveld, J.P.M. 1995. Synthetic peptide vaccines: success at last. *Vaccine* **13** (10) 885-886.

Mestres, C., Ortiz, A., Haro, I., Reig, F. and Alsina, M.A. 1997. Influence of phospholipidic charge on the interaction of a multiple antigenic peptide from Hepatitis A virus with monolayers and bilayers. *Langmuir* **13**(4): 5669-5673.

Mestres, C., Perez, J.A., Reig, F., Haro, I., Alsina, M.A. 1997. Interaction of hepatitis A peptide VP3 (110-121) with lipid mono and bilayer models of cellular membranes. *Colloid.Polym.Sci.* **275** :946-952

Merrifield, R.B. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J.Am.Chem.Soc.* **85**: 2149-2154.

Milich, D.R. 1989. Synthetic T and B cell recognition sites: implications for vaccine *Adv. Immunol.* **45**: 195-282.

- Mota .F.M.,Busquets, M.A., Reig, F. Alsina, M.A.Haro, I. 1997. Physicochemical study of several peptide constructs based on sequence (96-107) of VP2-HAV Protein. *J.Colloid and InterfaceSci* **188**:81-93.
- Mosmuller, E. W. J. Pap, E. H. W. Visser, A. J. W. G. Engbersen, J. F. J. 1994. Steady-state fluorescence studies on lipase-vesicle interactions. *Biochim.Biophys.Acta*. **1189**:45-51.
- Mou, J., Yang, J, Shao, Z. 1994. Tris(hydroxymethyl)aminomethane induced a ripple phase in supported unilamellar phospholipid bilayers. *Biochemistry* **33** (15): 4439-4443.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo,M.A. and Summers, M.D.(Eds.). 1995. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch.Virol.*, Suppl.10. Springer. Vienna.
- Nam, K-Y., Kimura, S., Imanishi,Y. & Fujiki, H. 1989. Distribution of tumors promoters in lipid membranes and changes in membrane structure.*Biophysical Chemistry* **34**: 43-53.
- Nagy, I.B. Haro, I. Alsina, M.A. Reig, F. Hudecz, F.1998. Interaction of branched chain polymeric polypeptides with phospholipid model membranes. *Biopolymers* **46**:169-179.
- Nardelli, B., Tam, J.P.1995. The Map system: a flexible and unambiguous vaccine design of branched peptides in vaccine design : the subunit and adjuvant approach. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. New York, NY: PlenumPress. 803-819.
- Nardin, E.H., Oliveira, G.A., Calvo-Calle, J.M., Nussenzweig, R.S. 1995. The use of a multiple antigen peptides in the analysis and induction of protective immunoresponses against infectious diseases. *Adv.Immunol.* **60**:105-149.
- Oberleithner, H., Brinckmann, E., Giebisch, G., Geibel, J. 1995. Visualizing life on biomembranes by atomic force microscopy. *Kidney International* **48**(4): 923-929.
- Olson, F., Mayhew, E., Maslow, D., Rustum, Y., Szoka, F. 1982. Characterization, toxicity and therapeutic efficacy of andriamycin encapsulated in liposomes. *Eur.Cancer Clin. Oncol.***18**: 167.
- Olson, F., Hunt, C., Szoka, F.C., Vail, W., Mayhew, E., Papahadjopoulos, D. 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **557**: 9-23.
- Oren, Z. Shai, Y. 2000. Cyclization of cytolytic Amphipathic α -Helical peptide and its diastereomer: effect on structure, interaction with model membranes, and biological function. *Biochem.***39** :6103-6114.

Palombo, J.D., Lydon, E.E, Chem, P.L., Bistrrian, B.R. and Forse, R.A. 1994. Fatty acid composition of lung, macrophage and surfactant phospholipids after short-term enteral feeding with n-3 lipid. *Lipids* **29**(9): 634-646.

Paphadjopoulos, D., Vail, W.J., Jacobson, K., Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilaminar lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **394**: 483-491.

Pécheur E.I. Saint-Marie, J. Bienvenüe, A. Hoekstra, D. 1999. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. *J.Membr.Biol.* **167**(1): 1-17

Peiró, A. 1998. Estudio por AFM de modelos de membranas biológicas (liposomas y películas de Langmuir-Blodgett). Dept. Química Físico. Facultad de Químicas.UB.tesina.

Pérez, J.A. González-Dankaart, J.F. Reig, F. Pintó, R. Bosch, A. and Haro, I. 1995a. Solid phase synthesis and immunogenicity of VP3 peptidee from hepatitis A virus. *Biomed. Peptides, Proteins Nucleic Acids* **1**: 93-100.

Pérez, J.A. Haro, I. Martín, I. Alsina, M.A. Reig, F. 1995b. Surface polarization fluorescence studies on the interaction of an RGD sequence containing a Hepatitis A virus peptide with phospholipids. *Anal.Chim Acta* **303**: 65-72

Philippot, J.R. and Schuber, F. 1995. in Liposomes as tool in basic reserch and industry. CRC press, Inc. Boca raton. Chaps. 1-7-8.

Pidgeon, C., Hunt, A.H. & Dittrich, J. 1986. Formation of multilayered vesicles from water/organic-solvent (w/o) emulsions: theory and practice. *Pharm. Res.* **3** (1): 23-34.

Piédrola-Angulo, G. 1991. "Virus de las hepatitis". En: Pumarola, A. *et al. Microbiología y Parasitología Médica*, 2ª ed., pp.704-706. Ed. Salvat, Barcelona.

Pilon, M., Jordi, W., De Kruijff, B., Demel, R.A. 1987. Interactions of mitochondrial precursor protein apocytochrome c with phosphatidylserine in model membranes. A monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* **902**(2): 207-216.

Posnett, D.N., Mc Grath, H. & Tam, J.P. 1988. A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. Biol. Chem.* **263**: 1719-1725.

Poste, G. 1983. Liposome targeting in vivo: Problems and opportunities. *Biol. Cell*, **47**: 19.

Provost, P.J. En *Hepatitis A*. 1984. ed. R.J. Gerety, Academic Press, Inc.(NY) pp 245-261.

Quickenden, T.I.; Tan, G.K. 1974. Random packing in two dimensions and the structure of monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **48**(3): 382-393.

- Radmacher, M., Tillmann, R.W., Fritz, M., Gaub, H.E. 1992. From molecules to cells: imaging soft samples with atomic force microscopy. *Science* **257**: 1900-1905.
- Ries, H.E. & Kimbal, W.A. 1959. *Proceedings of the 2nd International Congress of Surface Activity* Vol. **1**:75.
- Robertson, B.H., Brown, V.K., Holloway, B.P., Khanna, B. & Chan, E. 1989. Structure of the hepatitis A virion: identification of potential surface-exposed regions. *Arch. Virol.* **104**:117-128.
- Roger, R.C. 1995. in *Liposomes as tools in Basic Research and Industry*. Ed. Philpott, J.R., Schuber, F. Chap1, CRC Press, Boca Raton.
- Rongen, H.A.H. Bult, A. vanBennekom, W.P. 1997. Liposomes and immunoassays. *J.Immunol.Methods* **204**:105-133.
- Rosilio, V. Boissonnade, M-M. Zhang, J. Jiang, L. Baszkin, A. 1997 Penetration of glucose oxidase into organized phospholipid monolayers spread at the solution/air interface. *Langmuir* **13**:4669-4675.
- Ruiz-Argüello, B. Gofñi, F. Pereira, F. Nieva, J. 1998. Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of ebola virus. *J virol* **72** (3):1775-1781.
- Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins *Science* **238**: 491-497.
- Saenz González, M.C. & González Celador, R. 1991. *Infecciones por enterovirus, poliomieltitis, hepatitis A y hepatitis E*. En: Piedrola Gil, G.; et al. *Medicina Preventiva y Salud Pública*, 9ª ed., pp.465-470. Ed. Masson-Salvat Científica, Barcelona.
- Sargent, D.F. & Schwyzer, R. 1986. Membrane phase as catalist for peptide-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5774-5778.
- Schutze, M.P., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. & Chedid, L. 1985. Carrier-induced epitopic supression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* **135**: 2319-2322.
- Schwartz, D.K.; Garnaes, J.; Viswanathan, R.; Zasadzinski, J.A.N. Surface order and stability of langmuir-blodgett films. 1992. *Science* **257**: 508-511.
- Schwarz, S.M., Lambert, A.S. & Medow, M.S. 1992. Octogeny of proximal colon basolateral membrane lipid composition and fluidity in the rabbit. *Biochem.Biophys Acta* **1107**: 70-76.
- Seelig, A. Macdonald, P.M. 1989. Binding of a neuropeptide, substance P, to neutral and negatively charged lipids. *Biochemistry* **28**: 2490-2496.

Sela, M. 1980a. in "Molecules, cells and parasites in immunology". Eds. Larralde, C., Wills, K., Ortiz-Ortiz, L. And Sela, M. Academic Press, New York pp. 215-228.

Sela, M. & Arnon, R. 1980b. En *New Developments with Human and Veterinary Vaccines*, eds. Mizrahi, A., Hertman, I., Klingberg, M.A. & Kohn, A. (Liss, New York) pp.315-323.

Senior, J., Gregoriadis, G., Mitropoulos, K.A. 1983. Stability and clearance of small unilamellar liposomes. Studies with normal and lipoprotein-deficient mice. *Biochim.Biophys.Acta* **760**(1) :111-118.

Shao, Z., Mou, J., Czajkowsky, D.M., Yang, J. 1996. Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed. *Adv. in Physics* **45**: 1-86.

Sharkey, R.M., Primus, F.J., Goldenberg, D.M 1984. Second antibody clearance of radiolabeled antibody in cancer radioimmunodetection. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* **81**(9): 2843-2846.

Shibata-Seki, T., Masai, J., Tagawa, T., Sorin, T., Kondo, S. 1996. In situ atomic force microscopy study of lipid vesicles adsorbed on a substrate. *Thin solid films* **237**: 297-303.

Shih, M.C., Peng, J.B., Huang, K.G., Dutta, P. 1993. *Langmuir* **9**:776

Shinitzky, M., Barenholz, Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim.Biophys Acta* **515**(4): 367-394.

Signor, G., Hammi, S. Peggion, E., Ringsdorf, H. WagenKnecht, A. 1994. Interaction of bombolitin III with phospholipid monolayers and liposomes and effect on the activity of phospholipase A-2. *Biochemistry* **33**:6659-6670.

Sikes, D.H.; Woodward, J.T.; Schwartz, D.K. 1996. Pattern formation in a substrate-induced phase transition during langmuir-blodgett transfer. *J. Phys. Chem.* **100**: 9093-9097.

Slavik, J. 1982. Anilinonaphtalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim.Biophys Acta* **694**: 1-25.

Smaby, J.M. Momsen, M. Brockman, H.L. Brown, R.E. 1997. Phosphatidylcholine acylunsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophys.J.* **73**:1492-1505.

Sobsey, M.D., Shields, P.A., Hauchman, F.S., Davis, A.L., Rullman, V.A. & Bosch, A. 1988. En *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp.121-124, Alan R. Liss Inc., New York.

Solleti, J.M.; Botreau, M.; Sommer, F.; Brunat, W.L.; Kasas, S.; Minh Duc, T.; Celio, M.R. 1996. Elaboration and Characterization of Phospholipid Langmuir-Blodgett

Films. *Langmuir* **12**: 5379-5386.

Sospedra, P. Alsina, M.A. Espina, M. Reig, F. Haro, I. Mestres, C. 1999. Hepatitis A Synthetic Peptide VP3 (110-121) miscibility with dipalmitoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylglycerol, and stearylamine monolayers. *J. of Colloid.Inter.Sci.* **221**:236-241

Sospedra, P. Espina, M. Castro, M. Corrales, S. Haro, I. Mestres, C. 2001. Miscibility of an acylated hepatitis A synthetic antigen derivative (palmitoyl VP3(110-121)) with lipids: a monolayer study. *Colloid.Polym.Sci* **279**:331-339.

Stapleton, J.T. and Lemon, S.M. 1987. Neutralization escape mutants define a dominant immunogenic neutralization site in hepatitis A virus. *J.Virol.* **61**: 491-498.

Stapleton, J.T, Lemon, S.M. 1997. New Vaccines Against Hepatitis A, In: *New Generation Vaccines*, (Myron M. Levine et al., Eds.),2nd ed., Marcel Dekker, Inc., NY pp.571-585.

Steward, J.C. 1980. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**: 10-14.

Steward, M.W. and Howard, C.R. 1987. Synthetic peptides: A next generation of vaccines?. *Immunol.today* **8**: 51-57.

Stillwell, W., Ehringer, W. & Wassall, S.R. 1992. Interaction of α -tocopherol with fatty acids in membranes and ethanol. *Biochem. Biophys Acta* **1105**: 237-244.

Stubbs, C.D. Smith. A.D. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* **779**:89-137.

Stuck, D.K., Hoekstra D., Pagano, R.E. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**:523-529.

Szoka, F., Papahadjopoulos, D. 1980a. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles-liposomes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**: 467-508.

Szoka, S. Olson, F. Health, T. Vail, W. Mayhew, E. & Papahadjopoulos, D. 1980b. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 micrometers) by a combination of reverse-phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **601**: 559.

Szoka, F. 1991. Liposomal drug delivery: current status and future prospects, in membrane fusion. Wilschut, J. and Hoekstra, D. eds. Marcel Dekker. NY. p-55.

Tam, J.P. 1988. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5409-5413.

Tam, J.P. 1996. Recent advances in multiple antigen peptides (article review). *J. Immunol. Methods* **196**: 17-32.

Tam, J.P. & Lu, Y.-A. 1989. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T and B-cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9084-9088.

Tam, J.P., Clavijo, P., Lu, Y.-A., Nussenzweig, V, Nussenzweig, R. & Zavala, F. 1990. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* **171**:299-306.

Taneva, S.G; Keough, K.M.W. 1994. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: 1.monolayers of pulmonary surfactant protein SP-B and phospholipids. *Biophys.J.* **66**:1137-1148.

Taneva, S.G; Keough, K.M.W.1995.Calcium ions and interactions of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C with phospholipids in spread monolayers at air/water interface.*Biochem.Biophys.Acta* **1236**:185-195.

Taneva, S. Keough, K.M.W.1996. Cholesterol modifies the properties of surface films of Sdipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant- associated protein B or C spread or Adsorbed at the air-water interface. *Biochemistry* **36**: 912-922.

Taneva, S. Voelker, D.R. Keough, K.M.W. 1997a. Adsorption of pulmonary surfactant protein D to phospholipid monolayers at the air-water interface. *Biochemistry* **36**:8173-8179.

Taneva, S.G; Keough, K.M.W. 1997b. Cholesterol modifies the properties of surface films of dipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant-associated protein B or C spread or adsorbed at air-water interface.*Biochemistry* **36**:912-922.

Taneva, S. Kevin, M. Keough, W. 2000. adsorption of pulmonary surfactant proteinn SP-A to monolayers of phospholipids containing hydrophobic surfactant protein SP-B or SP-C: potential differential role for tertiary interaction of lipids, hydrophobic proteins and SP-A. *Biochemistry* **39**:6083-6093.

Tsuji, H. Mitsubayashi, K. 1997. An amperometric glucoesse sensor with modified Langmuir-Blodgett films. *Electroanalysis* **9**(2):161-164.

Ullrich, S.E., Fidler, I.J. 1992. Liposomes containig muramyltripetide phosphatidylethaaanolamine (MTP-PE) are excellent adjuvants for induction of a immune response to protein tumor antigen. *J. Leukocyte Biol.* **52**(5): 489-494.

Ulman, A.1991. In *Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to self Assembly*. Academic Press: San Diego, CA.

Van Ginkel,G. Van Langen, H. Levine, Y.K. 1989. The membrane fluidity concept revised by polarized fluorecence spectroscopy on different model membrane containing

unsaturated lipid and sterols. *Biochimie* **71**:23-32.

Van der Meer, B. Coker III, G., Simon-Chen, S.Y. 1994. Resonance Energy Transfer Theory and Data. New York: VCH Publishers.

Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Muller, S., Plaué, S. 1988. En *Synthetic Polypeptides as Antigens*, Vol **19**. Ed. Burdon, R.H. y Knippenberg, P.H., Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam.

Valls, O. 1981. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.

de Vendittis, E., Palumbo, G., Parlato, G., Bocchini, V. 1981. A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants. *Anal. Biochem.* **115**:278-286

Venyaminov, S.Y. and Yang, J.T. 1996. In : *Circular Dichroism and conformational analysis of biomolecules*. p. 69-109.

Verger, R. DeHaas, G.H. 1973. Enzyme reactions in a membrane model. New Techniques to study enzyme reactions in monolayers. *Chem. phys. Lipids* **10**:127-136.

Verger, R. & Pattus, L. 1982. Lipid-protein interactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids* **30**:189-227.

Voorst, F., Kruijff, B. 2000. Role of Lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem. J.* **347**: 601-612.

Wang, S-X. Cai, G-P. Sui, S-F. 1998. The insertion of human apolipoprotein H into phospholipid membranes: a monolayer study. *Biochem. J.* **335**:225-232.

Weinstein, J.N., et al. 1977. Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* **195**:489.

Wheeler, C.M., Robertson, B.H., Van Nest, G., Dino, D., Bradley, D.W. & Fields, H.A. 1986. Structure of the hepatitis A virion: peptide mapping of the capsid region. *J. Virol.* **58**:307-313.

Wiesmuller, K.H., Bessler, W.G. & Jung, G. 1992. Solid-phase peptide synthesis of lipopeptide vaccines eliciting epitope-specific B-, T-helper and T-killer cell response. *Int. J. Peptide Protein Res.* **40**:255-260.

Williams, N.A. & Weiner, N.D. 1989. Interactions of small polipeptides with dimyristoilphosphatidilcholina monolayer: effect of size and hydrophobicity. *International Journal of Pharmaceutics* **50**:261-266.

Williams, B.W., Scotto, A.W. & Stubbs, C.D. 1990. Effect of proteins on fluorophore life time heterogeneity in lipid bilayers. *Biochemistry* **29**:324-8.

World Health Organization. 1995. Public health control of hepatitis A: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ.* **73**:15-20.

Wu, P., Tin, G.W. & Baldeschiwieber, J.D. 1981. Phagocytosis of carbohydrate-modified phospholipid vesicles by macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2033-2037.

Yang, X.M. Xiao, D. Wei, Y. 1994. Domain structures of phospholipid monolayer Langmuir-Blodgett films determined by atomic force microscopy. *Appl.Phys.A.* **59**:139-143.

Zhong, Q., Inniss, D., Kjoller, K., Elings, V.B. 1993. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surf.Sci.Lett.* **290**:L688-L692.

Zuckerman, A.J., Zukerman, J.N. 1996. Viral Hepatitis, In: Oxford Textbook of Medicine, (Warrel,D., Weatherall,D.J., Ledingham,J.G.G., Eds), 3rd ed. , Oxford University Press Inc, NY pp.448-60.

Zumbuehl, O., Weder, H.G. 1981. Liposomes of controllable size in the range of 40-180nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta* **640**: 252-262.

Anexo.Publicaciones



Analysis of the perturbation of phospholipid model membranes by a multiple antigenic peptide

I. Haro ^a, M.A. Busquets ^b, A. Ortiz ^b, F. Reig ^a, M.A. Alsina ^{b,*}

^a Peptides Department, CID, CSIC, Barcelona, Spain

^b Physicochemical Unit, Faculty of Pharmacy, Avinguda Joan XXIII, S / N, 08028 Barcelona, Spain

Received 31 May 1994

Abstract

A peptide construct containing 4 peptide chains corresponding to VP1(11-25) linked to a lysine core was synthesized by solid phase methodology. The surface activity and the ability of this peptide to interact with monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), phosphatidylinositol (PI) and stearylamine (SA) was studied using Langmuir-Blodgett films. Interactions between the MAP₄-VP1 and bilayers were determined by polarization fluorescence studies. The presence of the peptide decreases the transition temperature of DPPC/DPH liposomes thus indicating the insertion of the MAP into the bilayer core. In contrast ANS-DPPC liposomes were not affected by the presence of the peptide constructs.

Keywords: Fluorimetry; Phospholipid model membranes; Multiple peptide antigen

1. Introduction

Multiple antigen peptide systems (MAP) for peptide-based vaccines have been designed to overcome the ambiguity and requirement of conjugation to a protein carrier by synthetic peptides [1,2]. MAP systems are branched compounds based on a core of lysine residues containing both α - and ϵ -amide linkages between themselves.

The efficacy of different MAPs as antigens in immunoassays or as potential vaccines has been analyzed by several authors [3-7]. They potentially present many advantages mainly because of the antigen content of the MAP is unusually high and the

production of antibodies directed against the carrier is unlikely.

Nevertheless, there is no doubt that the way the immunoresponse is developed is highly dependent on the antigen presentation. Soluble antigens, formed in various combinations with proteins, carbohydrates and lipids, activate the antibody-mediated immune system, but lipophilic antigens selectively enhance cell mediated immunity.

The association of soluble antigens as MAPs with liposomes can produce preparations sharing both types of immunogenicity. For this reason, the degree of MAP peptides association to liposomes and the influence of this process in the bilayer stability is an important point regarding the immunogenicity of the final form of administration.

In the present paper we have studied in detail the interactions between a MAP construct containing 4

* Corresponding author.

units of a peptide corresponding to the sequence 11-25 of the VP1 protein of Hepatitis A virus (HAV) and phospholipids as the main components of biological membranes. To this end the surface activity of MAP₄-VP1(11-25) HAV as well as its ability to insert into lipid monolayers were determined using monomolecular layers of phospholipids. Moreover, the influence of this peptide construct on the fluidity of lipid bilayers was determined by polarization fluorescence techniques.

2. Experimental

2.1. Chemicals

N α -Fluorenylmethoxycarbonyl amino acids and *p*-benzyloxybenzyl alcohol resin (Wang resin) were obtained from Novabiochem.

Dimethylformamide (DMF) (Milligen) was freshly distilled from ninhydrin and phosphorus pentoxide at reduced pressure. Washing solvents such as isopropyl alcohol, acetic acid and diethyl ether were obtained from Merck (p.a.). Trifluoroacetic acid (TFA) was supplied by LKB and coupling reagents Bop (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate) and pyBop (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) were obtained from Fluka and Novabiochem, respectively.

Amino acid analyses were carried out in a Pico-Tag system (Waters).

Liquid chromatography (LC) was carried out with a Perkin-Elmer series 250 LC pump connected to an LC-235 diode array detector and an LCI-100 integrator.

Analytical LC was performed on a 250 \times 4 mm i.d. Spherisorb ODS-2 (10 μ m) column eluted with several mixtures of acetonitrile (0.1% TFA)-water (0.1% TFA) at a flow rate of 1 ml/min.

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), phosphatidylinositol (PI) and stearylamine (SA) were from Sigma. Their purity was checked by thin-layer chromatography. Chloroform and methanol (pro-analysis) were from Merck. Water was doubly distilled from an all-glass apparatus. All the experiments were carried out with the peptide dissolved in phosphate buffered saline buffer (PBS), pH 7.4. Sodium anili-

nonaphthalene sulfonate (ANS) and diphenylhexatriene (DPH) were from Sigma.

2.2. Methods

Surface activity measurements

Compression isotherms. Monolayers of DPPC, PI, SA and MAP₄-VP1(11-25) were spread on PBS subphases and surface pressure increases on compression recorded using a Langmuir balance described elsewhere [8]. Films were spread from aqueous solutions and at least 10 min were allowed for solvent evaporation. Films were compressed continuously at a rate of 4.2 cm/min. Changes in the compressibility rate did not alter the shape of the isotherms. All the solvents were run at least three times in the direction of increasing pressure with freshly prepared films. The accuracy of the system under the conditions in which the bulk of the reported measurements were made was 0.5 mN m⁻¹ for surface pressure.

The output of the pressure pickup (Beckman LM 600 microbalance) was calibrated by recording the well-known isotherm of stearic acid. This isotherm is characterized by a sharp phase transition at 25 mN m⁻¹ on pure water at 20°C. The PTFE trough (495 cm²/330 ml) was regularly cleaned with hot chromic acid, and, before each experiment it was washed with ethanol and rinsed with doubly distilled water.

Monolayer stability was assessed by compressing them to a pressure of 25 mN m⁻¹, stopping the barrier and recording the pressure decay. No pressure changes were observed after 30 min. All measurements were made at 21 \pm 1°C and at pH 7.4.

Insertion of the peptide into monolayers. These experiments were carried out using a 70-ml minicuvette. To determine the equilibrium spreading pressure, increasing volumes of a concentrated solution of MAP-VP1 peptide were injected beneath the aqueous surface and pressure increases after 60 min recorded.

To determine the insertion of peptide into monolayers a slightly lower concentration (0.28 μ M) than that corresponding to the spreading pressure was chosen. The influence of initial surface pressure of the monolayer and the lipid composition was then studied.

2.3. Fluorescence studies

Fluorescence polarization was determined using a Perkin-Elmer LS 50 spectrofluorimeter equipped with a thermostatable cuvette holder and polarizers. Small unilamellar vesicles prepared as described in [5] (105 nm diam.) were incubated with ANS or DPH at several phospholipid/probe relationships, to find the saturation concentration of vesicles [9]. Liposomes saturated with ANS or DPH were incubated with the peptide and its fluorescence polarization measured as a function of the temperature. Excitation and monitoring wavelengths were 380 and 480 nm and 365 and 425 nm, respectively. The observed fluorescence intensities and polarization were compared with those of probe/liposomes and probe/peptide. Membrane fluidity was estimated on the basis of the reciprocal of polarization. The temperature range was 20–50°C.

Effect of MAP₄-VP1 on the fluidity of bilayers

DPH and ANS, hydrophobic and hydrophilic molecules, respectively, were used as fluorescence probes. The degree of anisotropy was obtained by the following equation:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}g) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp}g)$$

where g is an instrumental correction factor, I_{\parallel} and I_{\perp} are respectively, the emission intensities polarized vertically and horizontally to the direction of polarized light. Fluorescence anisotropy has been widely used to monitor membrane fluidity [10]. Experiments were carried out in duplicate.

Synthesis of the multiple antigenic peptide MAP₄-VP1(11–25)

MAP₄-VP1(11–25) (Fig. 1) was synthesized as described by Tam [1]. Briefly, 0.4 mmol of FmocAla

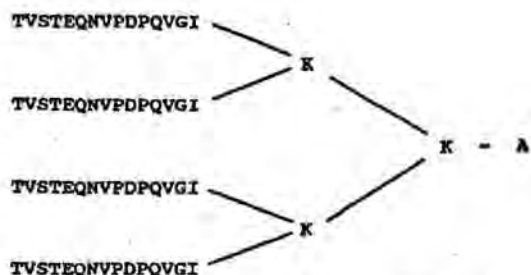


Fig. 1. Chemical structure of MAP₄-VP1(11–25).

previously activated as its symmetrical anhydride was esterified on 1 g of Wang resin (4-hydroxymethyl)phenoxyethyl-copoly(styrene-1% divinylbenzene). This reaction was carried out at a low extension in order to achieve anchoring values of about 0.1 meq FmocAla/g resin. The tetravalent lysine core was obtained by sequential coupling of 0.3, 0.6 and 1.2 mmol of Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, which were incorporated through diisopropylcarbodiimide (DIPCD)/HOBt or benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BPO)/HOBt. Unreacted groups were acetylated by reaction with Ac₂O (2 eq) in DMF in the presence of 1 eq of DMAP for 30 min.

The stepwise addition of each residue was assessed by the ninhydrin colour test. Recoupling was necessary at four points in the synthesis.

The peptide was cleaved from the resin by treatment with 95% aqueous TFA (2.5 h, room temperature), the solvent was removed in vacuo and the crude peptide was precipitated with diethyl ether. The sample was sonicated and centrifuged and the supernatant decanted off, repeating this last step several times. This crude peptide was dialysed (Spectrum Por 6 tubing, M_r cutoff 1000) in 8 M urea and then in 0.1 M acetic acid twice for 5–6 h to remove the urea. Finally, the peptide was lyophilised and checked by analytical LC in the reversed-phase mode. The MAP₄-VP1(11–25) eluted as a single peak (ACN-0.1% TFA/H₂O-0.1% TFA (80:20) to ACN-0.1% TFA/H₂O-0.1% TFA (20:80) in 20 min, $k' = 2.74$) and gave satisfactory amino acid analysis.

3. Results

The surface properties of MAP₄-VP1(11–25) were measured as the decrease in surface tension of a PBS solution after injection of a 0.198 mM peptide solution into the subphase. The time course of the process was very fast, after 5 min almost 80% of the maximum pressure had already been achieved. Nevertheless the system was left for 60 min. The incorporation of peptide to the surface was concentration dependent until a saturation point corresponding to a bulk concentration of 0.85×10^{-6} M (Fig. 2). Applying Eqs. 1 and 2 to these values, the surface

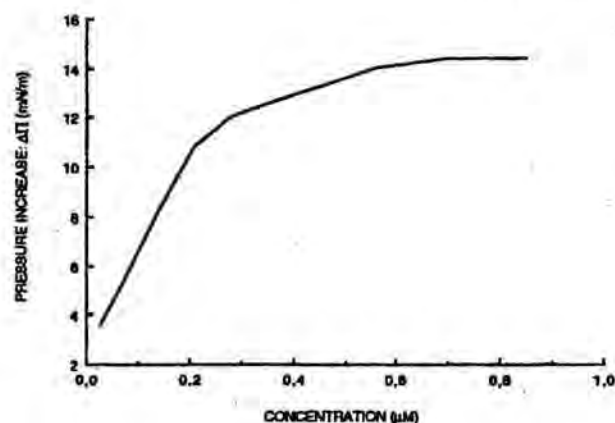


Fig. 2. Pressure increase versus subphase peptide concentration.

excess and area/molecule were calculated and are given in Table 1.

$$\Gamma = -1/RT \cdot \Delta\Pi / \Delta \ln c \text{ (mol/cm}^2\text{)} \quad (1)$$

$$\text{Area} = 1/N\Gamma \text{ (nm}^2\text{/molec.)} \quad (2)$$

where R is $8.31 \times 10^7 \text{ mN K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, $T = 294 \text{ K}$, $\Delta\Pi$ the surface pressure increase, c is peptide concentration (M); $N = 6.023 \times 10^{23} \text{ molec./mol}$.

In order to obtain a better insight about the incorporation process of these molecules to the surface, Eqs. 3 and 4 were applied assuming that surface pressure increases are a function of the amount of protein located at the interface.

$$P = a + bt \quad (3)$$

$$1/P = K/P_m \cdot t + 1/P_m \quad (4)$$

Where P is measured in mN m^{-1} , time (t) is in minutes and values of P_m and K represent the maximum pressures achieved at the time to reach

Table 1
Surface excess and area per molecule of $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ for different initial bulk concentrations

Subphase concentration (μM)	Surface excess (cm^2/mol)	Area/molec. (nm^2)
0.028	6.38×10^{-12}	26
0.070	9.70×10^{-12}	17
0.141	1.60×10^{-11}	10
0.21	2.14×10^{-11}	7.0
0.28	2.39×10^{-11}	6.9
0.42	2.54×10^{-11}	6.5
0.85	3.05×10^{-11}	5.4

Table 2
Parameters defining the time-course of $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ incorporation into the air/water surface

Concentration (μM)	a (mN m^{-1})	b ($\text{mN m}^{-1} \text{ min}^{-1}$)
0.028	0.03 ± 0.06	0.059 ± 0.002
0.070	1.29 ± 0.05	0.063 ± 0.001

saturation and the time to reach half-maximal saturation ($t_{1/2}$), respectively.

Mathematical treatment of the results indicate that, at low concentrations, pressure increases are linearly related to time and saturation can not be reached. But at higher concentrations, the pressure increase-time relationship follows Eq. 4. In both cases the mathematical parameters are given in Tables 2 and 3.

From $0.21 \mu\text{M}$ peptide solutions one can observe a small increase in P_m accompanied with a low decrease in K . This means that the higher the peptide concentration in the subphase, the faster the incorporation of peptide to the interface.

3.1. Penetration of $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ peptide into phospholipid monolayers

The ability of this peptide construct to insert into lipid monolayers was determined using three lipids of different electric charge: DPPC, PI and SA.

The initial surface pressures were 5, 10 and 20 mN m^{-1} and the peptide concentration in the subphase was $0.28 \mu\text{M}$. This concentration was slightly lower than that corresponding to saturation. The results obtained (Fig. 3) were strongly related to the electrical charge of the monolayer. As $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ has, at neutral pH, 8 negative charges a stronger interaction or affinity for positively charged monolayers was to be expected. For the same reason the lowest level of interaction had to be found with

Table 3
Parameters defining the time-course of $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ incorporation into the air/water surface

Concentration (μM)	P_m (mN m^{-1})	K (min)
0.14	16.03 ± 1.53	55.7 ± 9.1
0.21	11.52 ± 0.34	6.0 ± 0.9
0.28	12.75 ± 0.26	5.5 ± 0.6
0.42	12.82 ± 0.13	3.5 ± 0.2
0.84	13.91 ± 0.22	2.4 ± 0.3

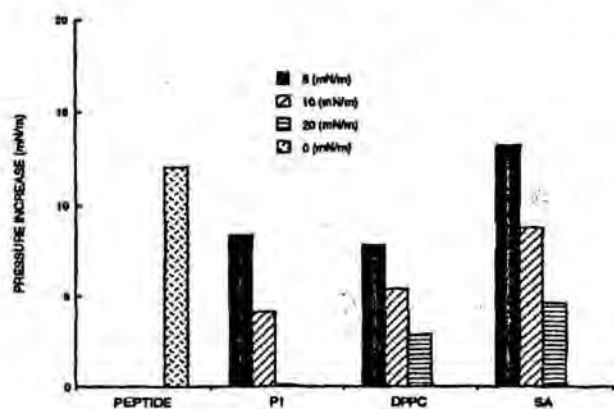


Fig. 3. Pressure increases recorded after injection of MAP₄-VP1 solution under lipid monolayers spread at 5, 10 and 20 mN/m of initial surface pressure.

negatively charged phospholipids. This trend is clear with PI monolayers spread at 20 mN m⁻¹ of surface pressure where no interaction with MAP₄-VP1 could be detected. At lower pressures electrostatic repulsion forces are not so evident due to the large areas available for the molecules.

3.2. Compression isotherms

Monolayers of MAP₄-VP1(11–25) were prepared either by injecting a solution of this peptide into the aqueous subphase or spreading the peptide on the surface. After compression, both isotherms were almost identical, thus indicating that the method of injection did not affect the surface characteristics of the monolayer. These results were similar to those previously reported for water-soluble protein monolayers [11,12].

The shape of area–pressure curves as well as the initial surface pressure were dependent on the amount of peptide spread. Isotherms are in a liquid expanded state all over the compression process, reaching collapse around 20 mN m⁻¹, independently of the

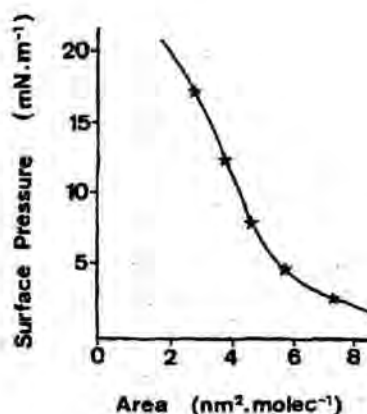


Fig. 4. Compression isotherm of a MAP₄-VP1 monolayer spread at the air/water interface.

amount spread. As an example, the isotherm corresponding to 66 μg of MAP is given in Fig. 4. Area per molecule values calculated at different compression pressures and initial surface pressures are summarized in Table 4. It can be appreciated that the amount of peptide spread influences the initial surface pressure of the monolayer. This increase in the initial surface pressure before compression had already been observed for hydrophobic peptides [13]. Moreover, as this peptide is soluble in water the possibility of a partial solution was checked stopping the barrier motion during compression at a fixed surface pressure and recording the surface pressure for 30 min. No changes in this parameter were found thus indicating the permanence of peptide molecules in the surface.

3.3. Influence of MAP₄-VP1(11–25) in the compression isotherms of DPPC, PI and SA

The ability of this peptide to interact with phospholipid monolayers was checked in a dynamic model spreading DPPC, PI and SA on PBS or PBS–peptide solutions (0.059 μM).

Table 4
Surface characteristics of compression isotherms of MAP₄-VP1

Peptide amount (molecules)	Initial surface pressure (mN/m)	Area (nm ² per molecule)			
		5 mN/m	10 mN/m	15 mN/m	20 mN/m
6 × 10 ¹⁵	1.92	6.12	4.25	3.25	2.06
9 × 10 ¹⁵	2.4	4.25	3.33	2.41	1.16
12 × 10 ¹⁵	3.36	3.75	2.93	2.00	0.81

Fig. 5 shows the influence of the presence of $\text{MAP}_4\text{-VP1}(11-25)$ on the area per molecule values calculated from DPPC isotherms. This behaviour was common for the three lipids studied as can be deduced from the histogram in Fig. 6.

At low surface pressures the peptide is able to insert into the monolayer inducing a clear expansion. But on compression, the isotherms become closer and differences due to the presence of the peptide are smaller. The lowest values were found for SA monolayers. At first sight, it should be expected a better or stronger surface increase according to the greater interaction found in penetration experiments. In the present case we think that the presence of an electrical charge in SA monolayers induces some repulsion forces among molecules thus giving high area per molecule values. Comparing the 1.12 nm^2 per molecule of DPPC with 0.86 nm^2 per molecule of SA, and both chemical structures, it is clear that

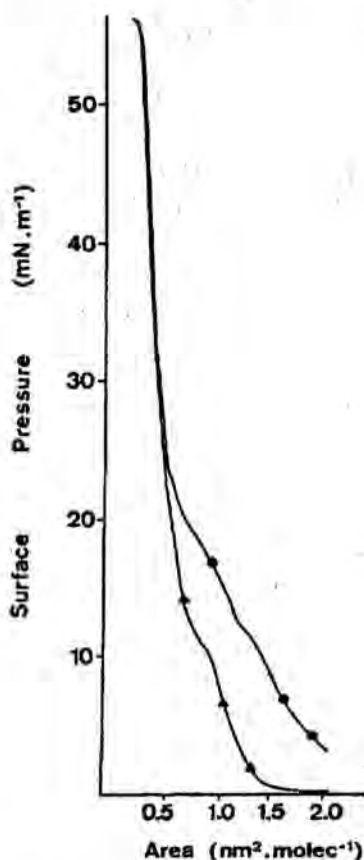


Fig. 5. Compression isotherms of DPPC spread on PBS (\blacktriangle) or on $0.28 \mu\text{M}$ $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ solution (\bullet).

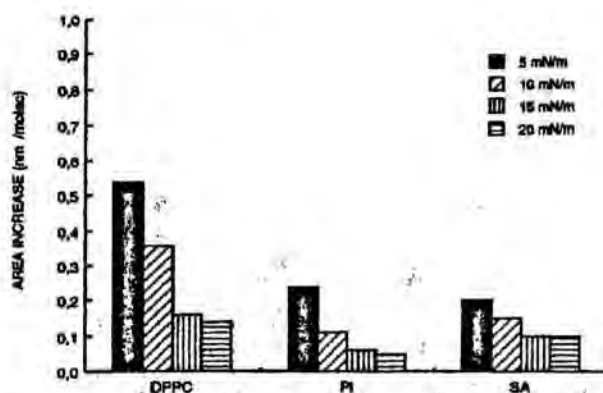


Fig. 6. Area increases calculated compared by compression isotherms of pure lipid monolayers and the same experiment when monolayers were spread on $\text{MAP}_4\text{VP1}$ -containing subphases.

initially the SA monolayer is slightly more expanded than that of DPPC. After interaction with $\text{MAP}_4\text{VP1}$ there is some neutralization of the electrical charge and this process is probably on the basis of the lowest area increases detected. This trend suggests that on compression the peptide molecules become associated with the PL in the monolayer, but facing the aqueous side and in this way its contribution to the area per molecule is almost non-existent.

3.4. Influence of $\text{MAP}_4\text{-VP1}(11-25)$ on the fluidity of bilayers

Fluorescence anisotropy studies were performed using two probes located in different regions of the lipid bilayer. DPH is a highly hydrophobic molecule able to insert between the alkyl chains of DPPC [14] while ANS (a negatively charged structure) is anchored close to the bilayer surface, because its interaction locus is the polar heads of phospholipids.

The polarization fluorescence of both molecules inserted in liposomes, as well as fluorescence intensity and maximum fluorescence wavelength after incubation with $\text{MAP}_4\text{-VP1}$ were determined at different temperatures. Figs. 7 and 8 show that interaction is only evident at the hydrophobic core of the bilayer. The presence of the peptide decreases the transition temperature of DPPC thus indicating a fluidification of the bilayer organization. Moreover, when polarization/temperature plots were analysed according to the four-parameter logistic equation:

$$P = A + (B - A) \cdot 10^{(D.T)} / 10^{(D.C)} + 10^{(D.T)}$$

References

- [1] J.P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 5409.
- [2] D.N. Posnett, H. McGrath and J.P. Tam, *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 1719.
- [3] J.P. Tam and Y.A. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 9084.
- [4] J.P. Tam, P. Clavijo, Y.A. Lu, U. Nussenzweig, R. Nussenzweig and F. Zavala, *J. Exp. Med.*, 171 (1990) 299.
- [5] G.W. McLean, A.M. Owsianka, J.H. Subak-Sharpe and H.S. Marsden, *J. Immunol. Methods*, 137 (1991) 149.
- [6] M.J. Francis, G.Z. Hastings, F. Brown, J. McDermed, Y.A. Lu and J.P. Tam, *Immunology*, 73 (1991) 249.
- [7] G.K. Toth, G. Varadi, Z. Nagy, E. Monostori, Z. Penke, Z. Hegedus, I. Ando, G. Fazekas, I. Kurucz, M. Mak and E. Rajnavölgyi, *Peptide Res.*, 6 (1993) 272.
- [8] R. Verger and G.H. de Haas, *Chem. Phys Lipids*, 10 (1973) 127.
- [9] C. Colomé, M.A. Alsina, M.A. Busquets, I. Haro and F. Reig, *Int. J. Pharm.*, 90 (1993) 59.
- [10] B.R. Lentz, *Chem. Phys. Lipids*, 50 (1989) 171.
- [11] M.A. Egea, M.L. Garcia, M.A. Alsina and F. Reig, *J. Pharm. Sci.*, 83 (1994) 169.
- [12] M. Saint-Pierre-Chazalet, F. Billoudet and M.P. Pileni, *Prog. Colloid Polymer Sci.*, 79 (1989) 76.
- [13] M.A. Alsina, F. Rabanal, C. Mestres, M.A. Busquets and F. Reig, *Colloids Interf.*, 161 (1993) 310.
- [14] L. Davenport, R.E. Dale, R.H. Bisby and R.B. Cundall, *Biochemistry*, 24 (1985) 4097.
- [15] Y. Cajal, F. Rabanal, M.A. Alsina and F. Reig, *Biochim. Biophys. Acta*, (1994) submitted for publication.
- [16] J.F. Faucon, E. Bernard, J. Dufourcq, M. Pezolet and P. Bougis, *Biochimie*, 63 (1981) 857.
- [17] K.Y. Nam, S. Kimura, Y. Imanishi and H. Fujiki, *Biophys. Chem.*, 34 (1989) 43.
- [18] S. Kimura, D. Erne and R. Schwyzer, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 39 (1992) 431.

where A and B are the bottom and top plateaux of the polarization curve, T is temperature, c transition temperature, D the Hill coefficient and P polarization, a decrease of 1.9° in the transition temperature was found (from 40.3 to 38.4°C).

In fact the T_c value found for pure DPPC by this method is slightly lower than that given in the literature (41.4°C , determined by differential scanning calorimetry), nevertheless as regression coefficients were very good and experiments were always carried out in parallel, the presence of artifacts can be discarded. This fluidising effect promoted by a MAP construct has already been described for other peptides [15,16]. First derivative analysis of the phase transition profiles (Fig. 7b) indicated that a significant decrease in the amplitude of the fluorescence polarization change of the process was produced by the peptide, thus indicating that the cooperative nature of the phase transition is retained and even increased.

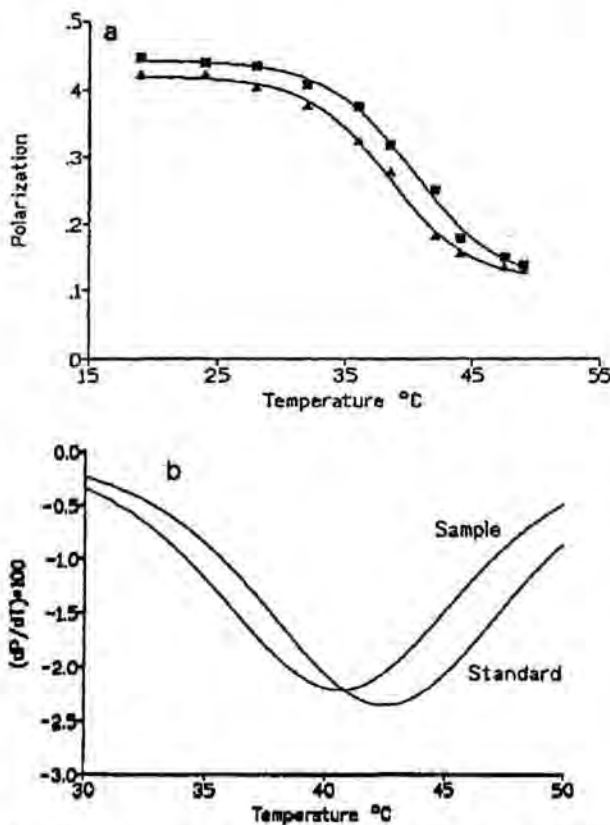


Fig. 7. (a) Temperature dependence of fluorescence polarization of DPH bound to pure DPPC or DPPC/MAP₄-VP1. (b) First derivative analysis of the phase transition profiles.

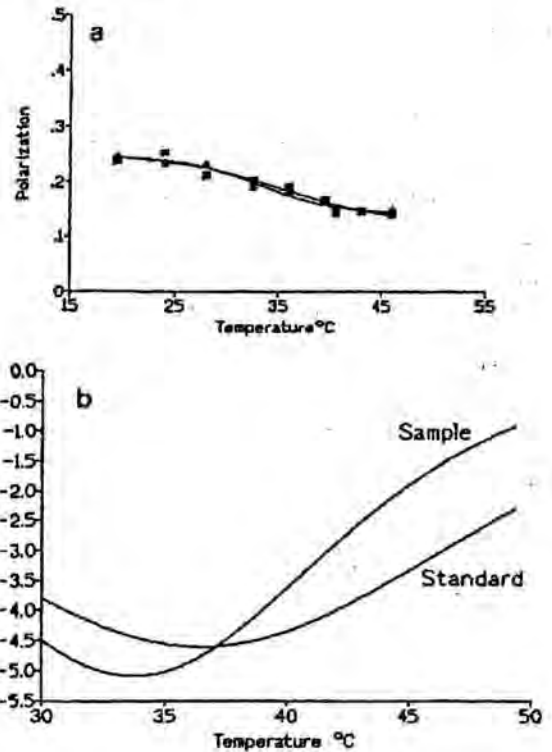


Fig. 8. (a) Temperature dependence of fluorescence polarization of ANS bound to pure DPPC or DPPC/MAP₄-VP1. (b) First derivative analysis of the phase transition profiles.

As cited before, no detectable effect on membrane fluidity at the membrane surface is observed. This effect was also found with Hepatitis B virus (HBV) peptides [15] and tumour promoters [17] and indicates that the peptide should be distributed mainly in the hydrophobic core of the bilayers. This apparently strange effect can be due either to the net negative charge of ANS and MAP₄-VP1 constructs that generates electrostatic repulsion forces or to the highly curved surface of small unilamellar vesicles (SUV) [18], that cause the headgroups of the outer monolayer to be further spread apart leaving the hydrocarbon chains more exposed to the aqueous phase.

In any case, interactions with alkyl chains are clear using mono- and bilayers of lipids, thus suggesting the availability of liposomes as carriers for this peptide construct.

Acknowledgements

This work was supported by a grant BIO-92-0982-C02-02 from CICYT, Spain.

Influence of Phospholipidic Charge on the Interaction of a Multiple Antigenic Peptide from Hepatitis A Virus with Monolayers and Bilayers

C. Mestres,[†] A. Ortiz,[†] I. Haro,[‡] F. Reig,[‡] and M. A. Alsina^{*†}

Physicochemical Unit, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, Barcelona 08028 Spain, and Peptides Department, CID, CSIC, Barcelona, Spain

Received July 25, 1996. In Final Form: December 27, 1996[®]

Miscibility of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) with dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), cardiolipin (CL), and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) was studied using mono- and bilayers of different compositions. The influence of MAP4-VP1 peptide construct (related to hepatitis A virus protein) in mixed monolayers of the lipids above cited was determined by studying penetration kinetics and compression isotherms. Moreover, liposomes with the same composition than monolayers were saturated with sodium anilinothalene sulfonate or diphenylhexatriene and incubated with MAP4-VP1; polarization values as well as transition temperatures were determined. Results in isotherm and polarization studies showed some degree of interaction between the peptide and the phospholipids assayed. DPPC/DPPG composition showed the maximum interaction followed by DPPC/CL. The interaction was not strong, suggesting that the entrapment of MAP4-VP1 in liposomes in order to increase its immunogenic activity is possible.

Introduction

Hepatitis A is the most frequently diagnosed form of hepatitis imported into developed countries from developing ones. Fecal-oral routes are the predominant ways of hepatitis A virus (HAV) transmission.

Passive immunization with immunoglobulin, before exposure or within two weeks following exposure to HAV, protects against clinical disease in less than 70% of immunized individuals. Moreover, the duration of protection is relatively short. The recently described inactivated hepatitis A vaccine is clinically well tolerated and a safe and effective method to protect against HAV infection.¹ However due to the very low yield in HAV growing in cell cultures, the application of inactivated vaccines is limited due to the cost.

New avenues in vaccine development have opened up with the advent of techniques for gene cloning for the production of monoclonal antibodies and the synthesis of peptides. Synthetic peptides have been extensively used for the production of specific antibodies. In this sense one of the major unsolved problems of the use of synthetic vaccines is that peptides are poorly immunogenic and require adjuvants or carriers to evoke an immune response. Because peptides generally elicit low immunogenicity, they are often conjugated to macromolecular proteins and administered to animals with adjuvants.^{2,3} Although the peptide-carrier-adjuvant mixture elicits desired immunological responses, the chemical composition of the mixture is often difficult to define.

Multiple antigen peptide systems (MAPs) have provided unique immunological reagents for the analysis and induction of cellular and humoral immune response to a wide range of infectious diseases. MAPs are composed of

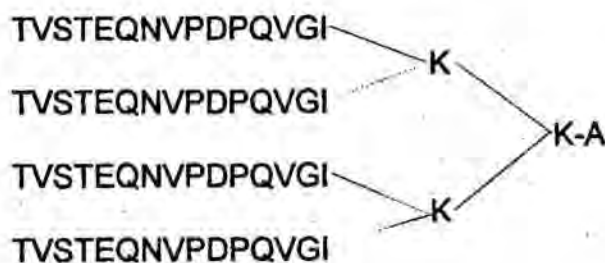


Figure 1. MAP4-VP1 structure.

a peptide core matrix to construct a synthetic macromolecule that is immunogenic in the absence of protein carrier. The use of MAP in the analysis and induction of protective immune response against infectious diseases has been recently reviewed.^{4,5}

The mechanism of processing and presentation of antigens is not yet fully understood. It is known that soluble antigens that are rendered particulate by encapsulation are presented by macrophages to T cells and promote T cell proliferation.^{6,7} For this reason model biomembrane systems are useful for understanding fundamental biochemical and biophysical strategies at the cellular level.

In the present work we have studied in detail the interaction between a MAP construct containing four sequences of hepatitis A virus peptide (HAV-VP1(11-25)) (Figure 1), with monolayers of different composition. Moreover, liposomes of the same composition were used to study the effect of the peptide in the bilayer microviscosity.

Experimental Section

Chemicals. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), cardiolipin (CL), dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), and dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) were from Sigma.

(4) Nardin, E. H.; Oliveira, G. A.; Calvo-Calle, J. M.; Nussenzweig, R. S. *Adv. Immunol.* 1995, 40, 105-49.

(5) Ahlborg, N. J. *Immunol. Methods* 1995, 179, 269.

(6) Dal Monte, P. R.; Szoka, F. C. *Vaccine* 1989, 7, 401.

(7) Verma, J. N.; Rao, M.; Arselem, S.; Krzych, U.; Alving, C. R.; Green, S. J.; Wassef, N. M. *Infect. Immunol.* 1992, 60, 2438.

* Corresponding author.

[†] Faculty of Pharmacy, University of Barcelona.

[‡] Peptides Department, CID, CSIC.

[®] Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, September 1, 1997.

(1) Just, M.; Berger, R.; Drechsler, H.; Branstschen, S.; Glück, R. *Vaccine* 1992, 10, 737.

(2) Lerner, R. A. *Nature* 1982, 299, 592-6.

(3) Bittle, J. L.; Houghten, R. A.; Alexander, H.; Shinnick, T. M.; Sutcliffe, J. C.; Lerner, R. A.; Rowlands, D. J.; Brown, F. *Nature* 1982, 289, 30-3.

Their purity was checked by thin-layer chromatography. Chloroform and methanol (pro analysis) were from Merck. Water was doubly distilled from all-glass apparatus. Sodium anilino-naphthalene sulfonate (ANS) and diphenylhexatriene (DPH) were from Sigma.

Methods. Surface Activity Measurements. Compression Isotherms. Monolayers of CL, DPPC, DPPE, and mixtures of each lipid with DPPC were spread from chloroform solution on PBS (phosphate buffer solution pH 7.4) subphases. Pressure increases were recorded using a Langmuir balance as described elsewhere.⁸ After the film was spread, 10 min was allowed for solvent evaporation. Films were compressed at a rate of 4.2 cm/min. All the samples were run at least three times in the direction of increasing pressure with freshly prepared films (standard deviation 3.5%). The accuracy of the system under the conditions in which the bulk of the reported measurements were made was 0.5 mN/m for surface pressure.

The output of the pressure pickup (Beckman LM 600 microbalance) was calibrated by recording the well-known isotherm of stearic acid. Monolayer stability was assessed by compressing a film to a pressure of 25 mN/m, stopping the barrier, and recording the pressure decay. No pressure changes were observed after 30 min.

All the experiments were made at 21 ± 1 °C.

Insertion of the Peptide into Monolayers. These experiments were carried out using a 70 mL Teflon trough.

To determine the surface activity of MAP4-VP1, volumes of a concentrated solution of the peptide were injected beneath the surface and pressure increases were recorded for 60 min. Volumes injected were increased until saturation was reached.

The peptide insertion into the monolayer was determined by injecting the peptide into the subphase. The final concentration of the peptide in the subphase was slightly lower than the saturation concentration (0.28 μ M). The lipid monolayers had an initial pressure of 5, 10, and 20 mN/m. The pressure increases produced by the peptide were recorded during 60 min.

Fluorescence Studies. Fluorescence polarization was determined using a Perkin-Elmer LS 50 spectrofluorometer equipped with a thermostable cuvette holder and polarizers. Small unilamellar vesicles prepared as described in ref 9 (105 nm diameter) were incubated with ANS or DPH at several phospholipid/probe relationships, to find the saturation concentration of vesicles.¹⁰ Liposomes saturated with ANS and DPH were incubated with the peptide, and its fluorescence polarization was measured as a function of the temperature. Excitation and emission wavelengths were 380 and 480 nm and 365 and 425 nm, respectively. The observed fluorescence intensities and polarization were compared with those of probe/liposomes/peptide. Membrane fluidity was estimated on the basis of the reciprocal of polarization. The temperature range was 20–50 °C.

Results and Discussion

Surface Studies. The synthesis and surface activity of MAP-VP1 have already been described in ref 11. The maximum surface pressure of this peptide construct was around 14 mN/m for a bulk concentration, 0.84 μ M.

The process of incorporation of the peptide into the air/water interface was very fast; after 10 min the pressure increase was 80% of the total achieved in 1 h.

In a previous paper the interaction of this peptide with monolayers composed of other pure phospholipids has already been described.¹¹

Miscibility of Phospholipids. Membrane models used in this study were composed of DPPC as main component and 10% of each of the following lipids: CL, DPPG, and DPPE. But in order to have these binary

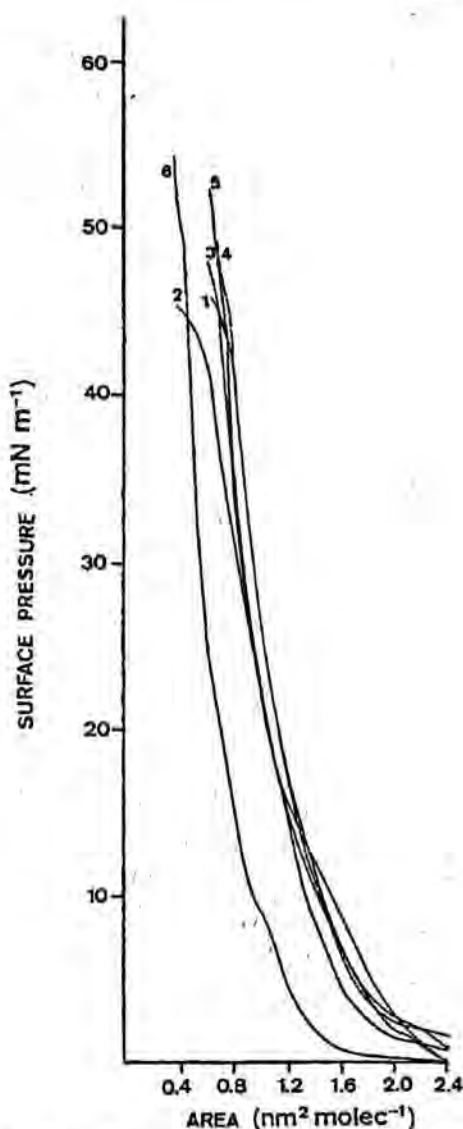


Figure 2. Compression isotherms of DPPC/DPPG monolayers spread on 0.28 μ M MAP4-VP1 subphase: 1, 0/1; 2, 0.2/0.8; 3, 0.4/0.6; 4, 0.6/0.4; 5, 0.8/0.2; 6, 1.0.

mixtures well characterized, the miscibility of these three pairs of components was determined all over a range of molar fractions. To this end mixtures of DPPC with the other phospholipids, in chloroform solution, were prepared and mixed monolayers were formed by spreading fixed values of the solution on PBS or MAP4-VP1 containing subphases. On compression, the area/molecule versus surface pressure was recorded for all the mixtures. Those corresponding to DPPC/DPPG on peptide-containing subphase are given in Figure 2. In these experiments peptide concentration in the subphase was 0.28 μ M, that is, slightly lower than that of saturation above cited.

As a general trend the shape and slope of isotherms are similar, and almost independent of the molar composition, when monolayers were spread on PBS. DPPG monolayer was the most expanded at low surface pressures probably due to its electrical charge that creates a strong surface potential. On the contrary DPPC showed lower area/molecule values. Moreover, in the presence of DPPG the well-known transition phase of DPPC disappears.

Monolayers spread on MAP4-VP1 subphases were more expanded than those above described, and DPPC transition appears at a higher surface pressure (9 mN·m⁻¹ versus

(8) Verger, R.; de Haas, G. H. *Chem. Phys. Lipids* 1973, 10, 127.

(9) McLean, G. W.; Owsianka, A. M.; Subak-Sharp, J. H.; Marsden, H. S. *J. Immunol. Methods* 1991, 137, 149.

(10) Colomé, C.; Alsina, M. A.; Busquets, M. A.; Haro, I.; Reig, F. *Int. J. Pharm.* 1993, 90, 59.

(11) Haro, I.; Busquets, M. A.; Ortiz, A.; Reig, F.; Alsina, M. A. *Anal. Chim. Acta* 1995, 303, 57–64.

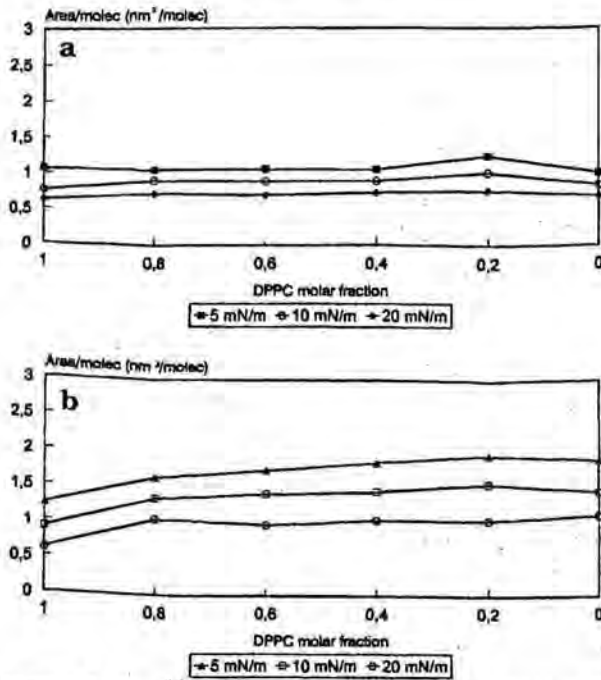


Figure 3. Area/molecule for DPPC/DPPG monolayers at 5, 10, and 20 mN/m for (a) PBS subphase and (b) MAP4-VP1 containing subphase.

7 mN·m⁻¹ on PBS). A similar behavior was found with mixed systems DPPC/DPPE and DPPC/CL.

To better characterize the miscibility pattern of these systems, the mean molecular areas of mixed monolayers were represented as a function of the composition at three surface pressures (5, 10, and 20 mN/m). The presence of peptide construct in the subphase produces a soft expansion of the monolayers, without significative changes in the miscibility pattern. This is indicative of a penetration of peptide into the monolayer. This behavior is maximum for DPPG containing monolayers (Figure 3) and less evident in mixed monolayers of DPPE. Moreover, these deviations from linearity were quantified applying the mathematical treatment described in refs 12 and 13. The excess free energy of mixing (ΔG_M^{EX}) was calculated by applying eq 1

$$\Delta G_M^{EX} = \int_{\pi=0}^{\pi} A_{12} d\pi - N_1 \int_{\pi=0}^{\pi} A_1 d\pi - N_2 \int_{\pi=0}^{\pi} A_2 d\pi \quad (1)$$

where A_{12} is the mean molar area in the mixed film, A_1 and A_2 are the molar areas in the pure films, and N_1 and N_2 are the molar fractions of monolayer components 1 and 2, and π is the surface pressure measured in mN/m. These areas are apparent when subphases are peptide solutions.

The values of the interaction parameters at different pressures (α) and the corresponding energies (ΔH) were calculated using

$$\alpha = \frac{\Delta G_M^{EX}}{RT(X_a X_b^2 + X_b X_a^2)} \quad (2)$$

X_a and X_b are the molar fractions.

Table 1. Thermodynamic Parameters for DPPC/CL Mixtures^a

	subphase PBS			subphase MAP4VP1		
	ΔG_M^{EX}	α	ΔH	ΔG_M^{EX}	α	ΔH
DPPC 0.8/CL 0.2	803.1	2.04	2509.9	2655	6.75	8927.1
DPPC 0.6/CL 0.4	493.5	0.84	514	2092.6	3.55	2179.8
DPPC 0.4/CL 0.6	-1932	-3.28	-2013	1923.2	3.26	2003.4
DPPC 0.2/CL 0.8	-319.3	-0.81	-498.9	265.8	0.68	415.8

^a ΔG_M^{EX} and ΔH in J/mol.

Table 2. Thermodynamic Parameters for DPPC/DPPE Mixtures^a

	subphase PBS			subphase MAP4VP1		
	ΔG_M^{EX}	α	ΔH	ΔG_M^{EX}	α	ΔH
DPPC 0.8/DPPE 0.2	97.9	0.25	153	-930.3	-2.37	-1454
DPPC 0.6/DPPE 0.4	424.2	0.72	441.9	-927.7	-1.47	-966.4
DPPC 0.4/DPPE 0.6	1020.9	1.73	1063.3	10.3	0.02	10.7
DPPC 0.2/DPPE 0.8	800.3	2.04	1250.5	-18.9	-0.05	-29.6

^a ΔG_M^{EX} and ΔH in J/mol.

Table 3. Thermodynamic Parameters for DPPC/DPPG Mixtures^a

	subphase PBS			subphase MAP4VP1		
	ΔG_M^{EX}	α	ΔH	ΔG_M^{EX}	α	ΔH
DPPC 0.8/DPPG 0.2	686.6	2.21	3404	8.66	10638.8	
DPPC 0.6/DPPG 0.4	694.8	1.18	2586.4	4.39	5388.4	
DPPC 0.4/DPPG 0.6	684	1.16	2516	4.27	5241.6	
DPPC 0.2/DPPG 0.8	1979.5	5.04	1697.7	4.32	5305.3	

^a ΔG_M^{EX} and ΔH in J/mol.

$$\Delta H = \frac{RT\alpha}{Z} \quad (3)$$

Z is the coordination number obtained, according to Quikenden and Tam,¹⁴ from the packing fraction values (PF).

$$PF = 0.907 A_{mc}/A_m \quad (4)$$

A_{mc} is the area/molecule of the mixture at the collapse point and A_m is the area/molecule of the mixture at each of the intermediate mixtures.

The values are given in Tables 1, 2, and 3, for surface pressures of 20 mN/m. DPPC/DPPG mixtures when spread on PBS gave isotherms lacking collapse. For this reason in Table 3 it was not possible to calculate ΔH as in the rest of the mixed monolayers. Numerical values associated with neutral monolayers are indicative that miscibility is almost ideal. ΔG_M^{EX} and ΔH values are in all cases lower than RT (2476.3 J/mol). Nevertheless, the sign of these thermodynamic parameters is indicative that when the subphase is PBS, the mixed monolayers are slightly expanded and, on the contrary, the presence of MAP4-VP1 on the subphase has a soft condensating effect.

The same calculations carried out for negatively charged monolayers showed that miscibility is not ideal, being the interaction maximum at low CL or DPPG content of 20%. Moreover, in both cases a clear expansive effect due to the presence of MAP4-VP1 is appreciated. Due to the four positive amino-terminal electrical charges of the peptide construct, the interaction could be due to electrostatic factors. This hypothesis will be discussed later.

Penetration of MAP4-VP1 into Monolayers. The insertion of MAP4-VP1 in monolayers of CL, DPPG, DPPE, and their mixtures with DPPC was determined by working at different initial surface pressures (5, 10, and 20 mN/

(12) Alsina, M. A.; Rabanal, F.; Mestres, C.; Busquets, M. A.; Reig, F. *J. Colloid Interface Sci.* 1993, 161, 310.

(13) Alsina, M. A.; Mestres, C.; Valencia, G.; García Anton, J. M.; Reig, F. *Colloid Surf.* 1988/89, 34, 151-8.

(14) Quikenden, T. I.; Tan, G. K. *J. Colloid Interface Sci.* 1974, 48 (3), 382-93.

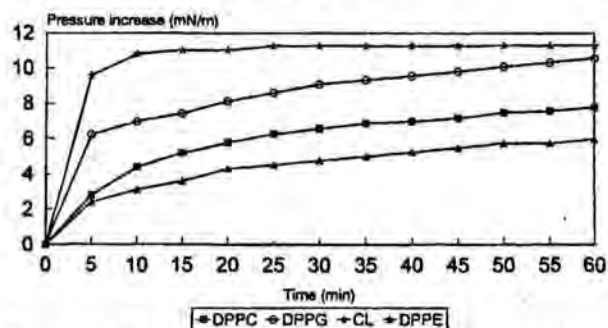


Figure 4. Time-course process for pressure increase due to the insertion of MAP4-VP₁ into phospholipid monolayers spread at 5 mN/m.

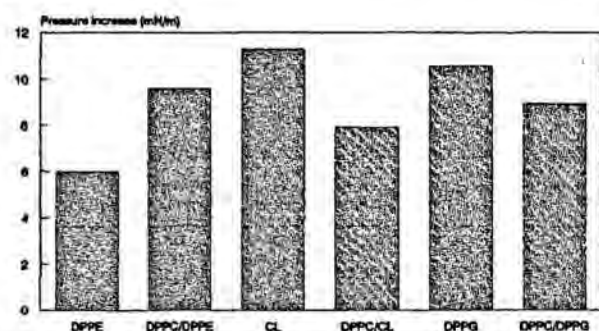


Figure 5. Pressure increases recorded after injecting MAP4-VP₁ solution under lipid monolayers spread at 5 mN/m of initial surface pressure.

m). The time course process for pure phospholipids monolayers is given in Figure 4. The values of pressure increases at 5 mN·m⁻¹ of initial pressure are given in the histogram of Figure 5. Mixed monolayers contained 90% of DPPC.

Maximal penetration was found for pure CL and DPPG monolayers. For DPPC and DPPE monolayers the pressure increases were slightly lower.

According to the geometry of MAP4-VP₁ it can be assumed that its location on the surface will be dependent on the monolayer electrical charge. In the case of CL or DPPG monolayers its negatively charged polar heads will be facing the aqueous surface and surface potential will create repulsive forces among them. The four positively charged amino acid groups of MAP4-VP₁ at the end of each peptide chains could neutralize in part the negative surface potential and insert in some way into the monolayer. This will explain the pressure increases detected at 5 mN/m of initial pressure. A similar trend was seen for monolayers spread at 10 and 20 mN/m of initial pressure.

Polarization of Fluorescence. SUV liposomes with the same composition of above described monolayers were prepared and incubated first with DPH or ANS; when the saturation level was reached liposomes were mixed with MAP4-VP₁ solutions.

Polarization was measured at different temperatures, and the transition point was determined after adjusting the experimental values to a sigmoidal curve and calculating the first derivative.

In all cases the main liposomal component was DPPC (90%).

The influence of DPPG or CL or DPPE and MAP4-VP₁ in the organization of bilayers is represented in Figure 6.

A decrease in the polarization values that is indicative of a fluidification of bilayers is clear. This means that MAP construct is able to insert into bilayers modifying the motion of alkyl chains. For negatively charged PL this effect is additive for both components CL or DPPG and MAP. Changes in T_c with respect to the transition temperatures of pure DPPC for all the liposomal compositions are given in Table 4. In mixtures containing DPPE this component has a rigidifying effect increasing the T_c (1.6 °C), but when MAP4-VP₁ was added to this system, a soft fluidifying effect was observed, being changes in T_c not significant compared to that of DPPC.

In this system again one can appreciate a common behavior for DPPG and CL opposite to that of DPPE, which is in agreement with results found in monolayers.

The interaction of these phospholipids and MAP4-VP₁ at the polar heads of the bilayers was studied by measuring the polarization and fluorescence values of ANS. In liposomes composed of DPPC, after adjusting the values to a sigmoidal curve, one could appreciate a soft tendency to decrease the transition temperature. Nevertheless, the statistical treatment showed that differences were not significant.

Samples containing 10% CL instead of PG showed that the presence of CL had a rigidifying effect over the range of all temperatures studied, but when MAP4-VP₁ was added to this system, polarization values decreased thus resulting in a fluidifying effect (Figure 7).

It is not clear why these two phospholipids having the same structure and electrical charge (CL is a diphosphatidyl glycerol) behave in a different way as far as ANS and MAP4-VP₁ interactions with DPPC are concerned. It seems logical to discard electrostatic interactions, as MAP4-VP₁, ANS, and PG or CL have 1 or 2 global negative charges, and repulsion forces should be predominant among them. But on the other hand due to the dimeric structure of CL, when a 10% molar change is introduced in the DPPC mixtures, in fact what one has is 20% of PG residues, and a stronger effect should be expected. Moreover, due to the chemical structure of CL where polar heads are linked by a glycerol moiety, obviously in this system motion has to be more restricted than that on PG.

Liposomes composed of DPPC and 10% DPPE and saturated with ANS showed a soft interaction with MAP4-VP₁, with differences among the three series of values being nonsignificant.

In summary it can be said that strongest interactions are found between negatively charged lipid and peptide constructs. These apparently important interactions cannot be affinity interactions but the result of the lipid surface potential activity that maintains lipid molecules apart from each other, increasing as a result the motion of the alkyl chains.

The analysis of thermodynamical parameters does not show important differences among them, with values of ΔH for DPPG-containing systems higher than those containing CL or DPPE. This is in agreement with the maximum changes in transition temperature determined in DPH experiments.

Table 4. Changes in T_c Variation for All Liposomal Compositions

	DPPC/DPPG	DPPC/DPPG MAP-VP1	DPPC/CL	DPPC/CL MAP-VP1	DPPC/DPPE	DPPC/DPPE MAP-VP1
ΔT_c	-5.5	-6.5	-1.7	-4.1	+1.6	+0.6 ^a

^a Nonsignificant values determined from the confidence intervals.

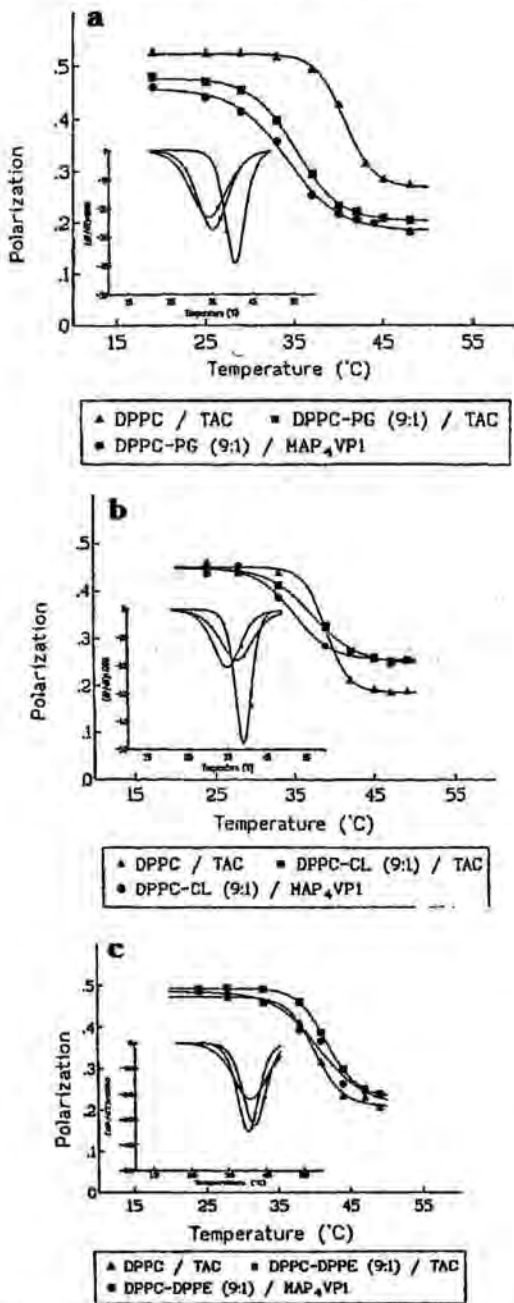


Figure 6. Temperature dependence of fluorescence polarization of DPH bound to phospholipids of phospholipid/MAP4-VP1: (a) DPPG; (b) CL; (c) DPPÉ.

Mono- and bilayer studies here reported showed some interesting insights into the details of the interaction between an homogeneous and tetrameric multiple anti-

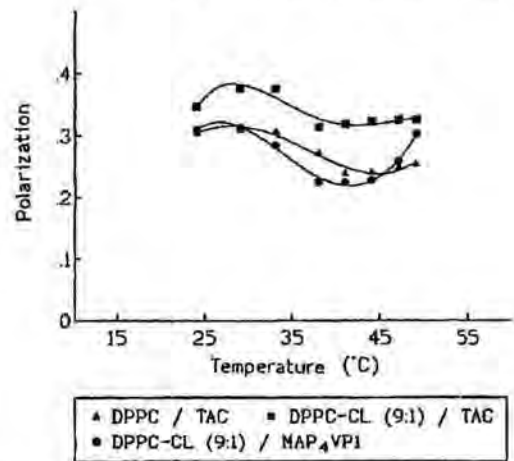


Figure 7. Polarization changes of DPPC/CL (9:10) and ANS.

genic peptide from the VP1(11–25) synthetic sequence of HAV and neutral and negatively charged phospholipids. Some degree of interaction with alkyl chains exists, thus suggesting the availability of liposomes as carriers for this MAP construct, but this interaction is not so strong as to lead to an instabilization of the mono- or bilayer.

Moreover, as has been reported¹¹ the degree of MAP peptide association to liposomes and the influence of this process in the bilayer stability are important points regarding the immunogenic results of the final administration form. In this sense, MAPs containing similar negative lipids could have important and practical applications as targeting agents in MAP delivery systems or as depots for slow release of the antigen.^{15,16} Besides, if improvement of the immunological response of MAP4-VP1(11–25)¹⁷ is required, a negatively charged lipid moiety can be introduced to the MAP carboxy terminus.¹⁸ Our results suggest that either the use of CL or DPPG could be a convenient approach for preparing MAP immunogens with lipidic moieties attached, also for presenting the peptide antigen on the surface of liposomes, or to be entrapped into liposomes of the previously described compositions.

Acknowledgment. This work was supported by Grants BIO-95-0061-C03-02 and BIO-95-0061-C03-03 from CICYT, Spain. We acknowledge the technical assistance of M. Sanchez.

LA960737V

(15) Rouaix, F.; Gras-Masse, H.; Mazingue, C.; Diesis, E.; Ridel, P. R.; Estaquier, J.; Capron, A.; Tartar, A.; Auriault, C. *Vaccine* 1994, 12 (13), 1209–14.

(16) Berndt, P.; Fields, G. B.; Tirell, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 117, 9515–22.

(17) Haro, I.; Plntó, R. M.; Gonzalez-Dankaart, J. F.; Perez, J. A.; Reig, F.; Bosch, A. *Microbiol. Immunol.* 1995, 39, 485–90.

(18) Huang, W.; Nardelli, B.; Tam, J. P. *Mol. Immunol.* 1994, 31 (15), 1191–9.

Membrane interaction of synthetic multiple antigenic peptide related to the Hepatitis A viral VP3 protein sequence (110–121)

A. Ortiz^{1,2*}, I. Haro², Y. Cajal¹, F. Reig² and M. A. Alsina¹

¹Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

²Department of Peptides, CID, CSIC, Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

Received 27 May 1998; accepted 19 June 1998

INTRODUCTION

MAP₄ VP3 (110–121) is a multiple antigenic peptide (Tam, 1988); constructed of four units of the sequence 110–121 from the VP3 protein of the Hepatitis A virus, and it is highly immunogenic (Perez *et al.*, 1995). The characterization of the interaction of MAP₄ VP3 with model membranes is of great interest because antigens must first interact with the membrane of the immune system cell, in order to elicit the immunogenic response.

The effect of the peptide on the fluidity of the bilayers was studied by fluorescence polarization using probes located in different regions of the lipid bilayer: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) preferentially locates in the hydrophobic core of the bilayer; and 1-anilino-naphthalene-8-sulphonic acid (ANS), in the hydrophilic region (Cajal *et al.*, 1995).

The integrity of the vesicles in the presence of the peptide above and below T_c was assessed with SUV labelled with the fluorescent phospholipid *N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)dioleoyl-phosphatidylethanolamine (NBD-PE), using the dithionite assay (McIntyre and Sleight, 1991). Also, peptide-induced leakage of the aqueous probe carboxyfluorescein (CF) was determined.

EXPERIMENTAL

Fluorescence Polarization was studied through polarization changes of DPH and ANS molecules. Polarization values were read at increasing temperatures and spectra were also recorded.

Intrinsic fluorescence was determined by adding small aliquots of SUVs to a peptide solution. The spectrum was corrected for scattering, dilution and the inner-filter effect. Validation of this process was assessed with *N*-acetyl-tryptophanamide.

*Correspondence to: A. Ortiz, Department of Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain.

Dithionite fluorescence assay was used to determine the membrane destabilizing properties of MAP₄ VP3 on the different liposome compositions.

Carboxyfluorescein-leakage experiment was performed by incubation of an aliquot of vesicles loaded with CF in peptide solution or buffered solution (lipid/peptide 14:1 mol:mol).

RESULTS

Effect of MAP₄ VP3 peptide on the thermotropic behaviour of the phospholipids

Studies of DPH fluorescence depolarization carried out with DPPC vesicles show that MAP₄ VP3 produce an ordering on the liquid-crystalline state, increasing the transition temperature. This effect is similar to that observed with ANS molecules, indicating a deep insertion of the peptide into the bilayer. A similar

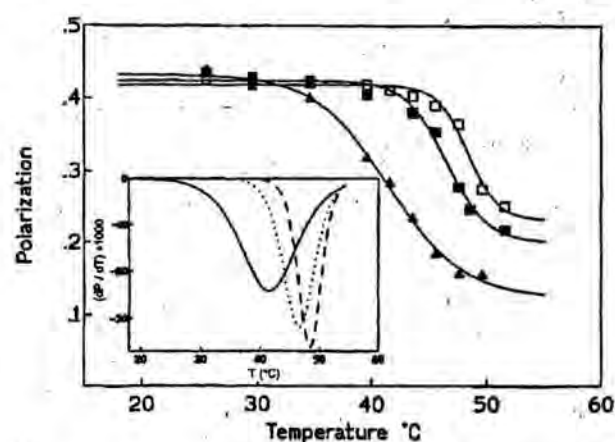


Figure 1. Polarization versus temperature determined in DPPC-5% SA/DPH liposomes suspended in either TAC (■) or peptide solution (□) and DPPC-5% SA/DPH liposomes suspended in TAC (▲). Inset: first-derivative analysis of the melting profiles expressed in arbitrary units.

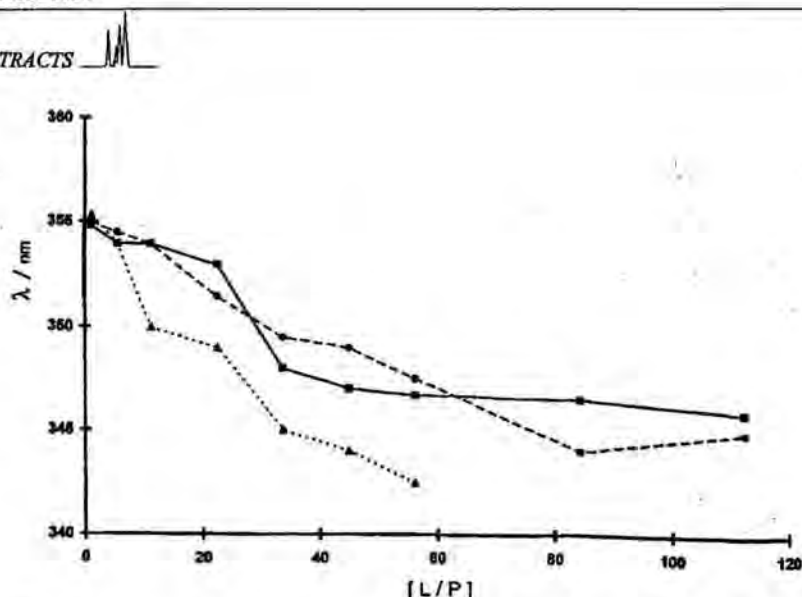


Figure 2. Changes in tryptophan wavelength emission maximum of MAP₄ VP3 in the presence of SUV liposomes of DPPC (▲), DPPC/SA (■), and DPPC/PI (●). Excitation: 285 nm.

behaviour was observed with liposomes containing phosphatidyl inositol (PI), these induce a decrease in polarization, indicative of a fluidification of bilayers, but when adding MAP₄ VP3 this effect is almost reversed.

Stearylamine (SA)-containing liposomes present a different polarization/temperature order relationship. Both SA and MAP₄ VP3 promote a rigidification of bilayers (Fig. 1). Comparing the curves corresponding to the first derivatives of the transition process one can appreciate an increase of the cooperativity of the process as well as in the transition temperature.

Tryptophan fluorescence

MAP₄ VP3 in buffer has an emission maximum at 355 nm, and it shifts to lower wavelengths on binding to SUVs of DPPC, DPPC/SA and DPPC/PI (Fig. 2); but as can be expected due to the anionic net charge of the peptide, it interacts more strongly with cationic SUV. The fact that we can also see binding with zwitterionic and anionic SUV indicates that there is a non-electrostatic component in the interaction of MAP with lipid membranes.

CF leakage from liposomes induced by MAP₄ VP3

MAP₄ VP3 does not increase significantly the permeability of DPPC SUVs, but binding to cationic DPPC/SA liposomes results in leakage of 38% after 30 minutes incubation, and it increases to 50% in 60 minutes. CF

release is slow and time-dependent, indicating that it is not due to rapid solubilization of the vesicles or membrane lysis.

Accessibility of phospholipids in the liposomes by the dithionite assay

MAP₄ VP3 does not disrupt DPPC vesicles; but the effect in cationic DPPC/SA liposomes was different, with a marked increase in the percentage of lipid that reacts to dithionite. The vesicles have 56% of lipid in the outer monolayer, and this amount increases to 66% and to 69% in the presence of 5 mol% and 15 mol% of MAP₄ VP3, respectively. Therefore, we can conclude that MAP₄ VP3 has an important destabilizing effect on these vesicles, increasing their permeability, which is consistent with the CF leakage results described previously.

Acknowledgements

This work was supported by Grants BIO 95-0061-CO3-02 and BIO 95-0061-CO3-03 from CICYT, Spain.

REFERENCES

- Cajal, Y., Rabanal, F., Alsina, M. A. and Reig, F. 1995. *Biopolymers* 38:607.
- McIntyre, J. C. and Sleight, R. G. 1991. *Biochemistry*, 30:11819.
- Perez, J. A., Gonzalez-Dankaart, J. F., Reig, F., Pinto, R. M., Bosch, A. and Haro, I. 1995. *Biomed. Peptid., Protein. & Nucleic.* 1:93.
- Tam, J. P. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:5409.

A. Ortiz¹Y. Cajal¹I. Haro²F. Reig²M. A. Alsina¹

¹ Department of Physical
Chemistry,
Faculty of Pharmacy,
University of Barcelona,
Avn. Joan XXIII s/n,
08028 Barcelona, Spain

² Department of Peptides,
CID-CSIC,
Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain

Received 12 March 1999;
accepted 3 December 1999

Fluorescence Study on the Interaction of a Multiple Antigenic Peptide from Hepatitis A Virus with Lipid Vesicles

Abstract: The interaction of the multiple antigenic peptide MAP₄VP3 with lipid membranes has been studied by spectroscopic techniques. MAP₄VP3 is a multimeric peptide that corresponds to four units of the sequence 110–121 of the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. In order to evaluate the electrostatic and hydrophobic components on the lipid–peptide interaction, small unilamellar vesicles of different compositions, including zwitterionic dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), anionic dipalmitoylphosphatidylcholine/phosphatidylinositol (DPPC : PI 9:1), and cationic dipalmitoylphosphatidylcholine/stearylamine (DPPC : SA 9.5:0.5), were used as membrane models. Intrinsic tryptophan fluorescence changes and energy transfer experiments show that MAP₄VP3 binds to all three types of vesicles with the same stoichiometry, indicating that the electrostatic component of the interaction is not important for binding of this anionic peptide. Steady-state polarization experiments with vesicles labeled with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene or with 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid indicate that MAP₄VP3 induces a change in the packing of the bilayers, with a decrease in the fluidity of the lipids and an increase in the temperature of phase transition in all the vesicles. The percentage of lipid exposed to the bulk aqueous phase is around 60% in intact vesicles, and it does not change upon binding of MAP₄VP3 to DPPC vesicles, indicating that the peptide does not alter the permeability of the membrane. An increase in the amount of lipid exposed to the aqueous phase in cationic vesicles indicates either lipid flip-flop or disruption of the vesicles. Binding to DPPC vesicles occurs without leakage of entrapped carboxy-fluorescein, even at high mol fractions of peptide. However, a time-dependent leakage is seen with

Correspondence to: M. A. Alsina; e-mail: alsina@farmacia.far.ub.es

Contract grant sponsor: CICYT and Ministerio de Educación y Cultura (Spain)

Contract grant number: BIO 95-0061-CO3-02 and BIO 95-0061-CO3-03 (CICYT)

Biopolymers, Vol. 53, 455–466 (2000)

© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

cationic DPPC/SA and anionic DPPC/PI vesicles, indicating that the peptide induces membrane destabilization and not lipid flip-flop. Resonance energy transfer experiments show that MAP₄VP3 leakage from cationic vesicles is due to membrane fusion, whereas leakage from anionic vesicles is not accompanied by lipid mixing. Results show that MAP₄VP3 interacts strongly with the lipid components of the membrane, and although binding is not of electrostatic nature, the bound form of the peptide has different activity depending on the membrane net charge; thus, it is membrane disruptive in cationic and anionic vesicles, whereas no destabilizing effect is seen in DPPC vesicles. © 2000 John Wiley & Sons, Inc. Biopoly 53: 455–466, 2000

Keywords: lipid-peptide interaction; multiple antigenic peptide; fluorescence; hepatitis A vaccine

INTRODUCTION

Hepatitis A is an acute, self-limited infection transmitted predominantly by the fecal-oral route, although percutaneous transmission is possible. It has a worldwide distribution, accounting for an estimated 1.4 million cases and annual expenses of approximately \$1.5 to \$3 billion.¹ Although commercially manufactured inactivated vaccines against this disease are very safe and effective, they are expensive and thus offer only limited potential for control of hepatitis A on a populationwide scale.² Alternative vaccines against hepatitis A include the synthesis of peptides derived from the capsid proteins of hepatitis A virus (HAV) that can elicit immunogenic responses when administered to the host. Peptide antigens are weakly immunogenic in free form; however, constructs of several antigenic peptide molecules, or multiple antigenic peptides (MAPs), are more efficient immunogens.^{3–5} MAPs are branched compounds based on a core of lysine residues containing both α - and ϵ -amide linkages⁶; by sequential propagation with the amino groups of lysine, a branched scaffolding can be built where the antigenic peptide sequences are synthesized. In contrast with individual peptide sequences, MAPs are immunogenic even without protein carrier, probably because they confer some conformational stability to the peptide antigens, which is important for the induction of antibodies reacting with the native protein, and they have been successfully used to prepare vaccines against hepatitis B⁷ and malaria.⁸ In a previous study, we have shown that the sequence 110–121 from the capsid protein VP3 of HAV is a continuous epitope that is recognized by sera from convalescent patients, and elicits the production of virus-neutralizing antibodies.⁹ In order to enhance these immunogenic properties, a construct of four units of this epitope branched on a lysine residue core, MAP₄VP3, has been synthesized following the strategy of Tam.⁶ Incorporation of the MAPs in the bilayer of lipid vesicles can also increase the immunogenic response, by protecting the peptide from lytic enzymes, allowing a slow release that can result in a

continuous stimulation of the immune system, and even by facilitating delivery of the antigen to the antigen-presenting cells.^{10–13}

In this paper, the interaction of MAP₄VP3 with lipid vesicles was studied by spectroscopic techniques. Unilamellar vesicles (liposomes) of different compositions were prepared, with positive, negative, and neutral net charge, in order to examine the influence of the electrostatic and hydrophobic components on the interaction of this amphipathic anionic peptide with the membrane. A better understanding on the interaction of the antigenic peptide with the membrane is important to design a synthetic hepatitis A vaccine based on liposomes, since the physical properties of the membrane can determine the conformation of the peptide and the way it is processed by the antigen-presenting cells.¹⁴ The cationic dipalmitoylphosphatidylcholine/stearylamine vesicles used in this study are particularly interesting, since cationic vesicles are known to fuse with the cell membranes, thus facilitating delivery of the associated peptides to their target cells.^{12,13,15}

MATERIALS AND METHODS

Materials

DPPC, phosphatidylinositol from soybean (PI), SA, and 1-anilino-8-naphthalene sulphonic acid (ANS) were from Sigma, and were used without further purification. 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), carboxyfluorescein (CF), and dithionite (sodium hypodisulfite) were from Fluka. N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)-dioleoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) and N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-dioleoyl phosphatidylethanolamine (Rh-PE) were from Avanti. MAP₄VP3(110–121) was synthesized, purified, and characterized as described elsewhere¹⁶; its purity was >99%. All solvents used were of spectroscopic grade. Experiments were carried out either in 10 mM Tris buffer or in 0.25M sodium acetate/acetic acid buffer, both at pH 7.4.

Vesicle Preparation

Small unilamellar vesicles (SUV) 20 or 27 mM lipid were prepared by evaporation of a mixture of the desired lipids in

CHCl₃/CH₃OH (2:1 v/v). The dried film was hydrated with 0.25M sodium acetate/acetic acid buffer (pH 7.4, 15.4 mM · cm⁻¹, 313.35 mOsm · Kg⁻¹), and then sonicated 8 cycles of 2 min each under a stream of nitrogen at 20 W with a $\frac{3}{8}$ flat disrupter tip mounted on a Vibracell Sonicator (Sonics & Materials, Inc.). SUVs were isolated as the clear supernatant after a 60 min 50,000× *g* centrifugation process, which was applied to remove titanium particles from the tip and residual multilamellar structures. Vesicles of three different compositions were prepared by this method, DPPC, DPPC/PI (9:1), and DPPC/SA (9.5:0.5), or the same mixtures containing 0.6% or 2% NBD-PE, 0.6% Rh-PE, or 0.3% NBD-PE and 0.3% Rh-PE. In the case of DPPC/SA vesicles, homogeneity of the vesicle population was greatly improved by submitting the hydrated lipid film to 5 cycles of freezing and thawing before sonication. SUVs of the same composition for CF leakage experiments were obtained after hydration of the lipid film with a 100 mM CF solution. The vesicles were separated from unencapsulated CF by basquet centrifugation on plastic syringes filled with Sephadex G-50 (Pharmacia) and equilibrated with acetate buffer. Vesicles were left to anneal for 1 h, 10°C above their transition temperature. Phospholipid concentration was determined by the method of Barlett.¹⁷ Vesicle size was measured by dynamic light scattering at 90° angle with a Malvern II-C autosizer. The z-average mean diameter was in the range of 110–120 nm (polydispersity ranging from 0.1 to 0.3).

Labeling of Vesicles for Polarization Measurements

A stock solution 1 mM DPH was prepared in tetrahydrofuran (THF), and diluted with acetate buffer to 0.05 mM immediately before use. Equal volumes (250 μL) of 27 mM vesicles and 0.05 mM DPH were mixed and left to react for 1 h at a temperature 10°C higher than that of the vesicles transition temperature (*T_c*), with gentle shaking. Labeling of vesicles with ANS was carried out in the same way, except that the stock solution in THF was diluted to 0.09 mM. In this range, fluorescence polarization (*P*) was not dependent upon concentration and/or light scattering.

Fluorescence Titration Experiments

All fluorescence measurements were performed on a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorimeter equipped with polarizers in both excitation and emission beams. Unless otherwise stated, both slit widths were kept at 4 nm and the samples were constantly stirred. Temperature was controlled by a circulating water bath (Heto, Birkerød, Denmark, Type 03E623). The interaction of MAP₄VP3 with lipid membranes of different compositions was studied by monitoring the changes in tryptophan fluorescence emission spectra of the peptide upon addition of vesicles. Small aliquots of SUVs (20 mM) were added to a solution 7 μM peptide up to a lipid-peptide molar ratio of 60:1. The suspension was continuously stirred, and after each addition of lipid, it was

left to equilibrate for 5 min before recording the spectrum. Emission spectra were recorded upon excitation at 285 nm, and corrected for light scattering, sample dilution and inner-filter effect.^{18,19} For each amount of added lipid, a corrected tryptophan spectra was obtained by subtraction of the appropriate vesicle blank, after which the exact wavelength of maximum emission was determined from the first derivative of the spectra. In addition to the scattering correction, fluorescence emission intensity at 340 nm was also corrected from inner-filter effects, and the corrected values (*F*) were obtained as follows:

$$F = F_m \cdot 10^{(A_{285} + A_{340})/2}$$

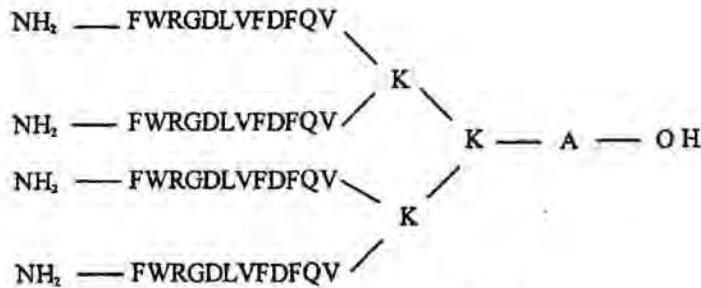
where *F* is the corrected fluorescence intensity, *F_m* is the measured fluorescence intensity after correction for scattering, and *A₂₈₅* and *A₃₄₀* are the absorbances of the vesicles at 285 and 340 nm respectively, measured in a LKB-Biochrom Ultraspec II spectrophotometer. The goodness of this correction factor was assessed in a parallel lipid titration of N-acetyl-tryptophanamide, since the fluorescence properties of this compound are not affected by lipids.^{20,21}

Binding Isotherms

The binding of MAP₄VP3 to vesicles of the desired lipid composition containing 2% NBD-PE was determined as the increase of the resonance energy transfer (RET) signal from Trp residues in the peptide to the labeled phospholipid in the interface at 535 nm (excitation 285 nm). Vesicles in buffer were titrated with MAP₄VP3 from a stock solution, and stoichiometry was determined directly from the plot of δF vs peptide/lipid (mol : mol). The relative change in fluorescence δF is defined as $(F - F_0)/F_0$, where *F₀* and *F* are the intensities without and with peptide, respectively. Since the lipid concentration was very low (32 μM), the contribution from light scattering was less than 3%.

Fluorescence Assay Using Dithionite

Reaction of SUVs containing NBD-PE with dithionite selectively eliminates the fluorescence signal derived from NBD present in the outer leaflet by a reduction reaction.²² An aliquot (16 μM) of either DPPC, DPPC/PI (9:1), or DPPC/SA (9.5:0.5) vesicles doped with 0.6% NBD-PE, was added to 2.5 mL of 10 mM Tris (pH 7.4) saturated with nitrogen (lipid concentration 16 μM). The desired amount of MAP₄VP3 was then added and fluorescence intensity was recorded. When a stable baseline was achieved (less than 60 s after addition), the reaction was started by adding dithionite to a final concentration of 20 mM. Dithionite solutions were freshly prepared in 0.5M Na₂CO₃ (pH 11) flushed with nitrogen and stored a maximum of 1 h in ice. The time-dependent decrease in fluorescence signal at 535 nm was recorded for 800 s (resolution 1 s). Excitation wavelength was set at 460 nm. Total quenching was achieved after addition of 90 μL of 33 mM deoxycholate.

FIGURE 1 Primary structure of MAP₄VP₃.

Leakage of Carboxyfluorescein from Vesicles

Increase in permeability of the vesicles induced by MAP₄VP₃ was measured as the increase in fluorescence intensity of CF entrapped in vesicles of the desired composition at self-quenching concentrations (100 mM), due to dilution upon leakage. An aliquot of 5 μ L of 20 mM DPPC, DPPC/PI (9:1), or DPPC/SA (9.5:0.5) vesicles entrapping CF was diluted in 1.4 mL of a 5 μ M peptide solution in acetate buffer (lipid/peptide 14:1 mol : mol), and incubated at 20°C. At certain time intervals, aliquots of 100 μ L of the sample were diluted with 2.5 mL of buffer and the fluorescence intensity of CF was monitored at 520 nm upon excitation at 490 nm. Blank samples without peptide were prepared to correct for background fluorescence. Results are expressed as the percent of the intensity obtained after Triton X-100 addition to solubilize the vesicles (100% CF leakage), according to

$$\% \text{ Leakage} = (F - F_0)/(F_i - F_0) \times 100$$

where F is the fluorescence intensity in the presence of peptide, and F_0 and F_i are the intensities in the absence of peptide and after addition of detergent, respectively.

Lipid Mixing by RET

Mixing of phospholipids between vesicles as a consequence of vesicle fusion induced by MAP₄VP₃ was determined by RET. Vesicles of the desired composition were prepared including 0.6% of NBD-PE or Rh-PE codispersed with the unlabeled lipids. NBD and Rh-vesicles were mixed in a 1:1 mol ratio in 1.5 mL buffer, pH 7.4, with a total lipid concentration of 134 μ M. Lipid mixing was determined as the increase in RET between the fluorescently labeled lipids, monitoring the decrease in NBD-PE signal. Excitation was at 460 nm, and fluorescence emission from NBD was monitored at 530 nm, with 4 nm slit widths. The change in fluorescence was calculated as $\delta F = [F - F_0]/[F_{\max} - F_0] \times 100$, with F_0 and F corresponding to the fluorescence intensities before and after the addition of peptide, and F_{\max} as the fluorescence after total mixing of lipids, measured with covesicles containing 0.3 mol % of each of the probes at the same total bulk lipid concentration. In

some cases fusion was monitored by measuring dilution of the probes mixing vesicles containing 0.3% of NBD-PE and 0.3% Rh-PE with excess unlabeled vesicles of the same composition (mol ratio 1:50).

Fluorescence Polarization

Fluorescence polarization measurements of DPH and ANS were obtained with a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorimeter operating in the ratio mode. Steady-state fluorescence polarization (P) was calculated automatically according to

$$P = (I_{vv} - G \cdot I_{vh}) / (I_{vv} + G \cdot I_{vh})$$

where I_{vv} and I_{vh} are the vertical and horizontal components of the emission when the sample is excited with vertically polarized light. The correction factor for multiplier sensitivity (G), was calculated as $G = I_{Hv}/I_{Hh}$. The excitation and emission wavelengths were 365/425 nm for DPH (slit-widths 8 nm), and 380/480 nm for ANS (slit-widths 10 nm). Labeled vesicles (0.4 mM) were incubated either with MAP₄VP₃ (5 μ M) or in buffer alone, and polarization was measured from $\sim 17^\circ\text{C}$ up to $\sim 55^\circ\text{C}$ at 2°C intervals, allowing for thermal equilibration. Experiments were done in triplicate, and accuracy was $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Moreover, fluorescence emission spectra for DPH and ANS were simultaneously recorded.

RESULTS

Changes in Tryptophan Fluorescence on Binding of MAP₄VP₃ to Lipid Vesicles

MAP₄VP₃ (Figure 1) is a peptide construct that contains four units of an immunogenic peptide corresponding to the sequence 110–121 of VP₃, a protein that belongs to the capsid of hepatitis A virus and is highly exposed in the infective virus. Each sequence has a tryptophan residue, very useful to study the interaction of the peptide with lipid membranes. The fluorescence properties of tryptophan depend on the polarity of its environment, and therefore changes in

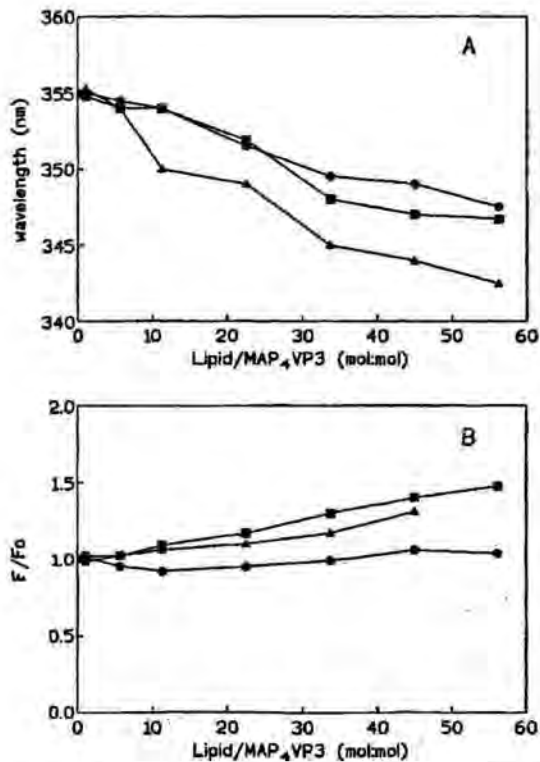


FIGURE 2 Changes in tryptophan wavelength emission maximum (A) and in tryptophan fluorescence intensity (B) of MAP₄VP3 in the presence of SUV vesicles of DPPC (▲), DPPC/SA (9.5:0.5) (■), and DPPC/PI (9:1) (●), as a function of the total lipid-to-peptide mol ratio. Experiments were carried out in 10 mM Tris, pH 7.4 at 20°C. Peptide concentration 7 μM. Excitation 285 nm.

fluorescence intensity and emission maximum give information on the insertion of the peptide in the lipid bilayer. The wavelength of maximum fluorescence emission of MAP₄VP3 in aqueous solution is at 355 nm upon excitation at 285 nm, indicating a high degree of exposure of the Trp residues to the bulk aqueous phase. As shown in Figure 2A, the emission maximum shifts to lower wavelengths on binding to vesicles of DPPC, DPPC/SA (9.5:0.5), and DPPC/PI (9:1). For example, at a lipid to peptide mol ratio of 45:1, the emission maximum is at 344 nm in DPPC vesicles, at 347 nm in DPPC/SA, and at 349 nm in DPPC/PI. The change in intensity of fluorescence emission at 340 nm at different lipid-to-peptide ratios is shown in Figure 2B. In this figure, reported fluorescence values are corrected as indicated in Materials and Methods, and in the case of DPPC vesicles, results are reported only up to a lipid-to-peptide mol ratio of 45:1, because at higher lipid concentrations the contribution from inner filter effect due to the lipid

was too important. Binding of MAP₄VP3 to anionic DPPC/PI vesicles occurs without significant changes in fluorescence intensity; however, a significant increase in fluorescence intensity accompanies binding to cationic DPPC/SA and zwitterionic DPPC. Taken together, these results indicate that MAP₄VP3 binds all three types of vesicles, and in all cases the fluorescence changes are indicative of a more hydrophobic environment for Trp, reflecting some degree of insertion of MAP₄VP3 into the hydrophobic core of the bilayer. Interestingly, binding is not very much influenced by electrostatic forces, as it may be expected due to the anionic net charge of the peptide; the fact that there is binding to zwitterionic and anionic vesicles indicates that there is a nonelectrostatic component in the interaction of MAP₄VP3 with lipid membranes.

Estimation of Peptide-to-Vesicle Ratio by RET

Evidence for the binding of MAP₄VP3 to lipid vesicles comes from the resonance energy transfer signal resulting from the tryptophan donors of the peptide to the NBD-lipid acceptor at the interface, with a RET distance of about 15 Å. As shown in Figure 3, the RET intensity at 535 nm increases with the amount of peptide added, and the intensity reaches a maximum when the surface is essentially covered with the peptide. Stoichiometry was determined directly from the plot of δF vs peptide/lipid (mol : mol) as the cross-point between the line formed by the points at low peptide concentration and the line defined by the points at high peptide concentration, where the RET signal reaches saturation. A stoichiometry of 14

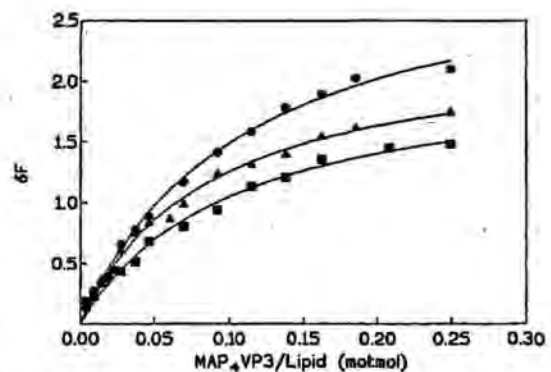


FIGURE 3 Binding of MAP₄VP3 to vesicles (32 μM) containing 2% of NBD-PE. The RET intensity from Trp of peptide to the label at the interface was measured at 535 nm (excitation at 285 nm). Lipid composition was DPPC (▲), DPPC/SA (9.5:0.5) (■), and DPPC/PI (9:1) (●).

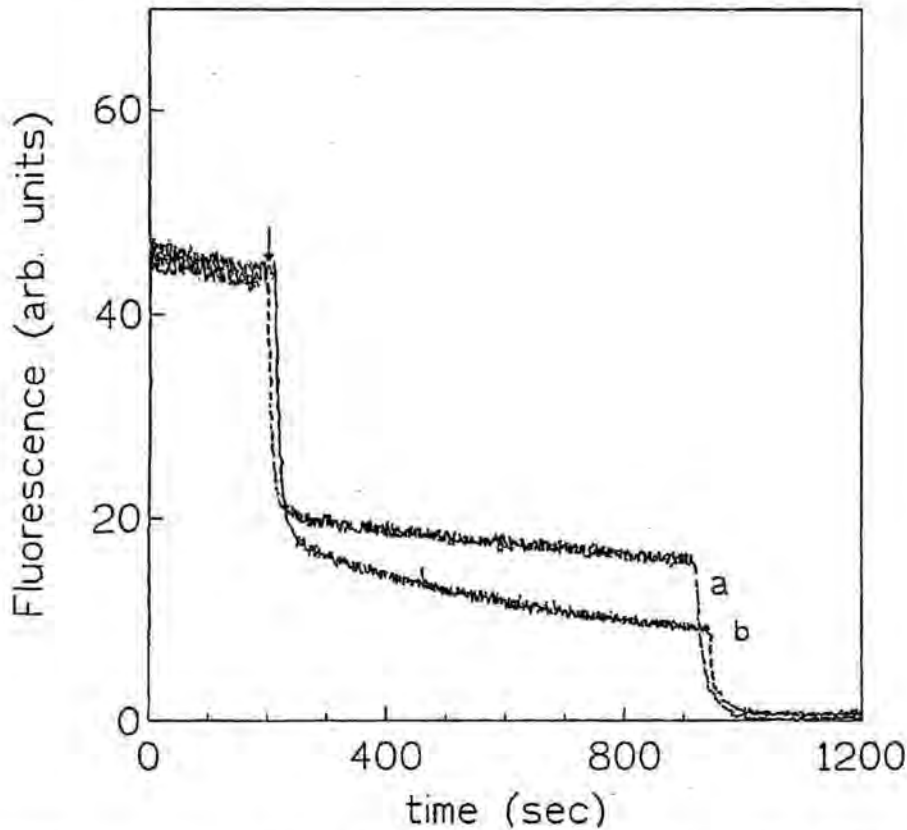


FIGURE 4 Time course for loss of fluorescence of NBD-PE (0.6% in DPPC/SA SUVs) by dithionite added to the aqueous phase. Dithionite was added (arrow) to a suspension of vesicles ($16 \mu\text{M}$) in 10 mM Tris pH 7.4, without peptide (a), or in the presence of $15 \text{ mol } \%$ MAP₄VP3 (b), and the NBD-PE fluorescence was measured as a function of time. DPPC vesicles with $10 \text{ mol } \%$ peptide are the same as (a). At the end of the reaction, deoxycholate was added to a final concentration 2.2 mM , allowing reduction of the inner monolayer lipid.

DPPC molecules per peptide was calculated, whereas the values for DPPC/SA and DPPC/PI vesicles were 16 and 17 respectively. Thus, essentially the same binding stoichiometry was obtained for the three types of vesicles, independent of their net charge.

Accessibility of Phospholipids to the Bulk Aqueous Phase After MAP₄VP3 Binding

The percentage of lipid in a vesicle that is accessible to dithionite was used to determine the membrane-destabilizing properties of MAP₄VP3 on the different vesicle compositions. Addition of dithionite to vesicles of the desired lipid composition containing $0.6 \text{ mol } \%$ NBD-PE results in a partial decrease in the fluorescence from NBD (Figure 4), as expected if

only the probe in the outer monolayer of the vesicles is modified by the reagent. The reaction starts immediately after addition of dithionite, and has two components: a fast process, complete in less than 100 s , and a parallel slow time-dependent process. The fast reaction is due to the reduction of the readily exposed lipid present in the outer monolayer of the liposomes. The slow rate of fluorescence decrease is due to permeation of the membrane to the reagent and reaction of the labeled lipid in the inner monolayer, as demonstrated elsewhere.²³ The percentage of fluorescent lipid present in the outer monolayer of the vesicles was calculated as $\{1 - (F - F_i)/(F_o - F_i)\} \times 100$, where F is the fluorescence value obtained by extrapolating the slow reaction rate to time zero; F_i is the fluorescence after all the lipid has reacted, calculated by adding deoxycholate; and F_o is the fluores-

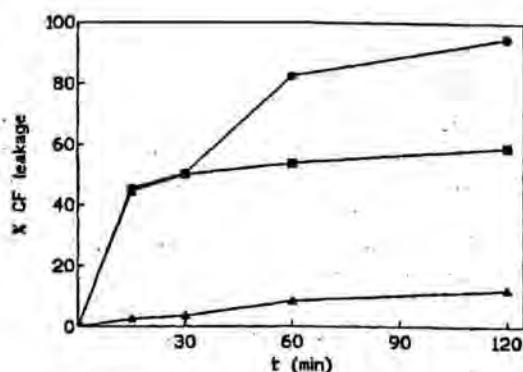


FIGURE 5 Time course of carboxyfluorescein leakage from SUVs of DPPC/SA (■), DPPC/PI (●), and DPPC (▲) in the presence of MAP₄VP3 at a lipid to peptide ratio of 14:1 (mol : mol). Lipid concentration 71 μ M. Experiments were carried out at 20°C in 0.25M acetate buffer pH 7.4 and with continuous mechanical stirring.

cence of the vesicles prior to addition of dithionite. For DPPC vesicles, the fraction of dithionite-quenched NBD-PE does not change in the presence of MAP₄VP3, even at high peptide concentrations of up to 10 mol % (Figure 4). This clearly indicates that vesicle leakage or solubilization does not occur, and that flip-flop or transmonolayer movement of phospholipids is not promoted by the bound peptide under these conditions. Binding to cationic DPPC/SA vesicles results in an increase in the amount of lipid accessible to dithionite, as shown in Figure 4, suggesting either leakage and disruption of the bilayer barrier or lipid flip-flop. For example, 56% of lipid reacts with dithionite in the absence of peptide, and this amount increases to 66% in the presence of 5 mol % of MAP₄VP3, and to 70% in the presence of 15 mol % of peptide (Figure 4, curve b). DPPC/PI vesicles were permeable to dithionite even in the absence of peptide.

Leakage of Carboxyfluorescein from Vesicles Induced by MAP₄VP3

Perturbations in membrane structure induced by the binding of MAP₄VP3 to the different vesicles under study was examined by measuring leakage of the entrapped aqueous probe CF. MAP₄VP3 does not increase significantly the permeability of DPPC SUVs, even at high concentrations of the peptide (up to a lipid-to-peptide mol ratio of 14:1); for example, as shown in Figure 5, after 30 min incubation less than 5% of the aqueous contents are released, and after 2 h leakage is approximately 10%. In contrast, binding of MAP₄VP3 to cationic DPPC/SA vesicles

results in CF leakage. After 30 min incubation, 50% of the entrapped CF has been released, and leakage almost does not increase afterward. This leakage is due to fusion of the vesicles induced by the peptide, as shown by the lipid mixing experiments described next and also suggested by the increase in scattering seen in this vesicles in the presence of peptide (not shown), a clear indication that larger particles are formed. That leakage is almost arrested after 30 min of incubation suggests the loss of destabilizing capability of the MAP construct, perhaps through conformational changes or through formation of oligomeric complexes, as it has been described for a fusion lipopeptide from influenza hemagglutinin.²⁴ In the case of DPPC/PI (9:1) vesicles, although they are permeable to dithionite per se, no significant leakage of CF was observed after 2 h; this is probably due to the higher molecular weight of CF. However, addition of MAP₄VP3 resulted in important increases in permeability, with a time-dependent leakage that reached 100% after 2 h.

Lipid Mixing Induced by MAP₄VP3

The leakage of aqueous contents induced by MAP₄VP3 from cationic and anionic vesicles is a clear indication of membrane destabilization. To determine if this permeation is due to destabilization of individual vesicles without fusion, for example by pore formation, or due to peptide-induced fusion, lipid mixing was monitored by resonance energy transfer between NBD-PE and Rh-PE. This is a very specific assay, because the probes do not exchange in the time scale of the experiments, even in aggregated vesicles.²⁵ As expected, MAP₄VP3 did not have any fusogenic effect on DPPC vesicles. Significant lipid mixing was induced by the peptide on cationic vesicles. Typical curves of lipid mixing time course are shown in Figure 6 for MAP₄VP3 bound to cationic DPPC/SA (9.5:0.5) vesicles. The initial phase of very fast mixing upon peptide addition is indicative of a transient destabilization of the membrane, as also described for a synthetic lipopeptide derived from influenza hemagglutinin²⁶; however, after a lag period of 20–40 s there is a slow and time-dependent lipid mixing characteristic of vesicle fusion. Surprisingly, no lipid mixing was induced by addition of MAP₄VP3 to anionic DPPC/PI (9:1) vesicles, as also shown in Figure 6, thus suggesting that the observed leakage of CF is due to disruption of the vesicles by the peptide rather than to vesicle fusion.

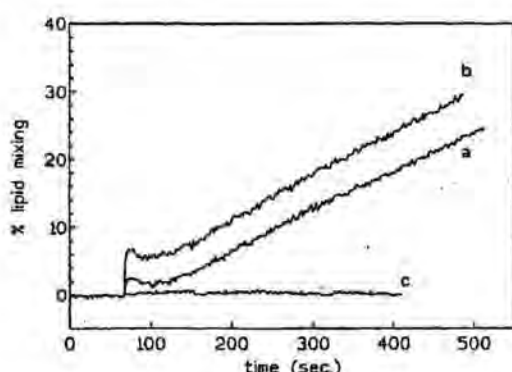


FIGURE 6 Kinetics of lipid mixing by MAP₄VP₃ as a function of the peptide mol fraction in DPPC : SA (9.5:0.5) vesicles with (a) 1.5 mol % peptide, (b) 3.0 mol % peptide, and (c) in DPPC : PI (9:1) vesicles with 6 mol % peptide. The peptide was added to a (1:1) mixture of vesicles containing 0.6% NBD-PE or Rh-PE in 10 mM Tris buffer pH 7.4. Lipid concentration 134 μM. Excitation was at 460 nm, emission at 530 nm.

Effect of MAP₄VP₃ on Membrane Fluidity

DPH is a hydrophobic fluorescent probe that locates preferentially in the hydrophobic core of the lipid bilayer, whereas ANS, another fluorescent probe, remains in the polar region of the membrane.²⁷ Both probes are highly fluorescent when bound to lipids or to hydrophobic domains of proteins, and by monitoring changes in the polarization of fluorescence of these probes bound to lipid vesicles it is possible to obtain information on the fluidity throughout the membrane. Plots of the temperature dependence of the polarization of DPH bound to DPPC SUVs both in the absence and presence of MAP₄VP₃ were analyzed according to¹⁸

$$Y = A + \frac{B - A}{1 + (10^{X/10^C})^D}$$

where Y represents the polarization, X the temperature, A and B are the bottom and top plateau of the polarization curve, and C is the X value at the middle of the curve ($C = T_c$). D is the Hill coefficient or slope factor. Goodness of fit was assessed on the basis of (a) SS/df , SS being the sum of squares, and df the degrees of freedom, (b) analysis of residuals, and (c) coefficient of determination r^2 . This allows an accurate determination of the gel to liquid transition temperature (T_c) for each of the lipids in the absence and presence of MAP₄VP₃. Moreover, first-derivative analysis of the phase transition profiles are used to compare the amplitude of the phase transition process in each case. Changes in the amplitude (width of the derivative curve at half the maximum high) are correlated to the cooperativity of the gel to fluid phase transition of the vesicles, both in the absence or in the presence of peptide. Results for the different lipid vesicles are summarized in Table I.

Binding of MAP₄VP₃ to DPPC vesicles results in an increase in the gel-to-liquid crystal phase transition temperature (T_c), and a decrease in the lipid fluidity at the hydrophobic core of the lipid bilayer throughout the studied range of temperatures from 20 to 50°C, as shown in Figure 7A. The amplitude of the change, calculated from first-derivative analysis of the phase transition profiles (inset in Figure 7A), shows no significant changes in the presence of the peptide, indicating that the cooperativity of the process is maintained. A similar effect is seen in the polar region of the membrane, with an increase in the polarization of ANS (Figure 7B). As a control, the fluorescence intensity from DPH- or ANS-labeled DPPC vesicles was not

Table I Changes in Membrane Fluidity (Polarization) and in T_c Induced by Addition of MAP₄VP₃ to SUVs of Different Compositions^a

Probe	Vesicles	$T < T_c$ (30°C)		$T > T_c$ (50°C)		T_c^b (°C)	
		Absence	+MAP ₄ VP ₃	Absence	+MAP ₄ VP ₃	Absence	+MAP ₄ VP ₃
DPH (interior)	DPPC	0.432 ± 0.010	0.468 ± 0.005(+)	0.160 ± 0.09	0.191 ± 0.008(+)	41.0	42.2(+)
	DPPC/SA	0.420 ± 0.004	0.421 ± 0.004(=)	0.230 ± 0.010	0.277 ± 0.007(+)	46.5	48.5(+)
	DPPC/PI	0.390 ± 0.007	0.424 ± 0.010(+)	0.160 ± 0.005	0.163 ± 0.008(=)	35.0	40.0(+)
ANS (interface)	DPPC	0.300 ± 0.010	0.320 ± 0.006(+)	0.242 ± 0.010	0.282 ± 0.002(+)		
	DPPC/SA	0.300 ± 0.002	0.332 ± 0.005(+)	—	— ^c		
	DPPC/PI	0.260 ± 0.010	0.317 ± 0.003(+)	0.204 ± 0.005	0.253 ± 0.008(+)		

^a Lipid to peptide mol ratio 80:1. Values are mean of three different experiments.

^b T_c of the melting process calculated by first derivative analysis (±0.5°C).

^c Experiment not done, due to changes in the fluorescence of the probe induced by the peptide at this temperature (see text).

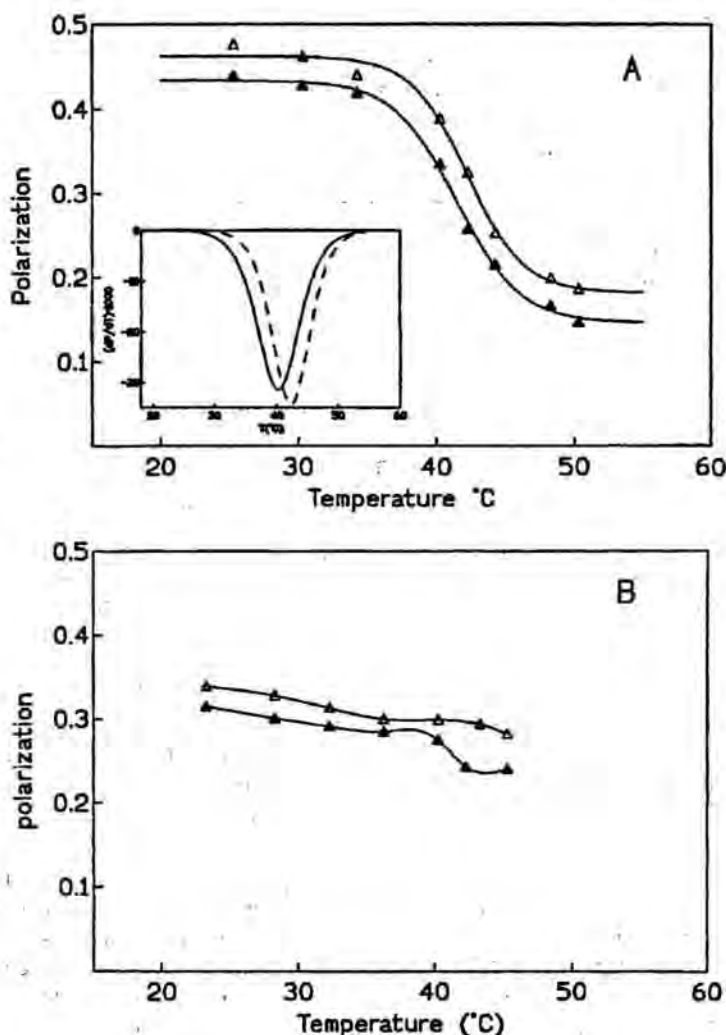


FIGURE 7 (A) Polarization changes vs temperature of DPH-labeled DPPC vesicles in the absence (\blacktriangle) or presence (\triangle) of MAP₄VP3. Inset: first-derivative analysis of the melting profiles expressed in arbitrary units; no peptide (continuous line), + MAP₄VP3 (dashed line). The position of the minimum correspond to T_c of the melting process. (B) Changes in polarization of ANS-labeled vesicles in the absence (\blacktriangle) or presence (\triangle) of MAP₄VP3. Experiments in acetate buffer, pH 7.4. Lipid to peptide mol ratio 80:1.

modified in the presence of peptide (not shown). Binding of MAP₄VP3 to cationic DPPC/SA (9.5:0.5) vesicles results in an increase of 2°C in the T_c (Table I), and an increase in the lipid order at temperatures above 40°C, whereas no changes in polarization of DPH were seen below the transition temperature (Figure 8). The amplitude of the transition process remains unchanged in the presence of peptide, suggesting that the bilayer structure is not lost, even though the peptide induces leaky vesicle fusion (Figures 4–6). Results with ANS shows that binding of MAP₄VP3 to cationic

vesicles does not result in any change in the fluidity at the polar region of the bilayer below the transition temperature (Table I); however, at temperatures above 40°C, peptide binding resulted in an increase in fluorescence intensity of ANS, and therefore changes of polarization above this temperature cannot be easily interpreted and were not reported. Taken together, results with DPPC/SA vesicles indicate that MAP₄VP3 binds to the vesicles and decreases the lateral mobility of the phospholipid molecules throughout the membrane. Finally, as shown in Figure 9, binding to anionic

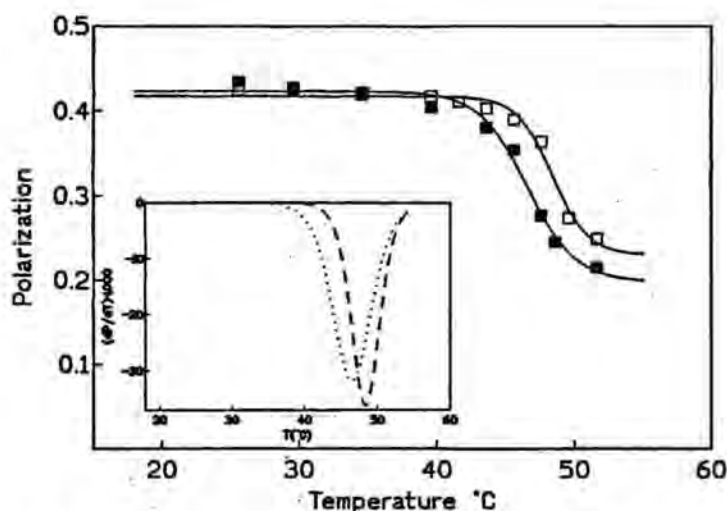


FIGURE 8 Polarization changes vs temperature of DPH-labeled DPPC/SA (9.5:0.5) vesicles in the absence (■) or presence (□) of MAP₄VP3. Inset: first-derivative analysis of the melting profiles expressed in arbitrary units; no peptide (dotted line), + MAP₄VP3 (dashed line). Other conditions as in Figure 7.

DPPC/PI vesicles also results in increased lipid order both in the hydrophobic and hydrophilic parts of the membrane, and an increase of 5°C in the T_c .

Summary

MAP₄VP3 is an immunogenic peptide construct of four units of the continuous epitope 110–121 from the exposed capsid protein VP3 of HAV⁹ that has an amphipathic character and anionic net charge at physiological pH. Results reported in this paper show that MAP₄VP3 binds to lipid vesicles of different compositions and net charge: zwitterionic, anionic, and cationic. Thus, binding must have an important hydrophobic component. However, although the stoichiometry of binding is approximately the same (14–16 lipid molecules per peptide) for all three types of vesicles, independent of the charge, the bound forms have different activity. For example, the form of MAP₄VP3 bound to DPPC vesicles increases the packing of the membrane phospholipids without perturbing the permeability of the vesicles or inducing vesicle fusion or solubilization. On the other hand, MAP₄VP3 bound to cationic vesicles of DPPC/SA (9.5:0.5) shows membrane destabilizing properties, and it induces an increase in membrane permeability, a time-dependent lipid mixing, and a significant leakage of aqueous contents from the vesicles; taken together, these results show that the peptide induces leaky fusion of the cationic membranes at neutral pH. This indicates that the MAP₄VP3–lipid interaction

must have an electrostatic component, as supported by the observed higher degree of penetration of this construct in cationic lipid monolayers spread at the air/water interface.²⁸ The destabilization of the cationic vesicles occurs without losing the bilayer structure, as indicated by the increase in membrane order and transition temperature together with the high cooperativity of the phase transition, even at high peptide concentrations in the membrane. The amphipathic character of MAP₄VP3 must favor its incorporation in the hydrophobic core of the lipid membranes and facilitate dynamic processes involved in the immune response, as it has been described for other immunogenic peptides and peptide constructs.^{29,30} Finally, binding of MAP₄VP3 to anionic vesicles of DPPC/PI (9:1) induces leakage of aqueous contents, but without lipid mixing. Since the cooperativity of the phase transition of the anionic vesicles is maintained and even accentuated in the presence of the peptide, and the transition temperature increases by 5°C, the possibility of vesicle solubilization and micelle formation can be ruled out. Therefore, MAP₄VP3 must induce the observed permeabilization maintaining the bilayer structure, as also described for the interaction of melittin with zwitterionic lipid vesicles.³¹

The results reported on the interaction of MAP₄VP3 with lipid vesicles of different compositions and net charge can be very useful in the preparation of a vesicle-based synthetic vaccine, since factors such as the vesicle size, lipid/peptide ratio, transition temperature of the lipid, and lipid charge play a

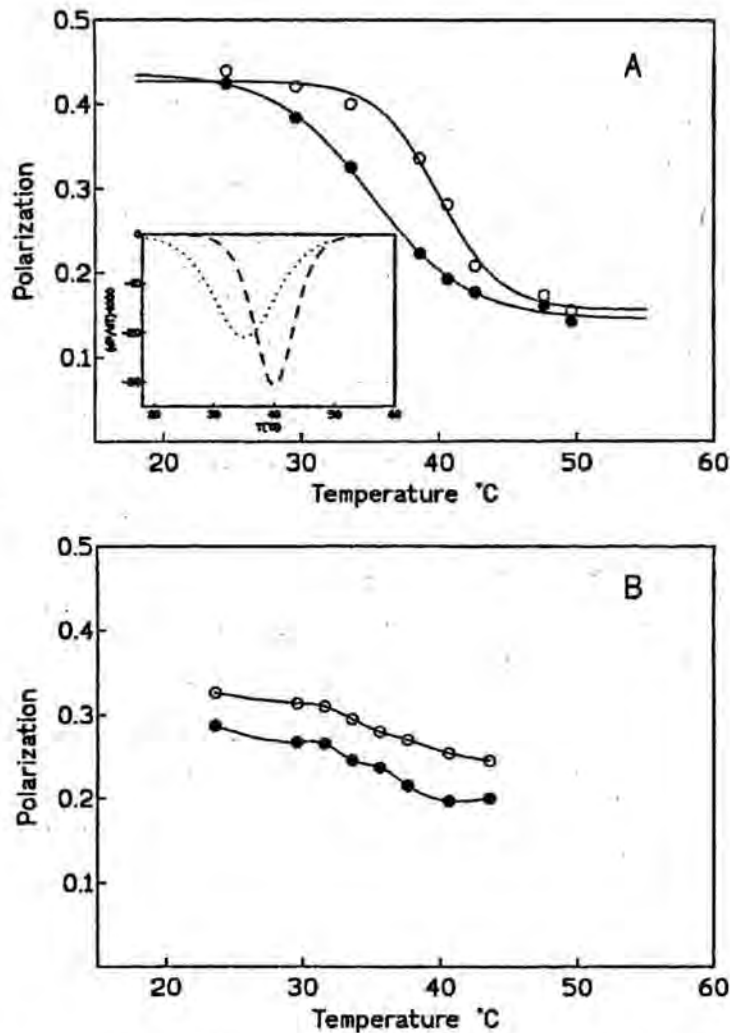


FIGURE 9 (A) Polarization changes vs temperature of DPH-labeled DPPC/PI (9:1) vesicles in the absence (●) or presence (○) of MAP₄VP3. Inset: first-derivative analysis of the melting profiles expressed in arbitrary units; no peptide (dotted line), + MAP₄VP3 (dashed line). (B) Changes in polarization of ANS-labeled vesicles in the absence (●) or presence (○) of MAP₄VP3. Other conditions as in Figure 7.

crucial role on the intensity of the immune response.^{32,33} Vesicles incorporating MAP₄VP3 can increase the immunogenic response both by increasing circulation time of the peptide in blood and protecting it from degradation by lytic enzymes³⁴ and by favoring delivery of the immunopeptide to target cells of the immune system. For example, cationic vesicles are known to fuse with the cell membranes, thus facilitating delivery of the associated peptides to their target cells.^{12,13,15}

This work was supported by grants BIO 95-0061-CO3-02 and BIO 95-0061-CO3-03 from CICYT, Spain. YC was

supported by a Contract from the Ministerio de Educación y Cultura (Spain).

REFERENCES

1. Hadler, S. C. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*; Hollinger, F. B., Lemon, S. M., Margolis, H. S., Eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1991; pp 14-20.
2. Lemon, S. M.; Shapiro, C. N. *Infect Agents Dis* 1994, 3, 38-49.
3. Briand, J. P.; Barin, C.; van Regenmortel, M. H. V.; et al. *J Immunol Methods* 1992, 156, 255-265.

4. Francis, M. J.; Hastings, G. Z.; Brown, F.; McDermed, J.; Lu, Y. A.; Tam, J. P. *Immunology* 1991, 73, 249-254.
5. Nardin, E. H.; Olivera, G. A.; Calvo-Calle, J. M.; Nussenzweig, R. S. *Adv Immunol* 1995, 60, 105-149.
6. Tam, J. P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85, 5409-5413.
7. Tam, J. P.; Lu, Y. A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86, 9084-9088.
8. Tam, J. P.; Clavijo, P.; Lu, Y. A.; Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.; Zavala, F. *J Exp Med* 1990, 171, 299-306.
9. Bosch, A.; Gonzalez-Dankaart, J. F.; Haro, I.; Gajardo, R.; Pérez, J. A.; Pintó, R. M. *J Med Virol* 1998, 54, 95-102.
10. Cohen, S.; Bernstein, H.; Hewes, C.; Chow, M.; Langer, R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88, 10440-10444.
11. Moore, M.; Carbone, F. R.; Bevan, M. J. *Cell* 1988, 54, 777-785.
12. Farhood, H.; Seryina, N.; Huang, L. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1235, 289-295.
13. Hui, S. W.; Langner, M.; Zhao, Y. L.; Ross, P.; Hurley, E.; Chan, K. *Biophys J* 1996, 71, 590-599.
14. Alving, C. *J Immunol Methods* 1991, 140, 1-13.
15. Li, L. H.; Hui, S. W. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1323, 105-116.
16. Perez, J. A.; Gonzalez-Dankaart, J. F.; Reig, F.; Pinto, R. M.; Bosch, A.; Haro, I. *Biomed Peptid Protein Nucleic* 1995, 1, 93-100.
17. Barlett, G. R. *J Biol Chem* 1959, 234, 466-468.
18. Cajal, Y.; Rabanal, F.; Alsina, M. A.; Reig, F. *Biopolymers* 1995, 38, 607-618.
19. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz J. R., Ed.; Plenum Press: New York, 1983, Chap. 2.
20. London, E. *Anal Biochem* 1986, 154, 57-63.
21. De Kroom, A. I.; Soekarjo, M. W.; De Gier, J.; Oekruisff, B. *Biochemistry* 1990, 29, 8229-8240.
22. McIntyre, J. C.; Sleight, R. G. *Biochemistry* 1991, 30, 11819-11827.
23. Cajal, Y.; Boggs, J. M.; Jain, M. K. *Biochemistry* 1997, 36, 2566-2576.
24. Bailey, A. L.; Monck, M. A.; Cullis, P. R. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1324, 232-244.
25. Hoekstra, D.; Martin, O. C. *Biochemistry* 1982, 21, 6097-6103.
26. Bailey, A. L.; Monck, M. A.; Cullis, P. R. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1324, 232-244.
27. Davenport, L.; Dale, R. E.; Bisby, R. H.; Cundall, R. B. *Biochemistry* 1985, 24, 4097-4108.
28. Alsina, A.; Perez, J. A.; Garcia, M.; Reig, F.; Haro, I. *Supramol Sci* 1997, 4, 195-199.
29. Mecheri, S.; Danneker, G.; Dennig, D.; Hoffman, M. K. *J Immunol* 1990, 144, 1369-1374.
30. Cajal, Y.; Alsina, M. A.; Reig, R.; Rodriguez, L.; Mestres, C.; Haro, I. *J Colloid Interface Sci* 1998, 198, 78-86.
31. Benachir, T.; Lafleur, M. *Biochim Biophys Acta* 1995, 1235, 452-460.
32. Davis, D.; Gregoriadis, G. *Immunology* 1989, 68, 277-282.
33. Gregoriadis, G. *Immunol Today* 1990, 11, 89-97.
34. Frisch, B.; Muller, S.; Btriand, J. P.; van Regenmortel, M. H. V.; Schuber, F. *Eur J Immunol* 1991, 21, 185-193.

A view of three different lipid monolayers by atomic force microscopy

A. Ortiz, M.A. Alsina and Y. Cajal

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

ABSTRACT: Lipid monolayers prepared by the Langmuir technique are commonly used as model biomembranes. They have been extensively studied for years with a wide range of techniques, and during the last decade atomic force microscopy (AFM) [1] has emerged as a powerful tool for imaging the structure of the supported lipid films. AFM offers the view at nanometric scale of the transferred monolayers which provides information on the topographical organization of the films [2-4]. In the present work we have studied the morphology of three lipid monolayers: zwitterionic DPPC, anionic DPPC:PI (9:1, mol:mol) and cationic DPPC:SA. (9:1, mol:mol). The structure of these three mixed monolayers transferred on mica is determined by AFM, and compared with the phase properties of the films at the air-water interface.

1. EXPERIMENTAL SECTION

1.1 Chemicals

The phospholipids used in the study were 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), phosphatidylinositol from soy bean (PI), and the fatty acid stearylamine (SA) from Sigma Chemical Co. The purity was checked by thin-layer chromatography. Chloroform (HPLC grade from Fisher Scientific Co.) was used as the spreading solvent for all lipids. Water was double distilled and deionized (Mili-Q system, Millipore Corp.). Lipids were spread on water subphase at 25 °C.

1.2 Methods

1.2.1 Compression Isotherms

The compression isotherms were performed on a Langmuir film balance KSV5000 equipped with a Wilhelmy platinum plate. The PTFE (surface area 17000 mm², volume 1000 cm³) and the plate were thoroughly cleaned before each run with hot water and Cl₃CH:CH₃OH (2:1 v/v), to avoid carry over of lipid. Lipid mixtures for spreading were prepared by premixing appropriate amounts of the components from stock solutions, so that the final concentration was 1.36 mM. Monolayers were formed by adding small drops of the solutions on the water subphase, with a microsyringe (Hamilton Co., Reno, NV). After 10 minutes, the monolayers were compressed (symmetrical compression) with an area reduction rate of 60 mm²/min, up to their collapse pressure. The temperature of the subphase was 25±1 °C. Each run was repeated three times, and reproducibility was ± 0.05 nm²/molecule.

1.2.2 Langmuir - Blodgett Film. Atomic Force Microscopy

In order to investigate the morphology of the LB films with different composition, films at 15 mN/m surface pressure were transferred onto mica (Hydrophilic substrate). The preparation of the Langmuir - Blodgett film was performed using a KSV5000 balance. The subphase was high purity water (MiliQ,

electrical resistivity $> 18 \text{ M}\Omega\text{cm}$, at pH 6.8) with a temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Phospholipid solution was spread, drop by drop. The compression barrier speed was $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ and dipping speed was $0.1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ for all experiments. The transfer ratios were $T.R. \cong 1$ for all experiments.

The technique consists on scanning the sample surface with a sharp probing tip, fixed at the end of a cantilever, and, using an optical method, to measure the deflection of the cantilever due to the forces between it and the sample surface during the scan. The displacement in three dimensions is provided by a high sensitive piezoelectric scanner. We used the tapping mode (TM-AFM), where the tip is forced to oscillate in the z direction above the sample and touches its surface periodically. The Atomic Force Microscope (AFM) used was a Nanoscope III Extended Multimode from Digital Instruments and the tips (Point Probes, Nanosensors, Wetzlar-Blankenfeld, Germany) were in silicon monocristaline with a spring constant of $38\text{-}74 \text{ N/m}$ and a resonance frequency between $270\text{-}377 \text{ kHz}$. Mica substrate used was ASTM-V2 Green mica (Asheville-Schoonmaker Mica Co, Virginia, USA). Images at high resolution were taken on the low edge of the sample.

2. RESULTS

2.1 Compressibility studies

The compression isotherms of different lipid mixtures of two components selected from a previous experiments, DPPC, DPPC-PI (9:1), DPPC-SA (9:1), were obtained, and the plots of surface pressure (π) vs mean molecular area at 25°C are shown in figure 1A. The three monolayers have a different behaviour, but they show the presence of liquid expanded and liquid condensed phases as the film is compressed except for the anionic monolayer. This one is in a more expanded state. The cationic monolayer presents the lowest area per molecule trough most of the surface pressure range. The compressibility modulus as a function of the molecular area of the mixed films are represented in the figure 1B. The compressibility modulus is defined as

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

Its value can be used to characterise the phase behaviour of a monolayer, according to Davies and Rideal [5], where for liquid expanded state (LE) values range between 12.5 and 50 mN/m , and for liquid condensed (LC) phase compressibility modulus is $100 < C_s^{-1} > 250$.

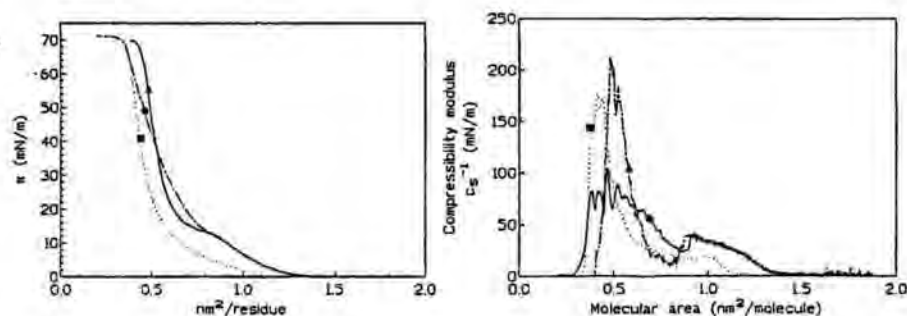


Figure 1. Isotherms of surface pressure versus mean molecular area for monolayers of DPPC (\blacktriangle) DPPC/PI (\bullet) and DPPC/SA (\blacksquare) on Subphase of water at 25°C . Compressibility modulus versus mean molecular area for the same monolayers.

The cationic monolayer is in a liquid-condensed phase at molecular areas below $0.49 \text{ nm}^2/\text{molecule}$, above this value and up to $0.55 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ is in a liquid intermediate phase, and for bigger areas the

monolayer adopts liquid-expanded state. In the case of the DPPC monolayer, C_s^{-1} , indicates the presence of a liquid-condensed phase at areas below $0.58 \text{ nm}^2/\text{molecule}$, a liquid-intermediate phase between 0.58 and $0.63 \text{ nm}^2/\text{molecule}$, and liquid-expanded phase at molecular areas above $0.63 \text{ nm}^2/\text{molecule}$. Finally, the anionic monolayer, C_s^{-1} values show a liquid-expanded phase above $0.7 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ and a liquid-intermediate state at smaller areas, without passing through a liquid-condensed phase before the collapse. These values are interesting for description of the monolayer behaviour, to check the miscibility of the components in the monolayer at air-water interface and to help on the comprehension of the topographic images taken by AFM tapping mode.

2.2 AFM results

The three monolayers, DPPC-PI (9:1), DPPC, DPPC-SA (9:1), at deposition pressure of 15 mN/m and 25°C , occupy 0.795 , 0.664 and $0.554 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ respectively. Their C_s^{-1} are between 50 mN/m and 100 mN/m , indicating that the three monolayers are in a liquid intermediate (LI) state and the molecules are not in a fully extended length.

Figure 2A is a zoom area of a typical AFM image of a fresh DPPC film (measured within 2 h. after deposition) transferred in the beginning of LC phase. Three features are seen here: 1-The LC domains, namely macrodomains; there are three typical shapes globular, lobular and ovoid for the big, intermediate and the small LC domain respectively. Outside LC domains, numerous microdomains like grains and clusters of grains are observed. 2- the macrodomain boundaries are not smooth but exhibit irregular structures. 3- Holes like defects are observed within the macrodomains, particularly for the globular at the edge region. The height of the macrodomain is $0.984 \pm 0.05 \text{ nm}$, the width of the intermediate and small macrodomains are $314.4 \pm 27.3 \text{ nm}$ and $168.7 \pm 59.3 \text{ nm}$, respectively, while the diameter for holes is $48.83 \pm 5.86 \text{ nm}$. In the DPPC AFM image, LE and LC phase coexist. This observation is in agreement with other reported previously, where LE and LC phase were observed at least to the onset of collapse [6]. The LC domains are not present at air/water interface, but they are probably induced in the transferred film by the thinning of the water layer between the lipid and the mica surface [7-8].

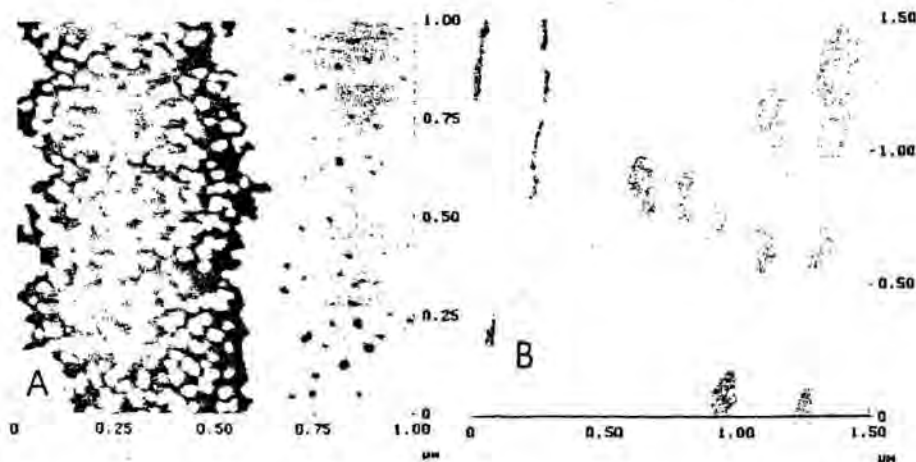


Figure 2. AFM tapping mode images of (A) DPPC and (B) DPPC/SA (9:1) monolayers deposited at 15 mN/m on mica by Langmuir-Blodgett deposition. Length scales for DPPC and DPPC/SA (9:1) are as follows: (A) $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$; (B) $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$.

DPPC-SA (9:1) monolayer observed by AFM (figure 2B) shows a homogenous and practically complete matrix with some irregular discontinuities and different circular holes within the film. The height of this

matrix is 0.671 ± 0.03 nm and the diameter of the big holes is 156.2 ± 37.1 nm, and for small ones is 75.8 ± 15.2 nm. Almost all lipids are presented in a continuous LC domain, as stearylamine is a saturated large fatty acid that at the pH of the experiments is positively charged, probably is more attached to the mica surface and better compacted with the DPPC molecules due to the cohesive Van der Waals forces that link the chains up.

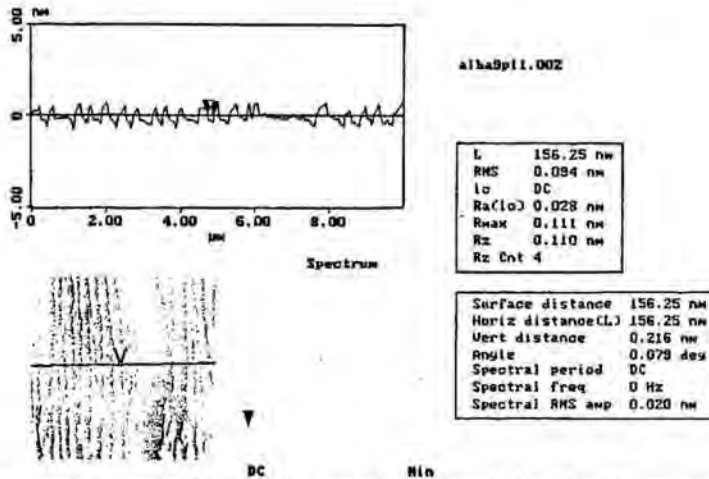


Figure 3. AFM tapping mode images of DPPC/PI (9:1) monolayers deposited at 15 mN/m on mica by Langmuir-Blodgett deposition. Length scales DPPC/PI (9:1) is $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$.

DPPC-PI monomolecular film seemed soft under AFM tip and it is always difficult to get a stable image [9], due to its negative charge. That is the reason we take images of this monolayer 100 times diluted. An inhomogeneous monolayer is observed with long longitudinal islands where the amplitude is 286 ± 45.6 nm and the periodicity is 116.02 ± 9.76 nm. The height of these long macrodomains is 1.093 ± 0.11 nm and inside of them there are a few elongated holes. In the anionic monolayer, the ripples or elongated macrodomains present on the mica substrate are formed by phosphatidylinositol, and are due in part to the hydrogen bonds between the polar head and the water. In addition, lower cohesion stability is expected in mixed DPPC-PI monolayers, due to reduced Van der Waals interaction between the saturated (DPPC) and unsaturated (PI) acyl chains [10]. These unsaturations present in the lipid matrix give an expansion of the LC macrodomain.

References

- [1] Binning, G.; Quate, C.F.; Gerber, Ch. *Phys. Rev. Lett.* **56**, (1986) 930 - 933
- [2] Schwartz, D.K.; Garnaes, J.; Viswanathan, R.; Zasadzinski, J.A.N. *Science* **257**, (1992) 508-511
- [3] Chi, L.F.; Fuch, H.; Jonhston, R.R.; Ringsdorf, H. *Thin solid film* **242**, (1994) 151
- [4] Sikes, D.H.; Woodward, J.T.; Schwartz, D.K. *J. Phys. Chem.* **100**, (1996) 9093-9097
- [5] Davies, J.T.; Rideal, E. K.; *Interfacial Phenomena*, 2nd ed.; Academic Press: New York and London 1963; pp. 265.
- [6] Crane, J.; Putz, G.; Stephane, B.H. *J. Biophys.* **77**, (1999) 3134-3143
- [7] Hollars, C.W.; Dunn, R.C.; *J. Biophys.* **75**(1), (1998) 342
- [8] Fang, J.; Knobler, C.M.; *J. Phys. Chem.* **99**, (1995) 10425
- [9] Hilde, A.R.; Demel, A.R.; Van der Eerden, J.P.J.M.; de Kruijff, Ben. *J. Biophys.* **77**(3), (1999) 1638-1693
- [10] DeWolf, C.; Leporatti, S.; Kirsch, C.; Klinger, R.; Brezesinski, G. *Chem. and Phys. of Lipids* **97**, (1999) 129-138