

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA

SBI-IFUSP



305M810T2908

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS MELANOTRÓPICOS COM MEMBRANAS LIPÍDICAS

UM ESTUDO POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA E DICROÍSMO CIRCULAR

Márcia Helena Biaggi

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund

Prof. Sílvio Roberto Carriuto
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

São Paulo
1998



538.364
B 576 i
D
ex 2

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Biaggi, Márcia Helena

Interação de Peptídeos Melanotrópicos com Membranas Lipídicas - Um Estudo por Ressonância Paramagnética Eletrônica e Dicroísmo Circular. São Paulo, 1998.

Tese (Doutoramento) - Universidade de São Paulo.
Instituto de Física - Departamento de Física Geral.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund
Área de Concentração: Biofísica

Unitermos: 1. Interação Peptídeo-Lipídio;
2. Melanotropinas; 3. Spin Label;
4. Dicroísmo Circular.

USP/IF/SBI-073/98

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS MELANOTRÓPICOS COM MEMBRANAS LIPÍDICAS

UM ESTUDO POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA E DICROÍSMO CIRCULAR

Márcia Helena Biaggi
Tese de doutoramento



Profa. Dra. Maria Teresa Lamy Freund
Orientadora

(Handwritten signature of Prof. Dr. Maria Teresa Lamy Freund)

Prof. Dr. Walter Maigon Pontuschka
Instituto de Física - USP - SP

Profa. Dra. Lia Queiroz do Amaral
Instituto de Física - USP - SP

São Paulo
1998

Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento
Instituto de Física - USP - São Carlos

Profa. Dra. Sônia Renaux Wanderley Louro
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

“Ao meu filho João Pedro, a quem devo muita felicidade”

AGRADECIMENTOS

À Maria Teresa, pela oportunidade de convívio e acima de tudo por ter me ensinado tanto.

À Dra. Shirley Schreier e ao Dr. Otaciro R. Nascimento por terem colocado cada um seu laboratório , seus conhecimentos e sobretudo sua paciência à inteira disposição.

Ao Dr. Amando, pelo incentivo e confiança.

À Dra. Carla pelo grande apoio e importantes discussões.

À Aninha que é destas pessoas únicas, pela presença e apoio nos momentos mais importantes da vida científica e pessoal.

À Tânia, que ensinou mais do que ela pode imaginar.

Ao Pedro Pascutti, “Pegepa” por nossas tantas discussões sobre o α-MSH, pela grande amizade, desde Londrina....UEL.

Às professoras, Dra. Cecil e Dra. Maria Regina, pelas lições de ciência e colaboração em momentos importantes.

Ao pessoal do grupo de Biofísica e Física Médica, atual: Ana Maria, Jonatan, Karin, Rozane, Pedro, Marcos, Roberto, Eduardo, Marcelo, Paulo, Roberto Fernandes e Amaury pela amizade. E ao da velha guarda: Paulo Costa, Carlos, Ernane, Zélia, André, João Chaves, Yara e Marta Cassiano pela convivência e participação na construção de um dia a dia feliz .

À Lua, Thelma, Eneida, Lúcia, Mercedes, Roberto, Fábio, Goretti, Berê, e a todo pessoal do laboratório da Dra. Shirley, pelos seminários do meio dia, que me foram tão preciosos, por terem me proporcionado um ambiente de trabalho agradável e pelas festas de Natal.

Ao Ernesto por fazer parte de uma das melhores fases da vida. Pelas lições de companheirismo e pelo amor incondicional.

À Dona Djanira, que cuidou com tanto carinho do João Pedro.

À minha mãe Helena e à minha irmã Cirlena , que me ensinaram a seguir sempre em frente ...com seus exemplos....obrigada

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

Sumário

| | |
|--|-----|
| Abreviações | iii |
| Resumo | v |
| <i>Abstract</i> | vi |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 Peptídeos melanotrópicos | 11 |
| 2 Técnicas - aspectos teóricos | 15 |
| 2.1 RPE - O Método de Marcador de Spin | 15 |
| 2.1.1 Fundamentos Básicos de RPE | 18 |
| 2.1.2 Espectro de RPE de Radicais Nitróxidos | 24 |
| 2.1.2.1 - Parâmetro de Ordem - S | 29 |
| 2.1.2.2 Os espectros de RPE de radicais Nitróxidos variam com a mobilidade - Tempo de Correlação Rotacional - τ | 37 |
| 2.1.2.3 Os espectros de RPE de radicais nitróxidos são sensíveis a polaridade do meio - Hidrofobicidade | 43 |
| 2.2 Dicroímo Circular - Atividade Óptica | 44 |
| 2.2.1 Princípios Físicos do CD | 48 |
| 2.2.2 CD Aplicado ao Estudo de Proteínas e Polipeptídeos | 50 |
| 3 Materiais e Métodos | 56 |
| 3.1 Materiais | 56 |
| 3.2 Métodos | 57 |
| 3.2.1 Preparação de amostras para medidas de RPE | 57 |
| 3.2.2 Preparação de amostras para CD | 57 |
| 3.2.3 Medidas de ressonância paramagnética eletrônica | 58 |
| 3.2.3.1 Determinação do coeficiente de partição, K _p , dos peptídeos entre membrana de DMPG e água, por RPE | 59 |
| 3.2.4 Medidas de dicroísmo circular | 61 |

| | |
|---|-----|
| 4 Resultados e Discussões | 63 |
| 4.1 Medidas com RPE | 64 |
| 4.1.1 Efeito dos peptídeos sobre a fluidez da bicamada, observados por marcadores fosfolipídicos e derivados de ácido esteárico | 64 |
| Comparação entre os marcadores 5-PCSL e 5-SASL | 68 |
| Modificações na fluidez da membrana observadas em diferentes profundidades da cadeia hidrocarbonada | 70 |
| α -MSH e MSH-I provavelmente se localizam em profundidades diferentes na bicamada | 74 |
| 4.1.2 Efeitos dos peptídeos sobre a fluidez e temperatura de transição de fase da bicamada, observados pelo marcador de spin derivado de esterol, CSL | 79 |
| 4.1.3 A região da cabeça polar da bicamada de DMPG é modificada pela presença dos peptídeos | 82 |
| 4.1.4 A interação peptídeo-lipídio depende da força iônica do meio | 88 |
| 4.1.5 O efeito do MSH-I sobre o “empacotamento” das bicamadas é maior do que de uma alta força iônica | 90 |
| 4.1.6 Os peptídeos modificam a polaridade da bicamada | 92 |
| 4.1.7 Efeitos de diferentes concentrações de peptídeos melanotrópicos na bicamada lipídica | 94 |
| Coeficiente de partição, Kp, dos peptídeos em membrana de DMPG | 95 |
| 4.2 Dicroísmo Circular | 101 |
| 5 Conclusões | 105 |
| 6 Referências Bibliográficas | 107 |
| 7 Apêndice | 119 |
| Referência A | |
| Referência B | |
| Referência C | |
| Referência D | |

Abreviações

| | |
|------------------|---|
| A _{máx} | desdobramento hiperfino máximo (externo) |
| A _{mín} | desdobramento hiperfino mínimo (interno) |
| α_o | desdobramento hiperfino isotrópico |
| Arg | aminoácido - Arginina |
| C-5; C-7; C-9 | carbono 5; 7; 9 da cadeia acila |
| CD | Dicroísmo Circular |
| CSL | 3-doxil colestanó |
| DPhe | aminoácido dextrogiro - D-Phenilalanina |
| DMPC | 1,2- dimiristoil fosfatidil colina |
| DMPG | 1,2-dimiristoil fosfatidil glicerol |
| Doxil | 2,2-dimetil-m-oxil oxazolidina |
| [ϕ] | rotação molar |
| G | gauss |
| Glu | aminoácido ácido Glutâmico |
| HEPES | tampão: 4-[2-hidroxietil]-1-ácido piperizine-etano sulfônico |
| His | aminoácido - Histidina |
| h _o | intensidade do pico de campo central em espectros de RPE |
| h ₊₁ | intensidade do pico de campo baixo em espectros de RPE |
| K _p | coeficiente de partição |
| LMV | vesículas multilamelares grandes |
| LUV | vesículas unilamelares grandes |
| Lys | aminoácido - Lisina |
| Met | aminoácido - Metionina |
| m _I | número quântico principal |

| | |
|---------------------|--|
| α -MSH | hormônio estimulante do melanócito |
| MSH-I | [Nle ⁴ , Dphe ⁷]- α -MSH |
| NaCl | cloreto de sódio |
| N-Leu | aminoácido - Norleucina |
| 5-, 12-PCSL | 1-palmitoil-2-[5- ou 12- doxil estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina] |
| PG | fosfatidil glicerol |
| Phe | aminoácido - Fenilalanina |
| Pro | aminoácido - Prolina |
| [θ] | elipticidade molar |
| RPE | Ressonância Paramagnética Eletrônica |
| S | Parâmetro de ordem |
| Ser | aminoácido - Serina |
| S_{ef} | Parâmetro de ordem efetivo |
| 5-, 7-, 9-, 12-SASL | ácido 5-, 7-, 9-, 12-doxil estearato |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SSL | N-2',2',6',6' - tetrametilpiperidina-1' - oxil-estearamida |
| SUV | vesículas unilamelares pequenas |
| T | temperatura |
| T_c | temperatura de transição de fase: gel- líquido cristal |
| Tyr | aminoácido - Tirosina |
| Trp | aminoácido - Triptofano |
| $\tau_{//}$ | tempo de correlação rotacional ao redor do eixo de simetria da molécula |
| τ_{\perp} | tempo de correlação rotacional perpendicular ao eixo de simetria da molécula |
| TFE | 2,2,2-trifluoroetanol |
| Val | aminoácido - Valina |

Resumo

Na maioria dos vertebrados o tridecapeptídeo α -MSH (hormônio estimulante do melanócito) é um hormônio fisiologicamente relevante na regulação da pigmentação da pele, causando escurecimento (Sawyer, *et al.*, 1980; Jiang *et al.*, 1995). O α -MSH também está envolvido em muitas outras funções, como crescimento fetal e comportamento (Castrucci, *et al.*, 1990). No presente trabalho foi estudada a interação entre peptídeos melanotrópicos e membranas lipídicas sob as perspectivas da perturbação da fase lipídica e das modificações conformacionais dos peptídeos. Foram usados: dois tipos de vesículas (aniônica de DMPG -dimiristoil fosfatidil glicerol - e neutra de DMPC - dimiristoil fosfatidil colina-) e dois peptídeos melanotrópicos (α -MSH e o análogo que apresenta maior atividade biológica, [Nle^4 , D-Phe⁷]- α -MSH (MSH-I)). Por meio de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram observadas alterações estruturais dos lipídios causadas pela interação dos peptídeos com a membrana aniónica. Todos os marcadores de spin usados, derivados do ácido esteárico, fosfolipídicos e derivado do colesterol, incorporados em vesículas de DMPG, na fase líquido-cristal, indicaram que os dois peptídeos induzem um decréscimo no movimento e/ou aumento da ordem das cadeias acilas, em todas as posições monitoradas. O efeito do análogo sobre os parâmetros dos espectros de RPE dos marcadores de spin foi mais evidente, e isto estaria indicando que penetra mais fundo na matriz lipídica. A dependência com o sal da interação peptídeo-lipídio demonstra que a atração eletrostática dos peptídeos carregados positivamente com a cabeças polares dos lipídios aniónicos foi necessária para uma efetiva associação dos peptídeos com a bicamada fosfolipídica. A necessidade da interação eletrostática também foi observada pela não interação dos peptídeos com bicamadas neutras de DMPC. No desenvolvimento do trabalho foi calculado o coeficiente de partição baseado no efeito que estes peptídeos causam no espectro de RPE dos marcadores de spin intercalados na membrana. O coeficiente de partição obtido para peptídeo análogo, mais potente biologicamente, foi cerca de quatro vezes maior do que para o hormônio nativo. Para uma mesma concentração de peptídeo ligado à membrana, foi observado que o efeito do MSH-I sobre a estrutura da membrana é um pouco maior do que do α -MSH, o que estaria de acordo com uma possível penetração mais fundo na bicamada. Os espectros de dicroísmo circular (CD) em solução aquosa e no solvente indutor de α -hélice, o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) mostram que os dois peptídeos têm estruturas um pouco diferentes em solução, embora apresentem mudanças conformacionais similares quando na presença de vesículas ou micelas carregadas negativamente. O maior efeito causado pelo análogo mais potente na estrutura da bicamada, quando comparado ao hormônio nativo, é discutido em termos de sua maior constante de associação e possibilidade de maior penetração na bicamada. Estes resultados estariam relacionados com a maior atividade e/ou prolongada ação do peptídeo análogo.

Abstract

In most vertebrates the tridecapeptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is physiologically relevant hormone regulating skin pigmentation, causing darkening (Sawyer, *et al.*, 1980; Jiang *et al.*, 1995). α -MSH is also involved in many other biological functions, such as fetal growth and behaviour (Castrucci, *et al.*, 1990). The present work studies the interaction of α -MSH and the biologically more active analog [$\text{Nle}^4, \text{Dphe}^7$]- α -MSH with lipid vesicles by spin label electron spin resonance (ESR) spectroscopy and circular dichroism (CD). All spin labels used here, stearic acid, phospholipid and cholestane derivative labels, incorporated into anionic vesicles of DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) in the liquid-crystalline phase, indicated that both peptides decrease the motional freedom of the acyl chains, at all monitored positions. The effect of the analog on the spin label ESR parameters was much more evident, and could indicate its farthest penetration into the lipid matrix. The salt dependence of the peptide - lipid interaction demonstrated that the electrostatic attraction of the positively charged residues of the peptides by the PG headgroups was necessary for an effective association of the peptides with phospholipid bilayers. The perturbation caused by the peptides on the lipid chain mobility was reduced as the ionic strength increased. Above 300 mM NaCl no perturbation could be detected. The electrostatic requirement was further evidenced by the absence of detectable binding of peptides to neutral lipid bilayers. Lipid partition coefficients were calculated based on the effect the peptides cause on the ESR spectra of spin labels incorporated in the membrane. For the biologically more potent peptide, the partition coefficient was found to be about 4-times greater than that of the native hormone. For the same concentration of peptide bound to the membrane, MSH-I was found to cause a slightly greater effect on the membrane structure than α -MSH, in accord with its possible deeper penetration into the bilayer. CD spectra in aqueous solution and in the α -helix inducing solvent 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) showed that the two peptides have somewhat different structures in solution, though similar conformational changes occur in both peptides as a result of their interaction with negatively charged vesicles or micelles. The stronger effect caused by the more potent analog in the membrane structure, when compared to the native hormone, is discussed in terms of the higher peptide-lipid association constant and the possible deeper penetration into lipid bilayers. The results could be related to its greater activity and/or prolonged action of the peptide analog.

1. Introdução

Desde que Singer e Nicolson (1972) propuseram, neste célebre artigo de revisão, o modelo do mosaico fluido (Figura 1.1) para explicar a estrutura das membranas biológicas e oportunamente chamaram a atenção sobre a importância das propriedades físicas das membranas na regulação de suas atividades fisiológicas, o interesse em estudar os mecanismos e as forças que governam a interação de proteínas, hormônios peptídicos e outras moléculas com interfaces tem sido intenso na literatura.

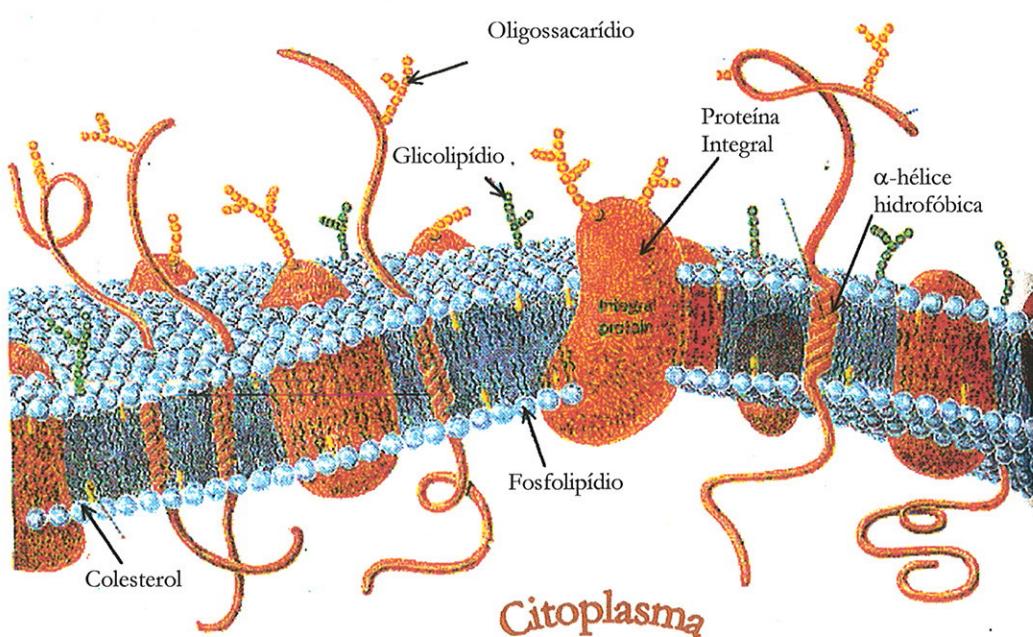


Figura 1.1 Esquema de um fragmento de membrana plasmática - Mosaico Fluido (adaptada de Voet e Voet, 1995)

As membranas participam de atividades essenciais da célula. Sob a óptica das proteínas apresentam pelo menos cinco aspectos interessantes: representam a porta de entrada para os compartimentos subcelulares especializados ou para o espaço extracelular, isto é, sinalização transmembranar; oferecem proteção contra um ambiente adverso; podem ser locais ideais para as proteínas que não são solúveis em água exercerem suas funções; e permitem que ocorram reações metabólicas bem como reconhecimento celular em sua superfície.

Quando se estuda as interações de proteínas ou peptídeos com interfaces, algumas questões importantes devem ficar patentes:

- a) Quais as forças (ex. efeito hidrofóbico, interação eletrostática) que estão participando da interação peptídeo-lipídio?
- b) Como a natureza da cabeça polar dos lipídios bem como a estrutura das caudas hidrofóbicas podem afetar estas interações ?
- c) Que influência tem sobre estas interações a temperatura, a força iônica e o pH do meio ?
- d) Qual a localização dos peptídeos ou proteínas, e como eles se particionam na bicamada lipídica?
- e) Ocorrem modificações estruturais das proteínas ou peptídeos (e outros tipos de moléculas) quando interagem com uma bicamada lipídica ?
- f) Qual a importância da fase lipídica para a interação das proteínas ou peptídeos com o receptor de membrana ?

Neste trabalho foi nossa preocupação estudar assuntos relacionados com as cinco primeiras questões, sendo que muitos autores vêm dedicando um

grande esforço para tentar responder a última pergunta (Sargent & Schwwyzer, 1986; Backlund *et al.*, 1994; Dreger *et al.*, 1997).

Uma das formas de estudar a interação de proteínas ou outras moléculas com membranas, e poder conhecer um pouco mais sobre as funções das membranas, é a utilização de membranas modelos.

Estes modelos são muitas vezes compostos de lipídios sintéticos como também podem ser produzidos a partir de lipídios extraídos de sistemas biológicos, por exemplo, a extração dos lipídios das células vermelhas que apresentam a simplicidade de não possuírem outras estruturas membranosas além da membrana plasmática (Bitbol e Devaux, 1988; Freisleben *et al.*, 1992). Reprodução, conservação de uma barreira com certa permeabilidade, possibilidade de inserir um centro funcional e assim reproduzir alguns fenômenos biológicos, de uma maneira simplificada e controlável (Geldwerth *et al.*, 1991), são as grandes vantagens de se usar membranas modelos.

A natureza anfifílica dos lipídios (Figura 1.2) é considerada a grande responsável pela agregação espontânea das moléculas em estruturas organizadas. Diferentes formas de agregação resultam da otimização do efeito hidrofóbico com uma variedade de interações intra- e inter-moleculares (Batemburg & de Kruijff, 1988), tudo isto em combinação com as dimensões físicas dos componentes da membrana.

Considerando a energia livre de interação, geometria molecular e entropia, foi proposta por Israelachvili *et al.*, (1976, 1980) e Israelachvili (1985) uma maneira simplificada de quantificar o processo de agregação e explicar os diversos tipos de agregados. Mais precisamente, o modelo teórico destes autores conduz à formulação de um parâmetro de empacotamento adimensional, no qual é levada em conta a forma molecular dos lipídios (Figura 1.2), dado por $v/(s.l)$, onde v é o volume hidrofóbico, s é a área

ocupada pelo anfifílico na interface água - lipídio (cabeça polar) e l é o comprimento da cadeia hidrocarbonada.

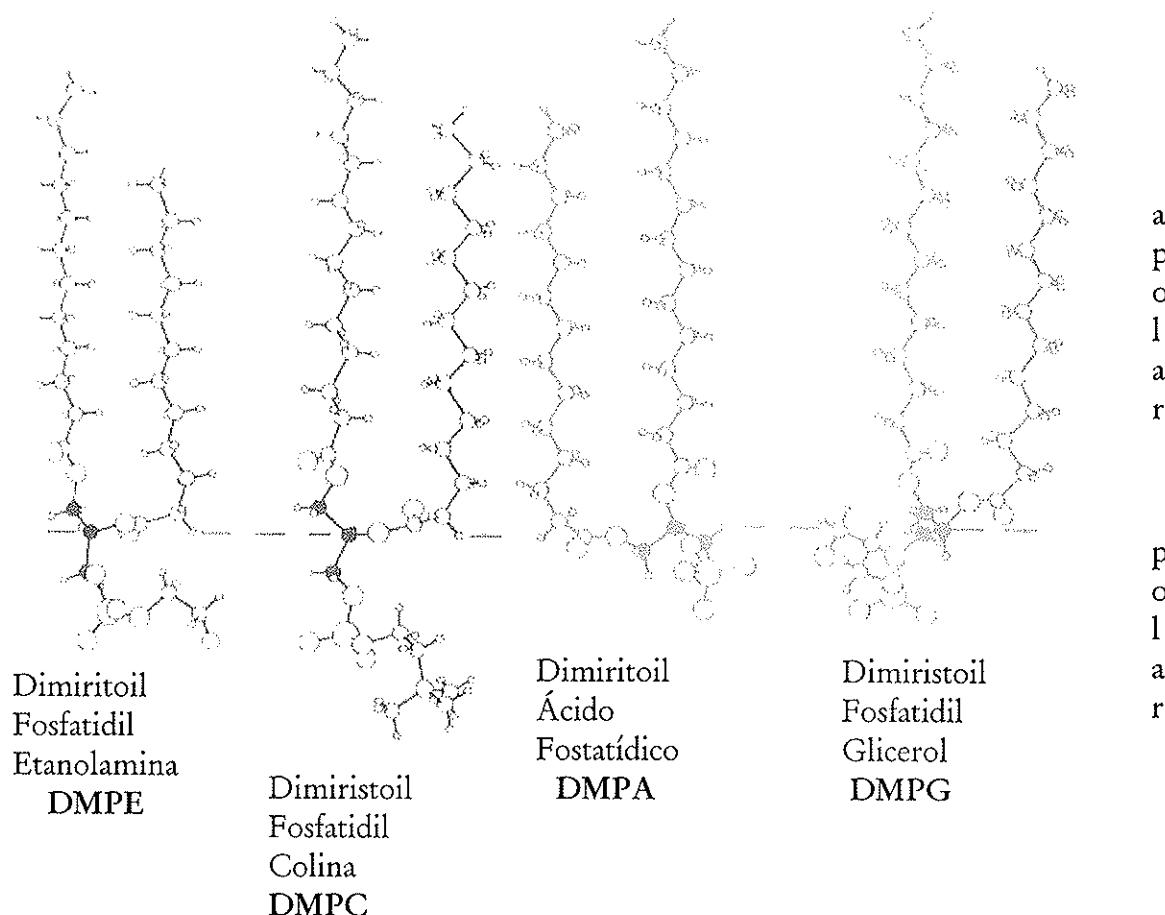


Figura 1.2 Estruturas de alguns fosfolipídios de membranas determinadas por cristalografia de raio-X (adaptada de Gennis, 1989).

Assim, como esquematizado na Figura 1.3, a lecitina, fosfolipídio extraído da gema do ovo, que tem uma forma cilíndrica ($v/(s.l) = 1$), forma estruturas lamelares, em bicamadas, que podem ser vesículas unilamelares ou multilamelares. Moléculas que possuem uma grande área superficial e volume hidrofóbico pequeno ($v/(s.l) < 1/3$) têm grande probabilidade de formar

agregados globulares como micelas diretas esféricas. Já moléculas em que a área de superfície é menor do que o volume hidrofóbico ($v/(s.l) > 1$), ou seja, na forma de cone truncado, são consideradas ideais para formação de micelas reversas (Figura 1.4c) - por exemplo, o anfifílico iônico o bis(2-etylhexil)sulfosuccinato de sódio (aerosol OT ou AOT) e as fosfatidiletanolaminas insaturadas que após hidratação adota fase hexagonal reversa - H_{xx} (ver Figura 1.4d) -. Entretanto, alguns teóricos pedem cautela em relação às previsões acima, uma vez observado que este parâmetro é fortemente dependente do comprimento l e relativamente insensíveis a valores exatos de v e s (Carnie, et al., 1979).

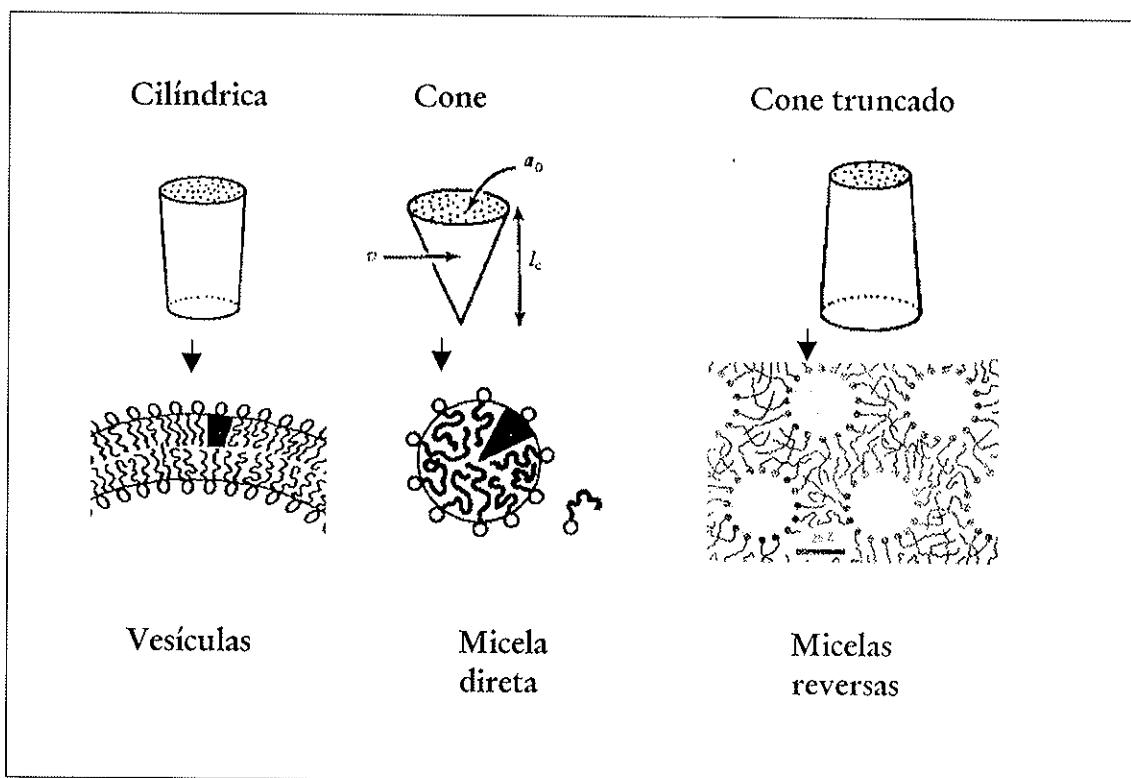


Figura 1.3 Diferentes tipos de agregados e sua relação com a forma molecular do anfifílico.

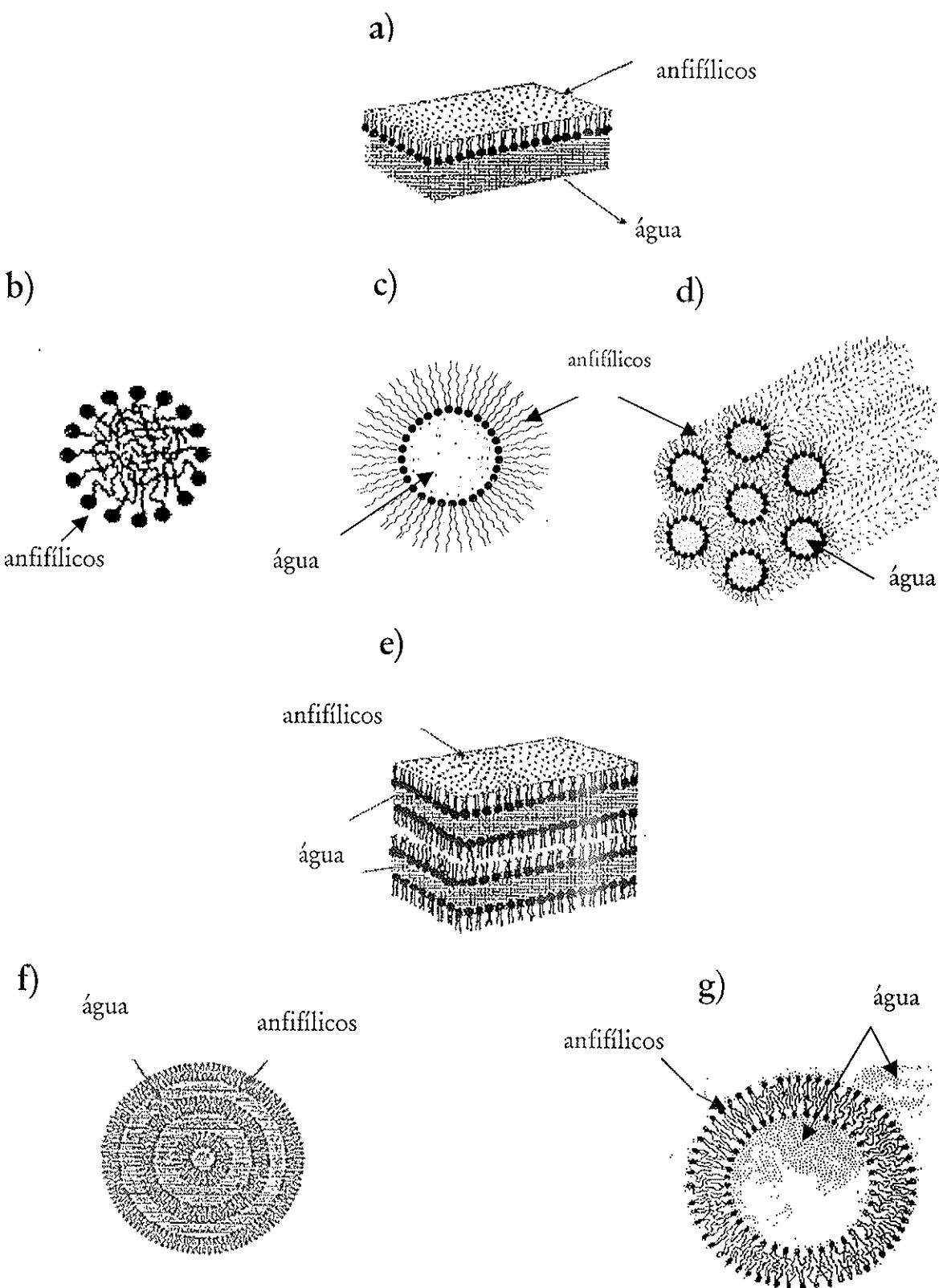


Figura 1.4 Agregados lipídicos: a) Monocamada; b) Micela direta; c) Micela inversa; d) Fase hexagonal H_{xx} ; e) Multi bicamada plana; f) Vesícula multilamelar (lipossomo) e g) Vesícula unilamelar.

Na Figura 1.4 estão ilustradas várias formas de agregados lipídicos usados como membrana modelo que são: as monocamadas, micelas normais e reversas e as bicamadas.

Monocamada (Figura 1.4a), formada na interface água-ar ou solvente orgânico é um sistema que vem contribuindo para o estudo de membranas e interação moléculas-membranas. Foram utilizadas, por exemplo, para demonstrar a influência da insaturação nas cadeias hidrocarbonadas na diminuição da temperatura de transição de fase (Hiemenz, 1986). Outro trabalho interessante é o da interação de dipiridamole, um vaso-dilatador, com lipídios em monocamadas de Langmuir (Borissevitch *et al.* 1996).

Micelas podem ser diretas ou reversas (invertidas). Nas micelas diretas (Figura 1.4b) a parte hidrofóbica da molécula (por exemplo um liso-fosfolipídio ou detergentes) está apontada para o centro da micela. Já as micelas reversas (Figura 1.4c) são formadas a partir de micro-gotas de água, suspensas em solvente orgânico e circundadas por uma camada do anfifílico, com suas cabeças polares voltadas para o meio aquoso e suas caudas apolares voltadas para o solvente orgânico (Hiemenz, 1986, Langevin, 1989). Um trabalho de aplicação foi o realizado por Almeida, 1994, no qual ele observou a interferência de micelas reversas na atividade de algumas enzimas.

Bicamadas podem ser planas ou esféricas. As membranas negras, que recebem este nome por não refletirem a luz², são unibicamadas formadas pela evaporação de lipídios sobre um pequeno orifício que separa dois meios distintos (Muelher *et al.* 1962). É um modelo útil para o estudo das propriedades elétricas e ópticas das membranas (Hiemenz, 1986). As Multibicamadas planas (Figura 1.4e) podem ser obtidas através da evaporação de solvente orgânico de uma solução lipídica que se encontra depositada sobre uma superfície plana ou no interior de celas para medidas de ressonância

² Interferência destrutiva na reflexão das paredes de filme muito fino.

paramagnética eletrônica e dicroísmo circular (Schereier-Muccillo *et al.*, 1973; Biaggi *et al.* 1993; de Jongh *et al.* 1994a; 1994b). É um modelo vantajoso para o estudo de orientação molecular. Um trabalho bastante interessante usando dicroísmo circular é o de Jongh *et al.* 1994b em que são determinadas as estruturas secundárias e orientações da proteína apocitocromo *c* em relação às bicamadas planas.

Bicamadas esféricas podem ser vesículas multilamelares (LMV) ou vesículas unilamelares. As multilamelares são geralmente definidas como lipossomos (Figura.1.4f) embora alguns autores não distingam entre vesículas lipídicas e lipossomos. A simples agitação de fosfolipídio anidro em água é suficiente para formar estruturas esféricas ou tubulares fechadas contendo mais de uma bicamada, onde pequenos espaços aquosos separam cada bicamada adjacente, formando assim as vesículas multilamelares (LMV) polidispersas.

As vesículas unilamelares (Figura 1.4g) podem ser divididas em classes tendo como base o tamanho. Vesículas com cerca de 200 a 1000Å de diâmetro são vesículas unilamelares pequenas (SUV) e podem ser obtidas por agitação ultra-sônica de vesículas multilamelares polidispersas (Huang, 1969). São bastante úteis aos experimentos de ressonância magnética nuclear - RMN e dicroísmo circular CD. Vesículas com diâmetro maior do que 1000Å são vesículas unilamelares grandes (LUV), e podem ser obtidas por evaporação do solvente na presença do meio aquoso (referida como evaporação de fase reversa) ou por extrusão, sob pressão (Szoka e Papahadjopoulos, 1980, Hope *et al.*, 1986). Além destas há outras formas para obtenção de vesículas unilamelares descritas na literatura (Szoka e Papahadjopoulos, 1980).

Reconstituição de proteínas em bicamadas (Rigaud *et al.*, 1995), permeabilidade (Schereier-Muccillo *et al.*, 1976; Subczynski *et al.*, 1989), movimentos moleculares dos fosfolipídios (Hubbell e McConnell, 1971),

transição de fase (Cevc *et al.*, 1981; Meier *et al.*, 1982; Cevc, 1991), efeito de carotenóides (Subczynski *et al.*, 1992), colesterol (Pasenkiewicz-Gierula *et al.*, 1990) e diversas proteínas, tais como o peptídeo β -Amiloide-Alzheimer (Terzi *et al.*, 1997), melitina (Kleinschmidt *et al.*, 1997), os hormônios peptídicos glucagon (Ernandes *et al.*, 1983) e melanotrópicos (Biaggi *et al.*, 1993; 1996 e 1997), entre outros foram estudados em bicamadas. Outra aplicação importante, e que nos últimos anos tem sido empregada com sucesso é o uso de lipossomos como carregadores de drogas para uso clínico (Lasic, 1996; Fujii 1996) e terapia genética (Lasic, 1996).

No presente trabalho de tese, envolvendo a interação de peptídeos melanotrópicos com membranas lipídicas, foram usados principalmente dois tipos de modelos: vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas multilamelares grandes (LMV) (ver Figura 1.4). Foram utilizadas também, em poucos experimentos, micelas diretas.

Nas membranas biológicas as proteínas integrantes, ou seja, as proteínas integrais e as periféricas, encontram-se associadas aos lipídios. Há na literatura vários estudos com a finalidade de determinar alterações causadas por estas proteínas nas estruturas dos lipídios, bem como o inverso. Estes trabalhos, que geralmente envolvem reconstituição da membrana (Chapman *et al.*, 1979), mostram que em geral os fosfolipídios localizados próximos à proteína têm suas propriedades de mobilidade e organização diferentes das dos lipídios na bicamada (Castuma *et al.*, 1991). Outros trabalhos também observam que algumas proteínas, tipo receptores de membranas parecem necessitar de lipídios com características específicas para realização de suas funções (Dreger *et al.*, 1997).

Além destas proteínas integrantes, que fazem parte da estrutura membrana-proteínas, alguns peptídeos também interagem com as membranas biológicas. Sabe-se que a interação de vários peptídeos com membranas possui

um papel chave em muitos fenômenos biológicos. Este é caso por exemplo da β -endorfina (Wu *et al.*, 1981), peptídeos sinais (Briggs *et al.*, 1986) e alguns hormônios peptídicos (Backlund *et al.*, 1994; Kaiser e Kézdy, 1984). Muitos destes peptídeos têm importantes características estruturais em comum.

Foi observado em diversos estudos, utilizando membranas modelos (como as citadas anteriormente) que a interação dos peptídeos com membranas afetam tanto a organização estrutural dos peptídeos como das membranas (Kleinschmidt *et al.*, 1997; Pertinhez *et al.*, 1995). De fato, em muitos trabalhos são observadas mudanças no valor do parâmetro de ordem e modificações na velocidade de reordenação de segmentos das cadeias hidrocarbonadas³ (Montich e Marsh, 1995; Biaggi *et al.*, 1997). Por outro lado, tem sido sugerido que peptídeos, constituídos de 10 a 50 amino ácidos, tipicamente formam estruturas secundárias anfifílicas após interagirem com um meio anfifílico (Kaiser e Kézdy, 1983; 1984; 1987; Backlund *et al.*, 1994).

Kaiser e Kézdy, 1987, sugerem três possíveis situações em que estas mudanças estruturais seriam importantes. Uma das possibilidades seria de posicionar uma parte específica do hormônio, de forma que seu sítio ativo fique numa posição correta para interagir com o receptor. Uma outra explicação seria a de melhor se ligar à membrana e isto permitir que se mova até encontrar o receptor. Uma terceira possibilidade seria a de proteger o hormônio peptídico de enzimas proteolíticas.

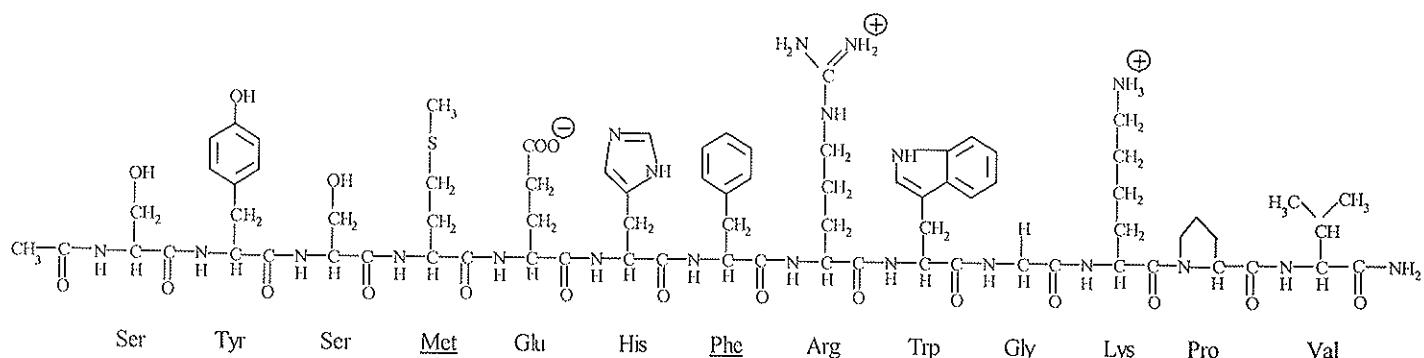
No presente trabalho os dois hormônios peptídicos estudados possuem 13 aminoácidos e portanto são membros da categoria de peptídeos discutidos acima. Por conseguinte faz-se a seguir uma breve apresentação desses hormônios.

³ Medidas do parâmetro de ordem e tempos de correlação rotacional também foram realizadas no presente trabalho, e portanto serão explicadas no capítulo de Técnicas.

1.1 Peptídeos Melanotrópicos

α -MSH (Figura 1.5) é um hormônio peptídico, produto da clivagem da proteína precursora, pró-ópio-melano-cortina - (POMC), da qual também se originam o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), as β -endorfinas e lipotrofinas (LPH) (revisão no trabalho de Bertagna, 1994). Historicamente foi considerado que a POMC era produzida somente na pituitária, entretanto, recentes trabalhos na literatura mostram, como nos artigos de Wakamatsu *et al.*, 1997 e de Chakraborty *et al.*, 1996, que esta proteína é produzida e processada em outros locais inclusive a pele (revisão - Pawelek, 1992). O α -MSH foi o primeiro dos peptídeos da POMC encontrado na pele (Todhy *et al.*, 1983, Liu 1995) e desde então têm sido numerosos os estudos mostrando este e outros peptídeos da POMC na epiderme. Os trabalhos de Liu *et al.*, 1995 e Wintzen *et al.*, 1996 mostram que os queratinócitos são importantes fontes desses peptídeos, entretanto eles também foram encontrados em melanócitos (Lunec *et al.*, 1990; Farooqui *et al.*, 1993) e nas células de Langerhans (Morhenn, 1991).

O α -MSH é um hormônio bastante conhecido por sua atuação na regulação da pigmentação da pele e cabelos de muitos animais (Hadley e Levini 1993), nos quais seus efeitos seriam observados em pelo menos dois níveis, isto é, na proliferação de melanócitos (Halaban e Lerner, 1977; Halaban *et al.*, 1993; Swope *et al.*, 1995) e na produção de melaninas (Burchill e Thody, 1986; Abdel-Malek *et al.*, 1995). Além disso, tem sido mostrado na literatura que o α -MSH e o ACTH estimulam as glândulas sebáceas (Thody e Shuster, 1989), e bem documentado é o fato destes peptídeos interagirem com diferentes citoquinas e terem efeitos imunológicos e anti-inflamatório (Catania e Lipton, 1993; Bhardwaj e Luger, 1994).

a) α -MSH

b) MSH-I

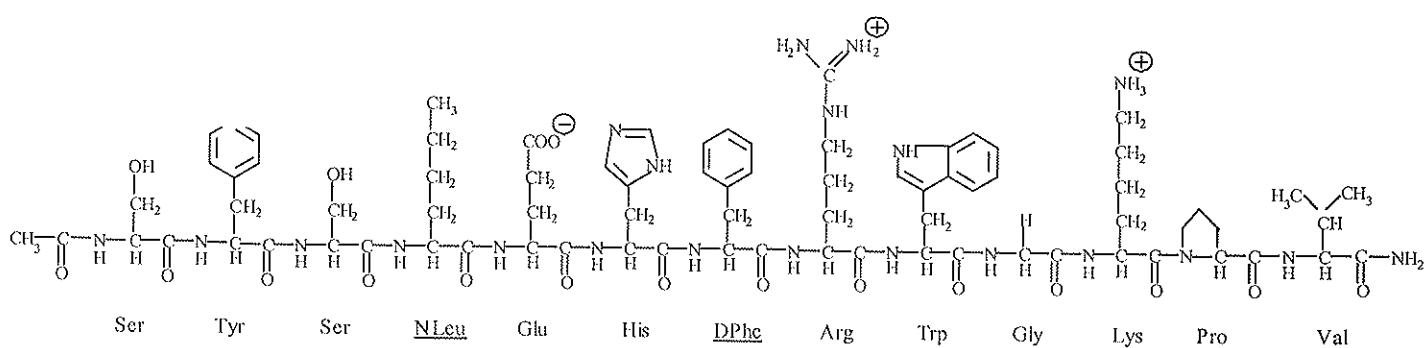


Figura 1.5 - Estrutura primária dos peptídeos melanotrópicos

Em alguns ensaios biológicos tem sido observado que nem todos os aminoácidos que constituem a estrutura primária do α -MSH são requeridos para atividade biológica (Hruby *et al.*, 1987; Castrucci *et al.*, 1989). Nestes

estudos foi observado que a seqüência mínima para estimular os melanócitos é a Ac-His-Phe-Arg-Trp-NH₂ que pode ser escrita como α -MSH_{6..9}-NH₂ (Figura 1.5). No trabalho de Hruby *et al.*, 1987, no qual eles realizaram ensaios biológicos em pele de rã e lagarto, foi verificado que a seqüência mínima para ativar os melanócitos com aproximadamente a mesma potência do α -MSH é Ac-MSH_{4..12}-NH₂ para a rã e Ac-MSH_{4..11}-NH₂ para o lagarto. Esta seqüência mínima, observada em diferentes melanotropinas que atuam com a mesma intensidade, leva o nome de sítio ativo do hormônio ou seqüência sinal. Entretanto, no trabalho de Sawyer *et al.*, 1990, ele observa, para estes mesmos hormônios, outras seqüências (5-11, 6-12) que são eqüipotentes à seqüência 4-11.

Nas últimas décadas, vêm sendo realizadas diferentes modificações na estrutura primária do α -MSH (Figura 1.5a). Estas modificações têm como objetivo a obtenção de agonistas⁴ super-potentes (Al-Obeidi *et al.*, 1989; 1990; Sawyer *et al.*, 1980; 1983). Por exemplo, as substituições da metionina (Met) na posição 4 por uma norleucina (Nle) e da L-fenilalanina por uma D-fenilalanina na posição 7 da seqüência primária do α -MSH resulta no análogo [Nle⁴ - Dphe⁷] α -MSH (que será chamado daqui em diante de MSH-I) (Figura 1.5b). Sawyer *et al.*, 1980 observaram em ensaios biológicos, que este análogo é mais potente e sua atividade biológica é prolongada, quando comparados à molécula nativa. Foi sugerido que a presença do D-Phe na posição 7 seria responsável por estabilizar uma dobra na seqüência o que resultaria no aumento da potência do análogo MSH-I. A nova estrutura conformacional do análogo facilitaria a direta ligação com os receptores nas membranas. Já, a prolongada atividade biológica deste peptídeo análogo pode ser atribuída a diferentes modificações fisiológicas, tais como estabilidade enzimática,

⁴ Agonistas são substâncias capazes de ligarem-se aos receptores e induzir reações equivalentes às dos hormônios ou de antagonistas, compostos que também se ligam aos receptores, mas sem provocar efeitos.

aumento da interação peptídeo-lipídio ou aumento da afinidade com o receptor. Muito interessante foi o estudo de Hadley *et al.*, 1996, no qual eles observaram em ensaios biológicos com melanócitos de rã (*Rana pipiens*), que o hormônio natural α -MSH permanece 25% ligado enquanto que o análogo MSH-I, 65%, após 6h da lavagem e consequente remoção dos ligantes do meio.

Considerando a possibilidade da fase lipídica da membrana celular atuar como catalisadora na interação peptídeo - receptor (Sargent e Schwyzer, 1986), esse nosso estudo focaliza a interação destes dois peptídeos, α -MSH e MSH-I, com bicamadas lipídicas puras. Foi sempre nossa preocupação, comparar os efeitos dos dois peptídeos nas membranas modelo, e com isso poder entender um pouco mais o papel da fase lipídica na ação destes peptídeos.

2 Técnicas - aspectos teóricos

Neste capítulo serão apresentados os resumos das teorias que envolvem as espectroscopias de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e dicroísmo circular (CD). Estes serão feitos, dando ênfase às propriedades que foram mais exploradas no decorrer do trabalho. De forma geral, serão discutidos os princípios básicos, tanto de RPE como de CD, os princípios do Método de Marcador de Spin e a dependência dos espectros de RPE com a orientação, mobilidade e polaridade do meio.

2.1 RPE - O Método de Marcador de Spin

A técnica de RPE usando marcadores de spin, empregada primeiramente por Ohnishi e McConnell em 1965, vem acrescentando informações valiosas sobre as propriedades estruturais e funcionais dos mais diferentes sistemas macro - moleculares (ver Berliner 1976, 1978 e 1989).

Experimentos com esta técnica foram os primeiros a realmente mostrar os diversos tipos de movimentos de lipídios constituintes de membranas biológicas. É possível encontrar na literatura inúmeras revisões que tratam de sua aplicação ao estudo de membranas (Berliner 1976; Schreier *et al.*, 1978; Marsh 1981; Knowles *et al.*, 1982). No presente trabalho empregamos este método para melhor compreender, em nível molecular,

que mudanças ocorrem nos lipídios, quando da interação dos peptídeos melanotrópicos com membranas lipídicas.

O método de marcador de spin (Ohnishi e McConnell, 1965; Marsh 1981) consiste basicamente da utilização de uma sonda paramagnética (marcador de spin ou *spin label* - Tabela 2.1), incorporada a proteínas, ácido nucleicos, membranas entre outros, cujo espectro de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) pode fornecer informações de caráter estrutural e dinâmico sobre o sistema ao qual a sonda se encontra ligada.

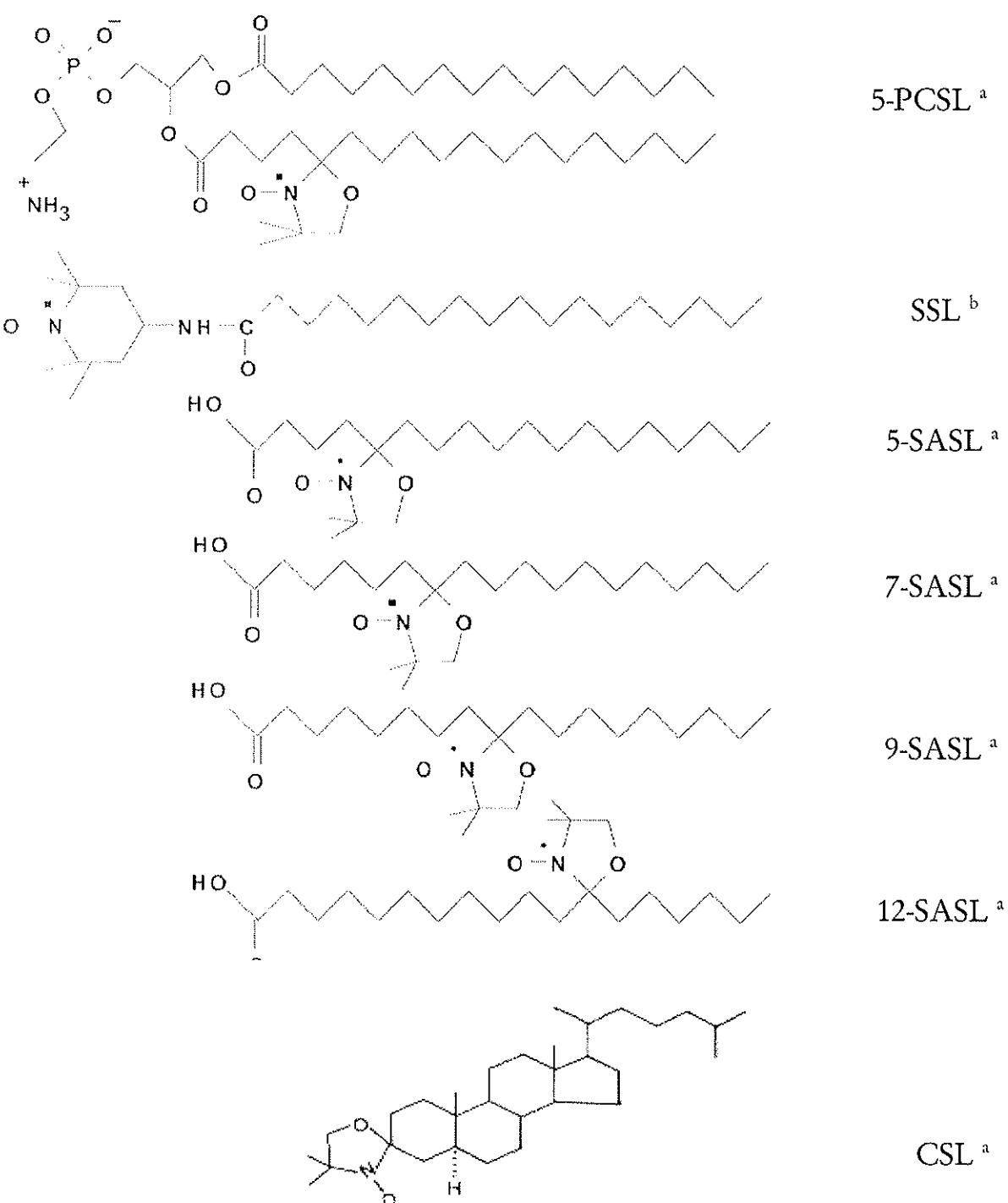
Este marcador de spin pode ser ligado covalentemente ao sistema ou apenas intercalado entre as moléculas componentes do sistema. Por exemplo, marcadores de spin de natureza lipídica (Tabela 2.1) são simplesmente inseridos, em baixa concentração, nas membranas modelo ou biológicas, tornando-se mais um constituinte da porção lipídica.

Algumas propriedades essenciais que o marcador de spin precisa apresentar são: deve ser estável em condições de pH e temperatura na região fisiológica assim como em meio aquoso, o espectro de RPE deve ser sensível a natureza do sistema de interesse, e que sua presença não perturbe o sistema natural. Tudo isto levou a busca de radicais livre que cumprissem estas exigências. Sendo que, os radicais nitróxido (Tabela 2.1) mostraram-se extremamente adequados aos requisitos acima.

Todos os marcadores de spin que utilizamos nesse trabalho possuem radicais nitróxido e estão apresentados na Tabela 2.1. Portanto nesta seção apresentaremos, além do resumo dos fundamentos básicos de RPE, os princípios que envolvem a interpretação de espectros de marcadores de spin com radicais nitróxido, inseridos em bicamadas lipídicas.

Tabela 2.1 Fórmulas moleculares dos marcadores spin empregados no presente trabalho e suas abreviações.

- a - marcadores que contém o grupamento 2,2 - dimetil-N-oxil-oxazolidina
 b- marcador que possui o grupamento TEMPOL, derivado da 2,2,5,5 - tetra metilpiperidina-N-oxil.



2.1.1 Fundamentos Básicos de RPE

Em termos de fenômeno observado, a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica estuda a interação entre momentos magnéticos e campos magnéticos.

A Hamiltoniana de spin (Abragam e Pryce, 1951) que descreve as energias envolvidas na interação de momentos magnéticos de spin (S - spin eletrônico e I - spin nuclear) com campos magnéticos externos (H) e locais, e que possui apenas termos de real importância nos estudos com radical nitróxido é expressada como:

$$\mathcal{H}_S = \beta_e H \cdot g \cdot S + I \cdot A \cdot S \quad (2.1)$$

onde primeiro termo corresponde ao efeito Zeeman e o segundo é o termo da interação hiperfina (spin eletrônico - spin nuclear). Na equação (2.1) g é o tensor que representa o fator espectroscópico ligado à constante giromagnética., A é o tensor acoplamento hiperfino e β_e é o magneton de Bohr eletrônico. g e A são matrizes que expressam a anisotropia espacial dos sinais de RPE.

Termo Zeeman

O termo que representa o efeito Zeeman,

$$\mathcal{H}_Z = \beta_e H \cdot g \cdot S \quad (2.2)$$

resulta da interação do momento magnético do spin eletrônico \mathbf{S} do sistema paramagnético com o campo externo \mathbf{H} .

Considerando o sistema de eixo do laboratório (X, Y, Z) com o campo magnético coincidindo com o eixo Z ($\mathbf{H}=k\mathbf{H}_o$), a expressão (2.2) fica:

$$\mathcal{H}_Z = \beta_e H_o (g_{ZX} S_X + g_{ZY} S_Y + g_{ZZ} S_Z) \quad (2.3)$$

Considerando agora o sistema de eixos x, y e z (por exemplo do nitróxido (ver Figura 2.3a)) em que o tensor \mathbf{g} é diagonal, a Hamiltoniana Zeeman torna-se

$$\mathcal{H}_Z = \beta_e (g_{xx} H_x S_x + g_{yy} H_y S_y + g_{zz} H_z S_z) \quad (2.4)$$

onde H_x , H_y e H_z são as componentes de \mathbf{H} neste sistema.

A passagem de um sistema de referência para outro (sistema de eixo do laboratório para sistema de eixo da molécula), é feita usando a relação

$$\mathbf{g}' = \mathbf{L} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{L}^{-1} \quad (2.5)$$

onde a matriz \mathbf{L} roda os eixos da molécula (x, y, z) para os eixos do laboratório (X, Y, Z).

Aplicando o campo \mathbf{H} numa direção com cossenos diretores (l, m, n) em relação aos eixos principais da molécula, o fator g efetivo, pode ser escrito da forma:

$$g_{ef}^2 = l^2 g_{xx}^2 + m^2 g_{yy}^2 + n^2 g_{zz}^2 \quad (2.6)$$

que em coordenadas esféricas pode ser escrito como:

$$g_{ef}(\theta, \phi) = (g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta)^{1/2} \quad (2.7)$$

esta equação (2.7) pode ser simplificada se o tensor \mathbf{g} possuir uma simetria axial, isto é,

$$\begin{aligned} g_{xx} &= g_{yy} = g_{\perp} \quad \text{e} \\ g_{zz} &= g_{//} \end{aligned} \quad (2.8)$$

e sendo θ o ângulo formado entre \mathbf{H} e o eixo de simetria da molécula, a expressão (2.7) pode ser escrita como:

$$g_{ef}(\theta) = (g_{//}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta)^{1/2} \quad (2.9)$$

Desta interação Zeeman originam-se $(2S+1)$ estados, cujos níveis de energia são proporcionais à projeção m de S_z . Considerando o campo \mathbf{H} paralelo à direção z, kH_o , os níveis de energia E_m serão dados por:

$$E_m = g_{zz} \beta_e H_o m, \quad m = -S, -S+1, \dots, S \quad (2.10)$$

e a distribuição de elétrons em cada nível será dada pela lei de distribuição de Maxwell-Boltzmann (Reif, 1965).

Sendo $h\nu$ (h é a constante de Planck e ν a freqüência da microonda) o quantum de energia da microonda, as transições permitidas são dadas pela regra de seleção $\Delta m = \pm 1$ e se for considerada apenas a interação Zeeman pode-se obter os campos de absorção H_o a partir da condição de ressonância

$$hv = \Delta E = g_{zz} \beta_e H_o \quad . \quad (2.11)$$

Com o campo de microondas H_1 aplicado perpendicularmente ao campo externo H_o e com $H_1 \ll H_o$, a probabilidade de transição entre os níveis é dada pela teoria de perturbação dependente do tempo (regra de ouro de Fermi (Schiff, 1968)).

Assim, num sistema que apresenta apenas um elétron desemparelhado, $S = \frac{1}{2}$, m pode assumir somente valores $\pm 1/2$ e a diferença de energia entre os dois níveis produzidos pelo campo magnético é dada pela Equação (2.11) (Figura 2.1)

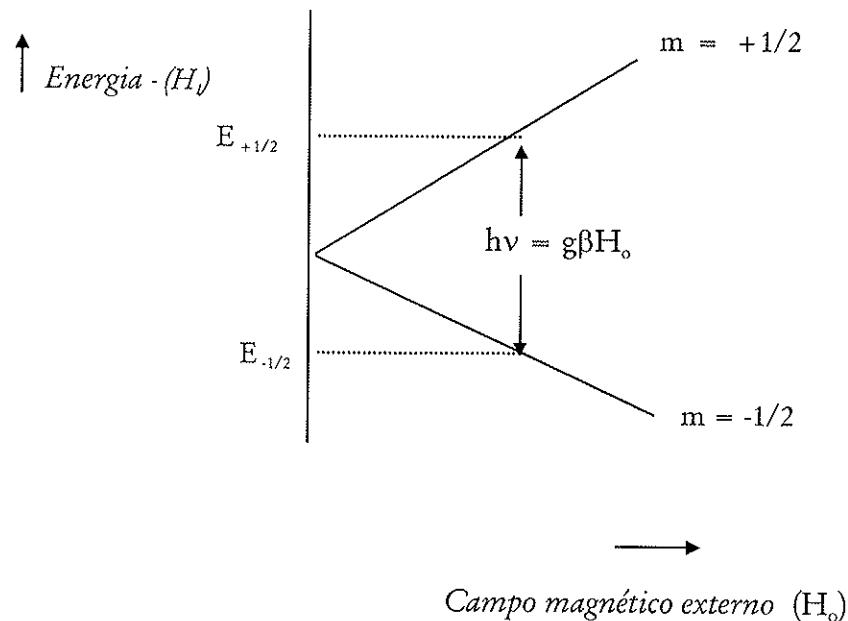


Figura 2.1 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético.

Interação Hiperfina

(Hameka, 1965; Carrington e Mc Lachlan, 1967)

As estruturas hiperfinas nos espectros de RPE surgem do fato de que o momento magnético do spin eletrônico interagindo com núcleos percebe campos locais diferentes de acordo com as $2I+1$ orientações permitidas e que são assumidas pelo spin nuclear quando na presença de um campo magnético estático.

Os termos desta interação hiperfina são expressos pela Hamiltoniana

$$\mathcal{H}_h = -g g_n \beta_e \beta_n \left[\frac{\mathbf{I} \cdot \mathbf{S}}{r^3} - \frac{3(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\mathbf{I} \cdot \mathbf{S}) \delta(\mathbf{r}) \right] \quad (2.12)$$

sendo g_n e β_n os valores de g e *magneton* de Bohr nucleares, \mathbf{r} é a distância entre elétron e núcleos e $\delta(\mathbf{r})$ é a função delta de Dirac (Schiff, 1968).

O primeiro e segundo termos na expressão (2.12) descrevem a interação dipolar elétron-núcleo, são claramente anisotrópicos e facilmente derivados de argumentos clássicos (Hameka, 1965). O terceiro termo, o qual surge da interação de contato de Fermi é obtido pelo tratamento quântico (Slichter, 1963).

Examinando separadamente os termos da Hamiltoniana (2.12) pode-se obter a Hamiltoniana hiperfina de spin, \mathcal{H}_h que leva em conta as duas contribuições, anisotrópica e isotrópica descritas a seguir.

A interação dipolar anisotrópica, primeiro e segundo termos da equação (2.12), (contribuição dos orbitais p, d, ...), pode ser escrita da forma:

$$\mathcal{H}_{ani} = \mathbf{I} \cdot \mathbf{A}' \cdot \mathbf{S} \quad (2.13)$$

onde A' é um tensor de segunda ordem, com elementos dados por

$$A'_{ij} = -g_n \beta_n g \beta_e \langle (r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j) r^{-5} \rangle \quad (2.14)$$

em que os “brackets” indicam a integração sobre toda a distribuição eletrônica.

Já o terceiro termo da equação (2.12)

$$\frac{8\pi}{3} g g_n \beta_e \beta_n \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \delta(\mathbf{r}) \quad (2.15)$$

que trata da interação de contato (contribuição do orbital s) é também conhecida como interação hiperfina isotrópica e pode ser escrita como:

$$\mathcal{H}_{iso} = \alpha \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} \quad (2.16)$$

onde α é um escalar definido por $\frac{8\pi}{3} g g_n \beta_e \beta_n \delta(\mathbf{r})$ e representa a constante de acoplamento isotrópica.

Assim, a Hamiltoniana hiperfina \mathcal{H}_h completa, somando as duas contribuições \mathcal{H}_{ani} e \mathcal{H}_{iso} , pode ser escrita de uma forma compacta como:

$$\mathcal{H}_h = \mathbf{I} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{S} \quad (2.17)$$

sendo que aqui é definido um tensor \mathbf{A} com as seguintes componentes:

$$A_{ij} = A'_{ij} + \alpha \quad (2.18)$$

onde os A'_{ij} são obtidos da equação (2.14)

Analogamente ao termo de efeito Zeeman, a equação (2.17) tensorial para a interação hiperfina pode ser simplificada, através de uma escolha conveniente de eixos (os eixos principais):

$$\mathcal{H}_h = A_{xx}S_xI_x + A_{yy}S_yI_y + A_{zz}S_zI_z \quad (2.19)$$

e no caso de simetria axial, onde $A_{xx} = A_{yy} = A_{\perp}$ e $A_{zz} = A_{//}$, temos:

$$\mathcal{H}_h = A_{\perp}(S_xI_x + S_yI_y) + A_{//}S_zI_z \quad . \quad (2.20)$$

2.1.2 Espectro de RPE de Radicais Nitróxidos

Nos radicais nitróxidos, a maior parte da densidade eletrônica está localizada no átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante do nitrogênio, ^{14}N , possui spin nuclear $I = 1$, podendo na presença de um campo magnético apresentar três valores para o momento magnético de spin nuclear ($m_I = -1, 0$ e $+1$). A interação entre o spin nuclear e o spin eletrônico, como foi visto anteriormente, dá origem ao desdobramento hiperfino (segundo termo da equação (2.1)). O spin nuclear, $I = 1$, causa o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três (Figura 2.2). Portanto, pode-se observar três transições, uma vez que somente transições com $\Delta m_I = 0$ são permitidas (em 1^a. ordem). A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino.

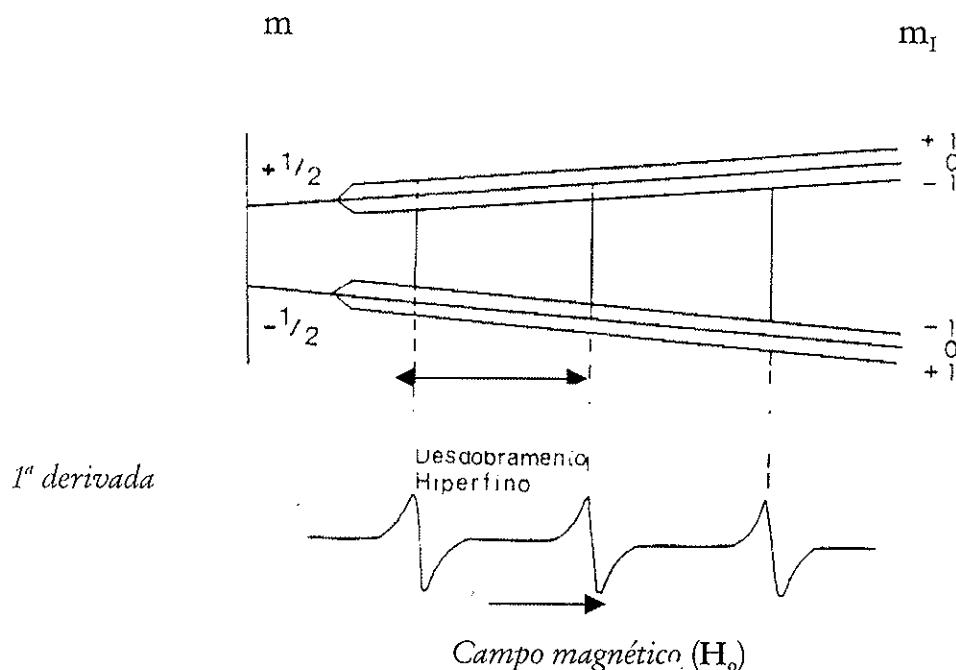


Figura 2.2 Desdobramento dos níveis de energia para um átomo com spin nuclear $I = 1$ (ex. Nitrogênio). As transições do elétron, $S = \frac{1}{2}$, são indicadas. O desdobramento hiperfino claramente mostra o desdobramento dos níveis de energia e o número de linhas é característico do valor do spin nuclear (Adaptada do trabalho de Smith, 1971)

Os Espectros de RPE de Radicais Nitróxidos Variam com a Orientação

Uma das grandes vantagens de se usar RPE é a habilidade que esta técnica possui em detectar radicais com diferentes "orientações". Isto acontece devido à dependência do espectro de RPE com o ângulo entre o campo aplicado e os eixos moleculares do radical. Portanto, é essa anisotropia que o método de marcador de spin explora, empregando radicais nitróxidos estáveis ligados diretamente a uma molécula biológica ou simplesmente intercalado, como é o caso de marcadores de spin em membranas.

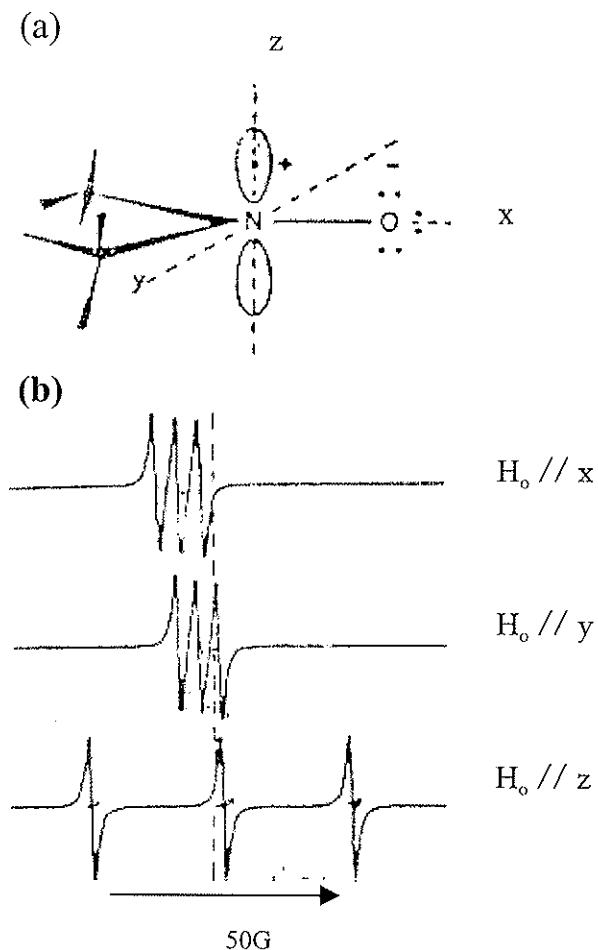


Figura 2.3 (a) Eixos moleculares principais do radical nitróxido. O eixo z fica ao longo do orbital $2p\pi$ e o eixo x ao longo da ligação N–O. (b) Espectros do radical nitróxido obtidos com o campo magnético nas diferentes orientações, como indicado na figura. (Adaptada de Griffith e Jost, 1976)

Considere a estrutura do radical nitróxido com um sistema de coordenadas como mostrado na Figura 2.3a, onde o eixo x é paralelo à ligação N–O, o eixo z é paralelo ao orbital $2p\pi$ que contém a maior parte da densidade eletrônica do elétron desemparelhado, ficando o eixo y perpendicular aos outros dois. É possível determinar experimentalmente os valores das componentes principais dos tensores g e A (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e A_{xx} , A_{yy} e A_{zz}), introduzindo marcadores de spin como impurezas substitucionais em

mono-cristais de compostos semelhantes diamagnéticos e obtendo espectros com o campo magnético sendo sucessivamente aplicado ao longo dos três eixos principais da molécula (Figura 2.3a). A Tabela 2.2 apresenta os resultados destas medidas, que obviamente demonstra a dependência dos parâmetros, g e A , (o que é claro também nos espectros da Figura 2.3b) com a orientação. Nesta Tabela 2.2 ainda podem ser vistos os valores das componentes de g e A de outro marcador de spin (CSL) que é de especial relevância nos estudos de membranas.

Tabela 2.2 Principais Valores dos tensores A e g de radicais nitróxidos orientados em cristais diamagnéticos.

| Nitróxido | Cristal diamagnético | A_{xx} (G) | A_{yy} (G) | A_{zz} (G) | g_{xx} | g_{yy} | g_{zz} |
|--------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|----------|----------|------------------------|
| CSL ^(a) | Cloreto de colesterila | 5.8 ± 0.2 | 5.8 ± 0.2 | 30.8 ± 0.1 | 2.0089 | 2.0058 | 2.0021 ± 0.0001 |
| 2-Doxil propano ^(b) | Tetra metil-1,3-ciclo butano-di-oná | 5.9 | 5.4 | 32.9 ± 0.5 | 2.0088 | 2.0058 | 2.0022 ± 0.0005 |

^(a) Hubbel e McConnell, (1971)

^(b) Jost *et al.*, (1971) (2-Doxil propano ligado ao ácido esteárico)

A Figura 2.4 mostra a orientação do sistema de coordenadas do grupo nitróxido (N–O), como já apresentado na Figura 2.3a, para um marcador de spin em que o grupamento paramagnético se encontra localizado ao longo de uma cadeia alifática, como em ácidos graxos e fosfolipídios, e também o mesmo sistema de coordenadas para um marcador de natureza esteroídica.

Nota-se pela Figura 2.4. que no primeiro caso o eixo z é paralelo ao eixo longo da molécula e no segundo, é o eixo y.

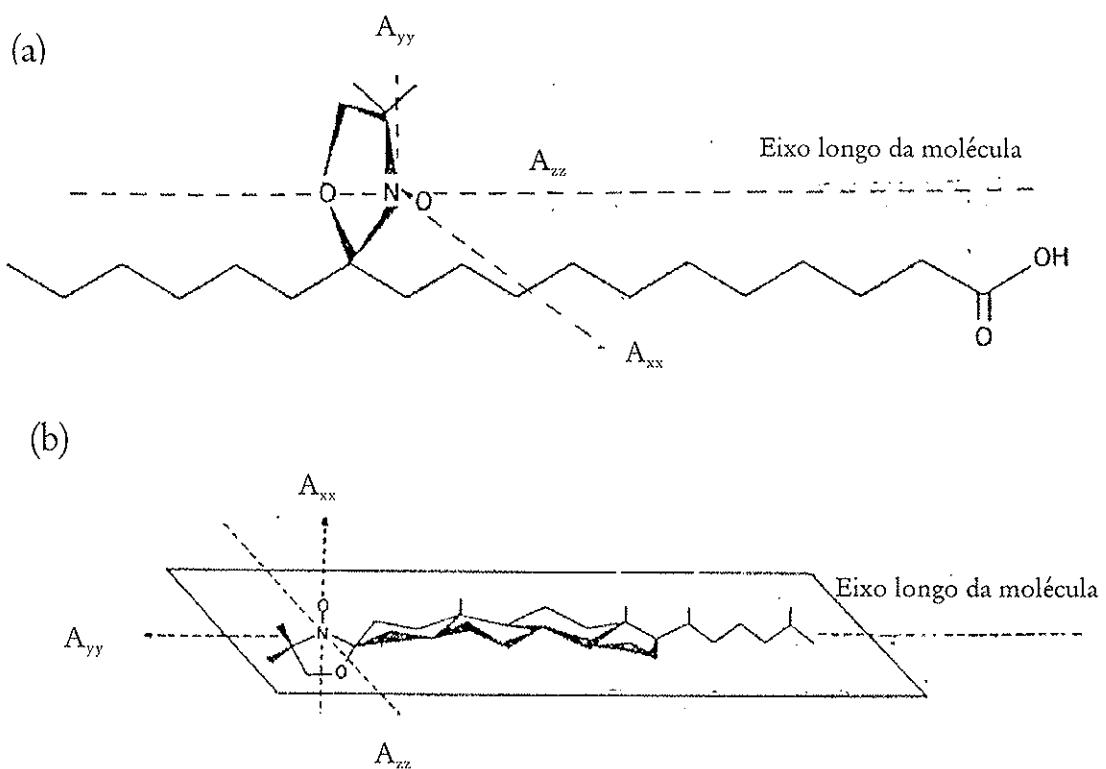


Figura 2.4 Sistemas de coordenadas para radical nitróxido ($\text{N} - \text{O}$) em um marcador de spin (a) derivado de ácido graxo (12-SASL) e (b) esteroídico (CSL). (Adaptada do trabalho de Schreier *et al.*, 1978)

Quando estas moléculas são inseridas em membranas, elas se orientam de forma que seus eixos longos ficam aproximadamente paralelos à normal à bicamada, obtendo-se assim espectros de RPE com previsíveis características as quais serão discutidas nos próximos itens.

2.1.2.1 Parâmetro de Ordem - S

Considerando um marcador de spin nitróxido, do tipo lipídico, inserido em uma bicamada lipídica (como esquematizado na Figura 2.5), possuindo movimento rápido (tempos de correlação $< 3 \times 10^9$ s) e

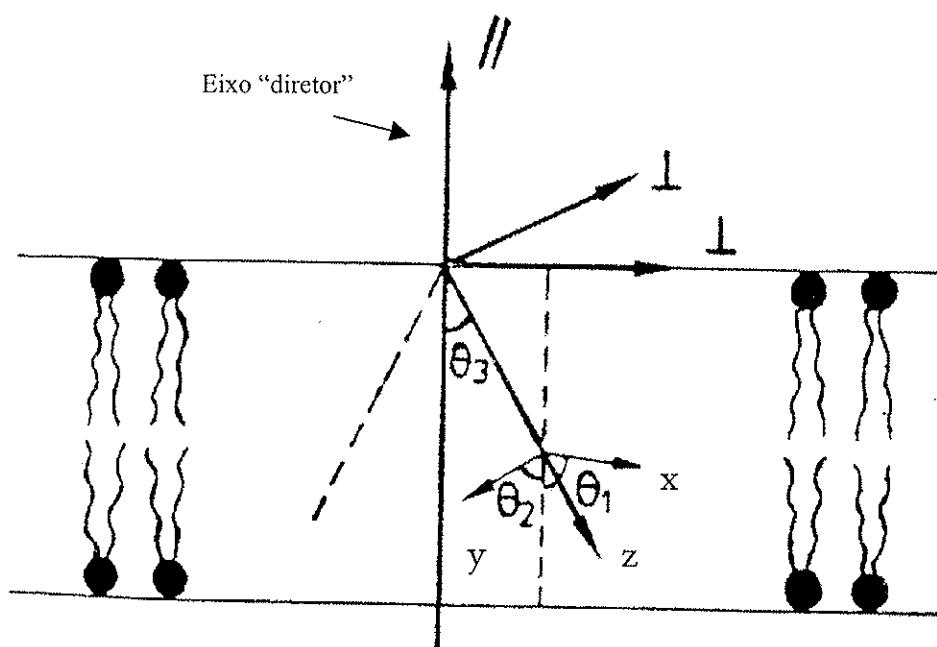


Figura 2.5 Orientação instantânea dos eixos do nitróxido x, y, z de um marcador de spin lipídico, relativa aos eixos de simetria, //, ⊥, da bicamada fosfolipídica. O movimento do lipídio possui simetria axial em relação à normal à bicamada. (Adaptada do trabalho de Marsh, 1981)

altamente anisotrópico ao redor de um eixo referência (eixo diretor, que será considerado aqui como o eixo Z), as orientações dos eixos moleculares principais do nitróxido, x, y e, z em relação à normal à bicamada são dadas por θ_1 , θ_2 e θ_3 , respectivamente.

Nas condições acima, os tensores \mathbf{A}' e \mathbf{g}' do sistema de eixos da molécula (x , y , z) são diagonais (Lajzerowicz-Bonneteau, 1976) e são transformados para o sistema de eixo da bicamada (X , Y , Z) usando a matriz rotação \mathbf{L} ¹. Fazendo estas transformações e considerando que o movimento do lipídio é rápido e que possui simetria axial em relação à normal à bicamada, obtém-se as componentes destes tensores \mathbf{A} e \mathbf{g} no sistema de eixos da bicamada:

$$A_{\perp} = \frac{1}{2} \left(1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle \right) (A_{zz} - A_{xx}) + A_{xx} \quad (2.21)$$

$$A_{//} = \langle \cos^2 \theta_3 \rangle (A_{zz} - A_{xx}) + A_{xx} \quad (2.22)$$

e

$$g_{\perp} = \frac{1}{2} \left(1 - \langle \cos^2 \theta_1 \rangle \right) (g_{xx} - g_{yy}) + \frac{1}{2} \left(1 - \langle \cos^2 \theta_3 \rangle \right) (g_{zz} - g_{yy}) + g_{yy} \quad (2.23)$$

$$g_{//} = \langle \cos^2 \theta_1 \rangle (g_{xx} - g_{yy}) + \langle \cos^2 \theta_3 \rangle (g_{zz} - g_{yy}) + g_{yy} \quad (2.24)$$

Nas expressões (2.21) e (2.22) foi feita a aproximação $A_{xx} \approx A_{yy}$. A_{\perp} , $A_{//}$, g_{\perp} e $g_{//}$ podem ser obtidos experimentalmente se o campo magnético externo for aplicado paralelo (0°) e perpendicular (90°) à normal à bicamada, respectivamente (Figura 2.5).

¹ A mesma utilizada na Equação (2.5) para a rotação do tensor \mathbf{g} . Para rotação do tensor \mathbf{A} pode ser escrita como: $\mathbf{A}' = \mathbf{L} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{L}^{-1}$.

Tem sido conveniente representar as flutuações angulares médias sofridas por marcadores nas bicamadas lipídicas, em termos de parâmetros de ordem S_{ii} , definidos como:

$$S_{ii} = \frac{1}{2} \left(3 \langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1 \right), \quad \text{com } i = 1, 2 \text{ e } 3 \quad (2.25)$$

onde $i = 1, 2, 3$, correspondem aos parâmetros de ordem dos eixos do nitróxido x, y, z respectivamente (Figura 2.5)

Combinando as Equações (2.21) e (2.22) com a Equação (2.25) encontra-se a seguinte expressão:

$$S_{33} = (A_{//} - A_{\perp}) / (A_{zz} - A_{xx}) \quad (2.26)$$

que é um parâmetro suficiente para definir a amplitude de movimento do eixo longo da molécula relativo à normal à bicamada.

Quando o movimento é totalmente aleatório (isotrópico) e rápido² os espectros são os mesmos, independente da orientação do campo magnético, e neste caso os valores de g e do desdobramento hiperfino serão de fato a média dos valores do eixo principal, assim, o $A_{//} = A_{\perp} = \alpha_{o(cristal)}$ e $g_{//} = g_{\perp} = g_{o(cristal)}$, com

$$\alpha_{o(cristal)} = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (2.27)$$

e

$$g_{o(cristal)} = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (2.28)$$

α_o e g_o (cristal) são a constante de desdobramento hiperfino isotrópica e o fator g isotrópico, respectivamente, e que são obtidos com os dados da Tabela 2.2.

Algumas vezes torna-se necessário um fator de correção na Equação (2.26) que leva em conta a polaridade do meio, isto porque, o meio onde se encontra o radical N - O pode afetar A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} (este efeito da polaridade será discutido mais adiante) (Hubbel e McConnell, 1971). Assim, mais precisamente, o parâmetro de ordem pode ser obtido por:

$$S = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{\left(A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})\right)} \frac{\alpha_o(\text{cristal})}{\alpha_o(\text{bicamada})} \quad (2.31)$$

onde

$$\alpha_o(\text{bicamada}) = \frac{1}{3}(2A_{\perp} + A_{//}) \quad (2.32)$$

A Equação.(2.31) pode ser usada no caso de marcadores de spin que possuam o eixo z do nitróxido paralelo ao eixo longo do lipídio, como é o caso dos derivados de ácido graxo e os derivados de fosfolipídio (Figura 2.4a). No caso do marcador esteroídico - CSL (Tabela 2.1 e Figura 2.4b), onde é o eixo y do nitróxido que coincide (aproximadamente) com o eixo longo do lipídio, S pode ser escrito como:

$$S = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{A_{yy} - 1/2(A_{zz} + A_{xx})} \frac{\alpha_o(\text{cristal})}{\alpha_o(\text{bicamada})} \quad (2.33)$$

² Efeitos da mobilidade serão discutidos no próximo item.

Como pode ser observado, o parâmetro de ordem (Seelig 1970) não envolve explicitamente as velocidades de movimento do marcador de spin. Mas como citado anteriormente é pressuposto que este marcador tenha movimentos rápidos e que possua simetria ($\tau_R < 3 \times 10^{-9}$ s.)³ em torno do eixo longo da molécula, isto é, possua simetria cilíndrica ao redor deste eixo.

No entanto, nos trabalhos de Lange, 1985 e Marsh, 1989 eles mostraram, tanto experimentalmente como teoricamente, que os espectros obtidos nas condições acima contêm contribuições de movimentos lentos de reorientação molecular, mesmo na fase líquido-cristalina e, que para analisá-los é necessário a aplicar a teoria para movimento lento (equação estocástica de *Liouville*). Desta forma, o cálculo do parâmetro de ordem, descrito anteriormente, baseado em movimento rápido, deve ser considerado apenas como um valor empírico. Uma aproximação alternativa pode ser obtida no trabalho de Freed, 1976.

Quando se tem uma dispersão aleatória de bicamadas, por exemplo, marcadores de spin intercalados em lipossomos ou vesículas, os espectros obtidos representam a *soma* dos espectros de todas as possíveis orientações do eixo longo da molécula em relação ao campo magnético aplicado.. Embora a amostra seja macroscopicamente isotrópica, os espectros que se somam refletem a orientação de cada molécula. Hubbell e McConnell (1971) demonstraram que os espectros de certos marcadores, nestes sistemas, apresentam pontos dos quais é possível extrair $A_{//}$ e A_{\perp} e assim calcular o parâmetro de ordem S. Entretanto, existe um intervalo de S para o qual se consegue resolver os extremos externos e internos nestas condições.

³ Em relação à escala de tempo do experimento (10^{-9} s).

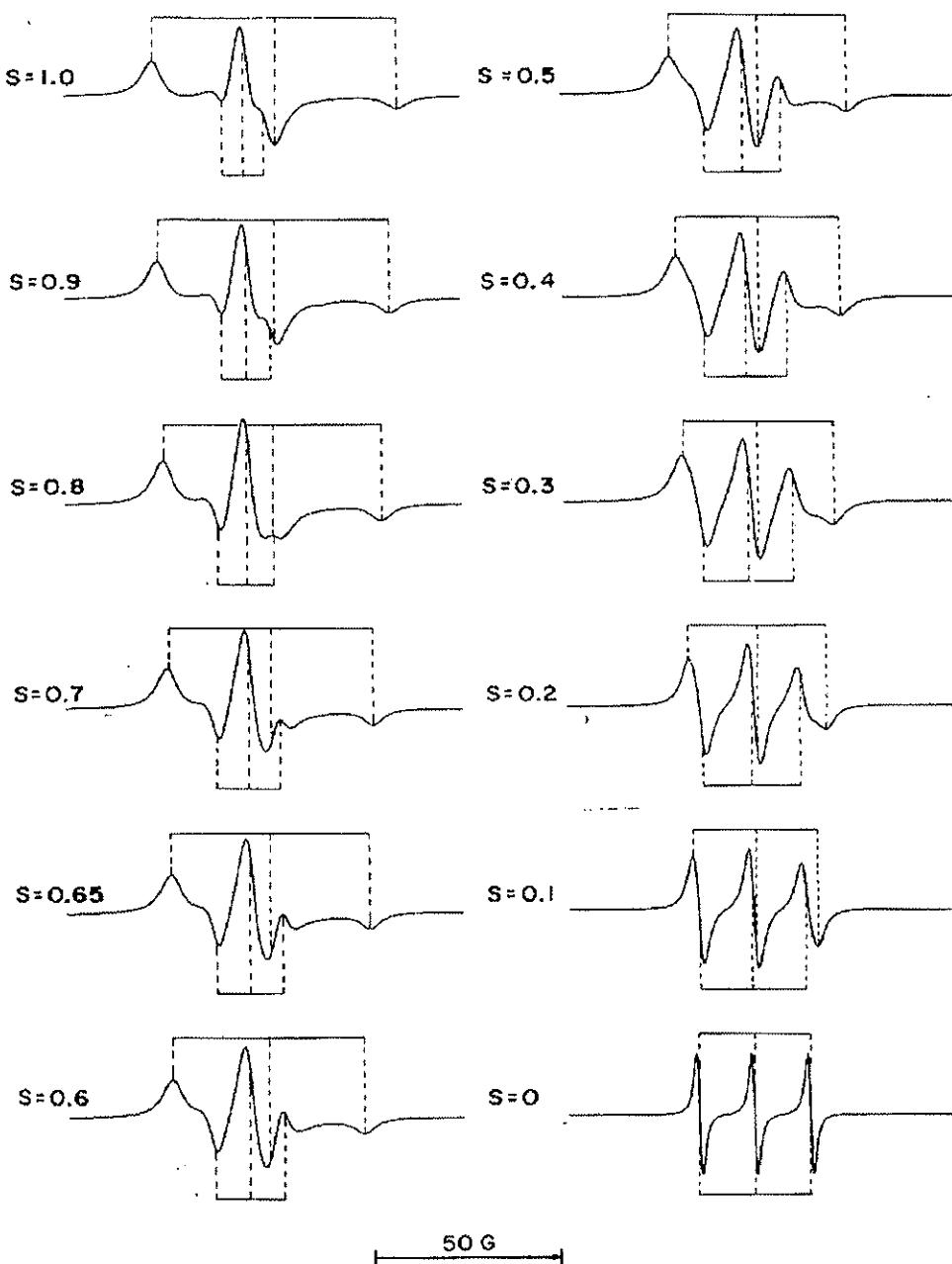


Figura 2.6 Espectros simulados de amostras aleatoriamente orientadas em função do parâmetro de ordem, S . As linhas tracejadas indicam as posições de $2A_{\parallel}$ (desdobramento mais largo) e $2A_{\perp}$ (desdobramento mais estreito) (Griffith e Jost, 1976)

Na Figura 2.6 estão representados os espectros simulados dos marcadores derivados de ácido graxo ou fosfolipídico, intercalados em lipossomos, considerando movimento rápido e anisotrópico, caracterizado para vários valores de S (Griffith e Jost, 1976). Nota-se que quando S tem um valor alto, o desdobramento interno é muito pequeno para ser resolvido e, quando S é baixo, ocorre uma superposição dos dois desdobramentos e portanto, não são resolvidos também.

A Figura 2.7 mostra um dos espectros da Figura 2.6 ampliada. É claro nesta figura que o desdobramento hiperfino máximo ($2A_{\max}$) é uma boa medida do desdobramento hiperfino efetivo externo ($2A_{//}$); por outro lado, o desdobramento hiperfino mínimo ($2A_{\min}$) não é exatamente igual ao desdobramento hiperfino efetivo interno ($2A_{\perp}$).

Para calcular o parâmetro de ordem nesta situação, são necessárias algumas aproximações. A primeira aproximação é assumir que $A_{\max} = A_{//}$ e $A_{\min} = A_{\perp}$. Assim obtém-se um parâmetro de ordem aparente S_{ap} como:

$$S_{ap} = \frac{(A_{\max} - A_{\min})}{A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})} \quad (2.34)$$

onde, A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são os valores obtidos em um mono - cristal (ver Tabela 2.2) e neste caso está sendo ignorado o efeito da polaridade.

Uma outra aproximação, discutida nos trabalho de Gaffney (1976) e Griffith e Jost (1976), e que foi empregada no presente trabalho, é considerar: $A_{//} = A_{\max}$ e

$$A_{\perp} = A_{\min} + 1.4(1 - S_{ap}) \quad (2.35)$$

esta é uma equação empírica, usada para ajustar os espectros simulados e S_{ap} é obtido da Equação (2.34).

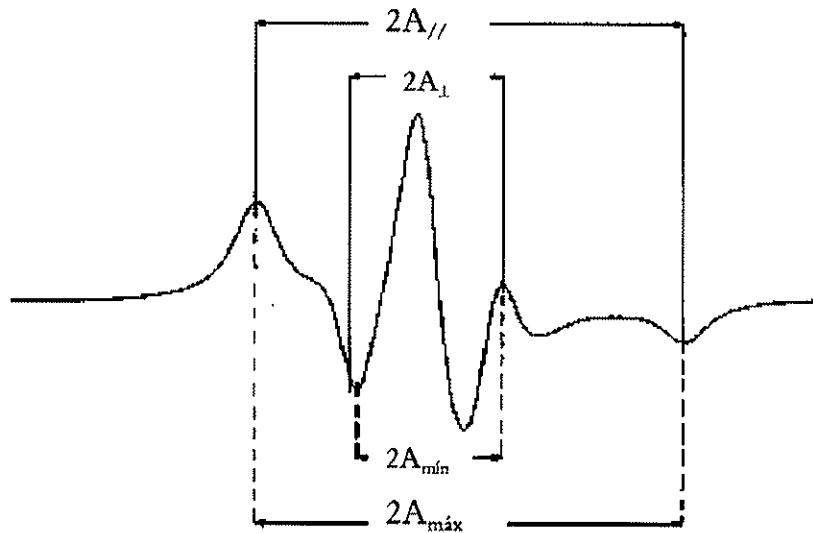


Figura 2.7 Um dos espectros da Figura 2.6, ampliado para melhor comparar os valores de $2A_{//}$ e $2A_{\perp}$ com as medidas de A_{\max} e A_{\min} , respectivamente.

Assim, com estas aproximações, a equação para calcular S (que neste trabalho será chamado de S_{ef} - parâmetro de ordem efetivo) fica:

$$S_{ef} = \frac{(A_{//} - A_{\perp})}{A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})} \frac{\alpha_{o(cristal)}}{\alpha_{o(bicamada)}} \quad (2.36)$$

com A_{\perp} dado pela Equação (2.35).

“Nas situações em que não é possível medir o desdobramento interno (A_{\min}), o desdobramento externo A_{\max} é usado como um parâmetro empírico proporcional a S_{ef} . Observa-se experimentalmente que este parâmetro é sensível às mudanças na amplitude de movimento e polaridade.

No entanto, se a polaridade permanecer constante, então as mudanças em $A_{máx}$ vão ser diretamente proporcionais às mudanças no parâmetro de ordem S_{ef} " (Marsh, 1981:76). Isto vale sempre que se consideram movimentos rápidos. Para movimentos lentos, como discutido anteriormente, $A_{máx}$ e S_{ef} refletem uma mistura de ordem e mobilidade.

2.1.2.2 Os Espectros de RPE de Radicais Nitróxidos Variam com a Mobilidade - Tempo de Correlação Rotacional - τ

(Marsh, 1981;1989)

Quando o movimento de um marcador de spin for isotrópico e muito rápido em relação à escala de tempo do RPE, isto é, com tempo de correlação $\tau \leq 5 \times 10^{-11}$ s, os espectros serão insensíveis à velocidade de movimento molecular. Nestas condições, os espectros apresentarão valores de g e A os quais serão as médias dos respectivos tensores (Equações 2.27 e 2.28).

Se a velocidade deste marcador de spin diminui, seja por diminuição da temperatura ou aumento da viscosidade, os espectros de RPE se alteram. A Figura 2.8 ilustra este fato. Como pode ser observado, a largura das linhas é determinada pela velocidade do marcador; conforme a velocidade de movimento vai diminuindo, as linhas vão se tornando mais alargadas.

Na situação em que o movimento do marcador fica muito lento ($\tau \geq 3 \times 10^{-7}$ s) ele terá uma distribuição aleatória de orientações dos eixos moleculares. Neste caso, cada molécula (cada orientação diferente da molécula) contribuirá com um espectro resultando na soma envolvendo todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético aplicado. Espectros obtidos nesta situação extrema podem ser analisados usando a espectroscopia de transferência de saturação [ST-ESR] (Thomas *et al.*, 1976;

Hyde e Dalton, 1979; Hemminga e Jager, 1989) que é uma técnica bastante sensível a movimentos muito lentos. Uma forma mais direta para observar movimento é através da técnica de transferência de saturação de RPE resolvida no tempo (Dzuba *et al.*, 1984; Fajer *et al.*, 1986).

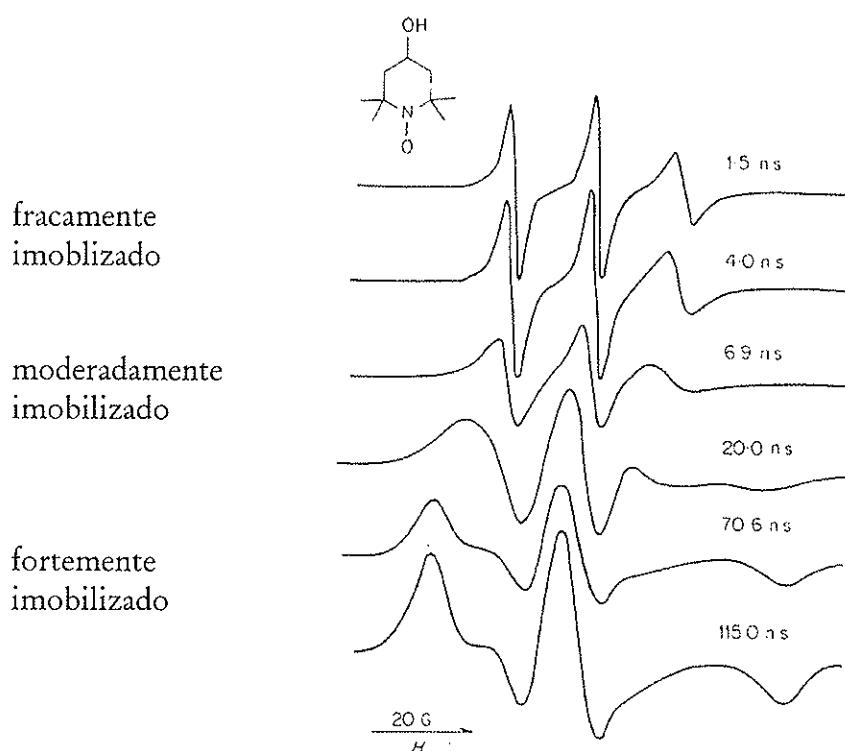


Figura 2.8 Espectros de RPE do marcador de spin TEMPOL em soluções de viscosidade crescente (Hsia e Piette, 1969).

Na situação intermediária de movimento do marcador de spin, isto é, quando o tempo de correlação rotacional da molécula estiver no intervalo de 5×10^{-11} s a 10^{-8} s, o alargamento homogêneo da linha lorentziana, que é inversamente proporcional ao tempo de relaxação spin-spin T_2 , (transverso), vai depender da velocidade ϵ , portanto, pode ser usado para determinar o

tempo de correlação rotacional. Dentro deste limite, mas na região de movimento mais rápido ($10^{-11}\text{s} \leq \tau \leq 10^9\text{s}$) os espectros podem ser analisados usando a teoria de Redfield (Redfield, 1965), enquanto que para movimento lento ($10^9\text{s} \leq \tau \leq 10^{-8}\text{s}$) é necessário empregar o tratamento estocástico de Liouville (Freed, 1976).

τ para movimentos rápidos do nitróxido ($10^{-11}\text{s} \leq \tau \leq 10^9\text{s}$)

Como mencionado anteriormente, quando o marcador de spin se encontra bastante móvel, o tempo de relaxação transverso, $T_2(m)$, e portanto o alargamento diferencial das linhas, deve ser tratado pelo método desenvolvido por Redfield (1965), usando a teoria de perturbação dependente do tempo, para movimento isotrópico.

É obtido através deste tratamento que a largura da linha Lorentziana (ΔH^L) tem a seguinte dependência com o número quântico de spin nuclear do ^{14}N :

$$\Delta H_{m_I}^L = A + Bm_I + Cm_I^2 \quad (2.37)$$

onde $m_I = -1, 0, +1$. O termo A causa um alargamento uniforme das três linhas e não é facilmente distinguido dos outros mecanismos de alargamento homogêneo que existem. O termo B induz um alargamento diferencial das três linhas, e o termo C causa um alargamento simétrico em torno da linha central.

B e C podem ser determinados separadamente pelas medidas das diferentes larguras de linha lorentziana, as quais podem ser obtidas com precisão através de programas de simulação LOWFIT (Bales, 1989).

O programa de simulação LOWFIT usa a metodologia desenvolvida por Bales (1989), na qual a análise das linhas espectrais é feita considerando que o perfil da linha *Voigt* é simplesmente descrito por uma soma de

lorentzianas e gaussianas (Wertheim *et al.*, 1974). A partir desse programa obtém-se a largura de linha total (ΔH_{pp}^0) e o valor médio das larguras gaussianas⁴ ($\langle \Delta H_{pp}^G \rangle$). Desta forma, a largura da linha lorentziana ΔH_{pp}^L é obtida a partir da equação: (nas equações abaixo foi mantida a nomenclatura empregada pelo autor (Bales 1989))

$$\Delta H_{pp}^L = \Delta H_{pp}^0(0) \left\{ 1 - \left(\frac{\langle \Delta H_{pp}^G \rangle}{\Delta H_{pp}^0(0)} \right)^2 \right\} \quad (2.38)$$

e os parâmetros B e C, usando a Equação (2.37) pelas relações:

$$B = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left[\sqrt{\frac{V_{pp}(0)}{V_{pp}(+1)}} - \sqrt{\frac{V_{pp}(0)}{V_{pp}(-1)}} \right] \quad (2.39)$$

$$C = \frac{1}{2} \Delta H_{pp}^L(0) \left[\sqrt{\frac{V_{pp}(0)}{V_{pp}(+1)}} + \sqrt{\frac{V_{pp}(0)}{V_{pp}(-1)}} - 2 \right] \quad (2.40)$$

onde $V_{pp}(m_I)$ é a altura do pico correspondente a m_I e que pode ser usada no lugar das larguras de linha uma vez que $\Delta H^2(m_I) \cdot V_{pp}(m_I)$ é área de cada pico do espectro.

⁴ A largura gaussiana é em princípio uma característica de cada marcador e não deve variar com a temperatura, solvente ou m_I . Portanto, para estas medidas foi tomado o valor médio dos ajustes do LOWFIT a diversas temperaturas e condições.

Introduzindo uma correção devida ao fato das larguras de linhas não serem somente lorentzianas, as expressões para os cálculos de B e C ficam:

$$B_{corr} = S(\chi_o)B \quad (2.41)$$

$$C_{corr} = S(\chi_o)C$$

sendo

$$S(\chi_o) = \frac{1 + 1.78\chi_o + 1.85\chi_o^2}{1 + 2.08\chi_o} \quad (2.42)$$

com

$$\chi_o = \frac{\langle \Delta H_{pp}^G \rangle}{\Delta H_{pp}^L(0)} \quad (2.43)$$

Com os parâmetros B_{corr} e C_{corr} , pode-se então calcular os tempos de correlação τ_{20} e τ_{22} (Marsh, 1989) através das equações:

$$\begin{aligned} \tau_{20} &= c_1(C_{corr} + c_2B_{corr}) \\ \tau_{22} &= b_1(B_{corr} + b_2C_{corr}) \end{aligned} \quad (2.44)$$

c_1 , c_2 , b_1 e b_2 são parâmetros empíricos que vão depender do eixo preferencial de rotação do marcador de spin. Quando o eixo de rotação é o x, como é o caso do SSL, $c_1 = -2.85$ ns, $c_2 = 1.447$, $b_1 = 1.28$ ns e $b_2 = 1.912$ (Marsh, 1989). Para marcadores que possuem movimento preferencial de rotação em torno do eixo z (Figura 2.3 a), $c_1 = 1.16$ ns, $c_2 = -0.0316$, $b_1 = -0.335$ ns e $b_2 = 1.13$.

Em sistemas nos quais os marcadores de spin sofrem rotação ao redor de um eixo preferencial, isto é, possuem simetria axial ao redor de um eixo,

dois tempos de correlação rotacional independentes são requeridos, $\tau_{R//}$ e $\tau_{R\perp}$, para caracterizar o movimento da molécula. Onde $\tau_{R//}$ e $\tau_{R\perp}$, são os tempos de correlação rotacional ao redor do eixo de simetria e perpendicular, respectivamente.

Neste caso, as expressões para calcular os tempos $\tau_{R//}$ e $\tau_{R\perp}$ são:

$$\tau_{R//} = \frac{2\tau_{R\perp} \cdot \tau_{22}}{3\tau_{R\perp} - \tau_{22}} \quad (2.45)$$

$$\tau_{R\perp} = \tau_{20} \quad (2.46)$$

τ para movimento lento do nitróxido ($10^{-9}\text{s} \leq \tau \leq 10^{-8}\text{s}$)

Na região de movimento mais restrito do marcador de spin a teoria de perturbação dependente do tempo não pode mais ser utilizada para cálculo do tempo de relaxação $T_2(m)$. É necessário, neste caso, empregar outros tratamentos como o método estocástico de Liouville (Freed, 1976; Polnaszek, 1979) ou por meio das equações de Block modificadas (Mc Calley *et al.*, 1972).

Nesta situação de movimento lento, mas que ainda tem um apreciável efeito sobre os espectros, as posições das linhas não ficam determinadas apenas pela amplitude do movimento, mas dependem também da velocidade do movimento, isto é, do tempo de correlação rotacional. Neste caso, mesmo para movimento *isotrópico*, é necessário proceder a simulação dos espectros.

Para uma discussão mais aprofundada das condições necessárias para a análise de espectros de marcadores de spin nestas condições, são recomendadas algumas revisões como as de Cannon *et al.*, (1975); Smith *et*

al., (1976) e Schreier *et al.*, (1978) e para maiores detalhes da simulação, os trabalhos de Freed (1976) e Polnaszek, (1979).

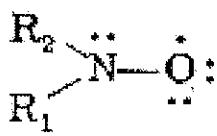
Entretanto, para movimento lento e isotrópico, foi desenvolvido por Freed, (1976) um método mais restrito e empírico de análise destes espectros. O tempo de correlação rotacional pode ser estimado a partir de medidas do desdobramento hiperfino externo $A_{//}$ e A_{zz} , que é determinado a partir do espectro de pó (Goldmann *et al.*, 1972).

Em sistemas no qual a molécula está rodando anisotropicamente (marcador de spin inserido na membrana), o método citado não pode mais ser aplicado e é necessário efetuar a simulação completa do espectro.

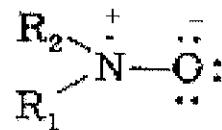
2.1.2.3 Os Espectros de RPE de Radicais Nitróxidos são Sensíveis à Polaridade do Meio- Hidrofobicidade

A dependência dos parâmetros α_o (desdobramento hiperfino isotrópico) e fator -g com o solvente é bastante conhecida desde os trabalhos de Rassat *et al.*, (1965; 1967). De forma geral, α_o aumenta e g decresce com o aumento da polaridade. Estes efeitos serviram de base para a proposta de localização dos grupamentos N – O de diferentes marcadores de spin bem como para estudos do perfil de hidrofobicidade (polaridade) de membranas (Waggoner *et al.*, 1967; Griffith *et al.*, 1974; Subczynski *et al.*, 1994).

A mudança no parâmetro α_o resulta do fato de que a interação hiperfina depende da densidade de elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio. Pode se considerar as estruturas eletrônicas do radical nitróxido como:



(a)



(b)

onde a estrutura (a) representa o elétron desemparelhado do radical sobre o átomo do oxigênio e a estrutura (b) sobre o átomo de nitrogênio. Em meio altamente polar, a estrutura (b) é favorecida, isto é, aumenta a densidade de spin eletrônico desemparelhado no átomo de nitrogênio, resultando num aumento da constante de desdobramento hiperfino α_o ou A_{zz} .

2.2 Dicroísmo Circular - Atividade Óptica

Uma das questões centrais por volta da metade deste século era demonstrar a existência de estrutura tipo α -hélice em solução e possivelmente identificá-la em proteínas globulares. Com este objetivo vários peptídeos foram sintetizados e caracterizados por vários instrumentos físicos. Desde medidas de viscosidade intrínseca, pressão osmótica, passando por medidas de velocidade de sedimentação, espectroscopias de infravermelho e ultravioleta, dispersão rotacional óptica (ORD) e por último o dicroísmo circular (CD). Hoje a maioria destas técnicas não são mais utilizadas para caracterizar tamanho e estrutura secundária de polipeptídeos e proteínas. Mas os métodos ópticos, ORD e CD, que

observam conformações de proteínas são ainda bastante empregados (Kallenback *et al.*, 1996). Não só para estudos de macromoléculas como proteínas e peptídeos mas também de carboidratos (Stevens, E.S., 1996) e ácidos nucleicos (Johnson, W.C., Jr., 1996). Pode-se ainda examinar propriedades de agregados como membranas e micelas assim como de moléculas a elas ligadas (Terzi *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1995; Biaggi *et al.*, 1997).

A espectroscopia de dicroísmo circular detecta a atividade óptica de moléculas assimétricas quando estas interagem com a luz polarizada circularmente.

Considera-se que uma molécula é opticamente ativa quando ela interage diferentemente com radiações circularmente polarizadas em sentidos opostos (uma componente à direita - sentido dos ponteiros do relógio - e outra à esquerda - sentido contrário-). Estas interações podem ser detectadas como uma diferença na velocidade de propagação das duas componentes (ORD - “*optical rotatory dispersion*”) ou como uma diferença na absorção das duas componentes (CD - dicroísmo circular).

Estes efeitos podem ser observados experimentalmente com uma luz polarizada linearmente, $\vec{E} = \hat{i}E_0 \sin\omega t$, que após atravessar uma amostra opticamente ativa, é modificada de duas maneiras: 1^{a)}) A amplitude máxima de \vec{E} não descreverá por muito tempo uma linha; em vez disso traçará uma elipse. Assim, a elipticidade⁵ ou dicroísmo circular da luz (θ) é uma medida da atividade óptica que é definida como $\text{arctg} \frac{b/2}{a/2}$ da elipse (Figura 2.9a). 2^{a)}) A orientação da elipse (ϕ) é a outra indicação da atividade óptica. Se as

⁵ Considerando que a luz polarizada sempre pode ser decomposta em duas componentes, a elipticidade implica diferentes coeficientes de extinção (ϵ) (diferente absorção) para a luz circularmente polarizada para a direita e esquerda, passando através de uma amostra que absorve.

componentes se propagam com diferentes velocidades, implica que a amostra possui diferentes índices de refração (n) para as duas componentes. Isto significa uma se propagando mais rapidamente do que a outra através do meio. O resultado é um deslocamento de fase entre as duas componentes, que é proporcional a diferença dos índices de refração $n_E - n_D$ (onde n_E = índice de refração para a luz circularmente polarizada à esquerda e n_D = índice de refração para a luz circularmente polarizada à direita) chamado de birefringência circular (ORD). Este deslocamento de fase resulta em uma rotação do eixo longo da luz polarizada elipticamente (Figura 2.9b)(Woddy, 1996).

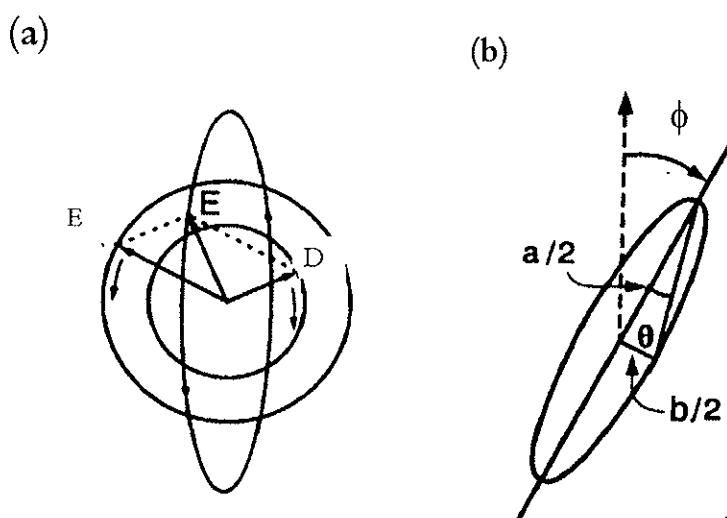


Figura 2.9 Luz polarizada elipticamente, formada pela luz circularmente polarizada à direita e à esquerda de intensidades diferentes.(Adaptada do trabalho de Snatzke, 1994).

Pode-se obter a elipticidade (θ) e a rotação óptica (ϕ) para uma amostra com comprimento ℓ , através das expressões:

$$\theta = 2.303(A_E - A_D) \frac{180}{4\pi} \text{ graus} \quad (2.47)$$

$$\phi = \frac{180\ell}{\lambda} (n_E - n_D) \quad \text{graus} \quad (2.48)$$

onde A_E e A_D são as absorções das componentes da luz polarizada à esquerda e à direita respectivamente.

No entanto, experimentalmente, para comparar resultados de diferentes amostras é conveniente definir rotação óptica e elipticidade em função da concentração molar da amostra (C), ou seja rotação molar $[\phi]$ e elipticidade molar $[\theta]$ podem ser obtidas como:

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{C \cdot \ell} \quad (2.49)$$

$$[\phi] = \frac{100 \cdot \phi}{C \cdot \ell} \quad (2.50)$$

Trabalhando com polipeptídeos ou proteínas, é necessário ainda, por motivo de comparação, calcular a atividade óptica em função da concentração molar residual, assim pode-se escrever a Equação (2.49) como:

$$[\theta]_R = \frac{100 \cdot PM \cdot \theta}{C \cdot \ell} \quad (2.51)$$

onde:

PM = massa molecular média do resíduo.

Tanto ORD como CD dependem do comprimento de onda (λ) e se relacionam uma com a outra, por um conjunto de integrais chamadas de transformações de Kronig - Kramers (Moscowitz, 1962). Isto significa que se

(ϕ) é conhecido em todos os comprimentos de onda, (θ) poderá ser calculado e vice-versa. Na prática, a medida de CD é usualmente escolhida, uma vez que a birefringência observada é usualmente um número muito pequeno e portanto muito difícil de ser medida. (ver Cantor e Schimmel, 1980.v.2 capítulo 8).

2.2.1 Princípios Físicos do CD

(Cantor e Schimmel, 1980; Woody, 1996)

Uma banda de CD geralmente tem a mesma forma da correspondente banda de absorção.

Empiricamente, pode-se representar a atividade óptica de uma molécula introduzindo o conceito de “*Rotational strength*” (R_{0a})⁶ o qual é definido como sendo a área do espectro de CD correspondente, ou seja:

$$R_{0a}(\lambda) = \frac{3hc}{8\pi^3 N} \int \frac{[\theta](\lambda)}{\lambda} d\lambda \quad (2.52)$$

onde $[\theta]_\lambda$ é a elipticidade , N é o número de Avogadro, h é a constante de Planck, c a velocidade da luz e a integral é feita sob o espectro de CD produzido pela transição eletrônica do estado fundamental (0) para o estado excitado (i).

Rosenfeld, 1928, calculou R_{0a} conhecendo a assimetria e as funções de onda dos estados fundamental ψ_0 e excitado ψ_i de uma molécula. O resultado obtido foi:

$$R_{0i} = \text{Im}\{\mu_{0i} \cdot \mathbf{m}_{0i}\} \quad (2.53)$$

sendo $\mu_{0i} = \langle \psi_0 | \mu | \psi_i \rangle$ e $\mathbf{m}_{0i} = \langle \psi_0 | \mathbf{m} | \psi_i \rangle$, onde μ é o operador dipolo elétrico e \mathbf{m} é o operador dipolo magnético.

Do ponto de vista clássico

$$\mathbf{m} = \frac{e}{2mc} (\mathbf{r} \times \mathbf{p}) \quad (2.54)$$

e e m são carga e massa do elétron, $\mathbf{r} \times \mathbf{p}$ é o momento orbital angular do elétron, sendo \mathbf{p} (momento linear do elétron) um operador complexo, c a velocidade da luz. De fato, R_{0i} é um número real, pois representa uma quantidade fisicamente observável.

A característica crítica de R_{0i} é o produto escalar (Equação (2.53)). Isto significa que para uma molécula possuir atividade óptica, $\langle \psi_0 | \mathbf{m} | \psi_i \rangle$ precisa ter uma componente paralela ao $\langle \psi_0 | \mu | \psi_i \rangle$. Portanto, a luz precisa induzir uma circulação helicoidal da carga ao redor da direção $\langle \psi_0 | \mu | \psi_i \rangle$ e a condição para isto ocorrer é que a molécula deve ser assimétrica.

Tal assimetria pode ser observada em moléculas como hexahélice e α -hélice em proteínas, sendo esta última um caso excepcional, que resulta em altos valores de R_{0i} .

Cálculos do “rotational strength”, R_{0i} , estudos de como ele pode ser gerado e discussões mais aprofundadas sobre este assunto são encontrados no

⁶ Análogo ao “dipole strength” $D = \mu_{0i} \cdot \mu_{0i}$ (Cantor.e Schimmel, 1980.) que é usado como medida de absorção.

artigo de Woody, 1996, no qual também é apresentada uma extensa bibliografia sobre os princípios físicos do CD.

2.1.2 CD Aplicado ao Estudo de Proteínas e Polipeptídeos

Na região de comprimentos de onda entre 185 nm a 250 nm, que na nomenclatura usual é chamada de *UV distante*, o especreo de CD é devido principalmente às transições eletrônicas do grupamento amida da ligação peptídica (Figura 2.10).

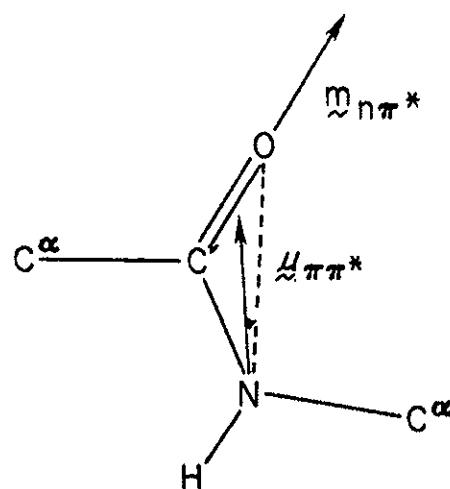


Figura 2.10 Momento de dipolo elétrico da transição amida $\pi\pi^*$ ($\mu_{\pi\pi^*}$) e momento de dipolo magnético da transição amida $n\pi^*$ ($m_{n\pi^*}$). (Adaptada de Woody, 1993).

Para proteínas globulares o espectro típico de α -hélice (Figura 2.11a) apresenta uma banda de absorção negativa em 208 nm e uma banda de absorção positiva em 190 nm atribuída à absorção do tipo $\pi - \pi^*$. Segundo a predição de Moffitt, (1956), a banda de absorção em 208 nm seria devido à componente da luz polarizada estar incidindo ao longo do eixo da hélice e em 190 nm estar perpendicular ao eixo da hélice. Já, a banda negativa

observada em comprimentos de onda mais longo, com o máximo em 222 nm seria atribuída à transição do tipo $n - \pi^*$, baseada em cálculos realizados por Schellman e Oriel, (1962) e Woody e Tinoco, (1967). Alguns trabalhos também mostram que a intensidade do espectro de CD depende do comprimento da cadeia (Woody e Tinoco, 1967; Chen, 1974). Todas estas interpretações estão sujeitas a muita controvérsia. Há na literatura várias teorias e métodos sendo aplicados no sentido de compreender e interpretar estes espectros de CD (Woody e Tinoco, 1967; Bayley *et al.*, 1969; Loxsom *et al.*, 1971; Yamaoka *et al.*, 1986).

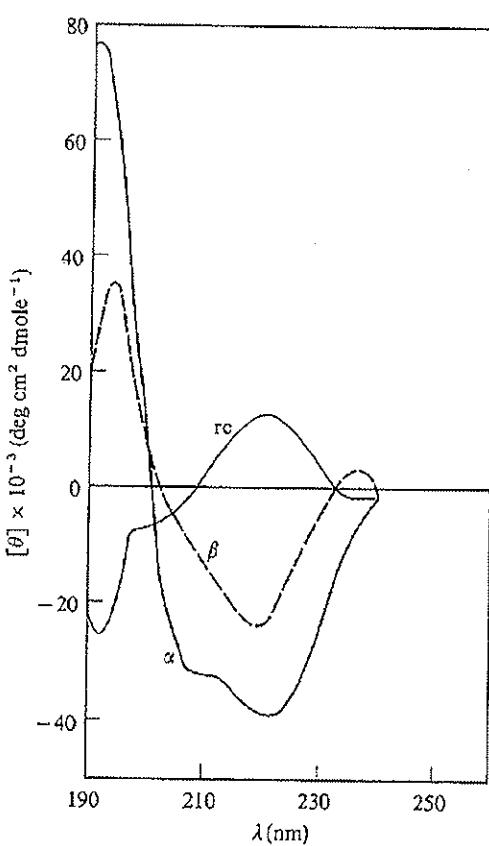


Figura 2.11 Espectros de CD das conformações (α) α - hélice, (β) folha- β e (rc) não ordenada - *random coil*, extraídas de espectros de proteínas com a estrutura tri-dimensional conhecida (Saxena e Wetlaufer, 1971).

O espectro de CD de estrutura secundária tipo folha β pregueada (β -sheet) pode ser observada também na Figura 2.11b. A banda negativa próximo de 215 nm é atribuída à transição $n - \pi^*$, enquanto as bandas positiva próximo de 198 nm e negativa próximo de 175 nm, são atribuídas às componentes de excitação $\pi - \pi^*$. Nos trabalhos de Pysh, 1966, Woody, 1969 e Madson e Schellman, 1972, é predito que a transição $n - \pi^*$ apresenta $R_{0\alpha}$ negativo tanto em folha - β pregueada do tipo anti-paralela como em folha - β pregueada do tipo paralela⁷, ou seja, estes dois tipos de folha - β pregueada apresentam espectros de CD similares, entretanto, nenhuma evidência experimental tem sido publicada até o momento.

Polipeptídeos com cadeias não ordenadas, isto é, que apresentam conformação ao acaso geralmente mostram uma forte banda negativa próximo de 198-200 nm e uma fraca banda ao redor de 220 nm, que pode ser positiva ou negativa. Experimentalmente, a magnitude da banda em 200 nm pode variar com o polipeptídeo estudado e condições experimentais. Espectro de CD de polipeptídeos não ordenados também pode ser observado na Figura 2.11c).

Uma outra estrutura muito observada em peptídeos e proteínas é a β -turn (β -bend ou reverse turn) (Voet e Voet, 1995) a qual tem muitos tipos (Venkatachalam, 1968). Na Figura 2.12 estão apresentados os dois tipos de β -turn mais freqüentes. O tipo I de β -turn lembra, qualitativamente, o espectro de uma α -hélice na região de comprimento de onda longo, entretanto a banda em comprimento de onda curto é bastante fraca. O tipo II apresenta um espectro similar ao espectro de folha - β pregueada, apenas deslocada para o vermelho em 5 a 10 nm. Usando o método de matriz desenvolvido por Bayley *et al.*, (1969), Woody (1974) fez as predições dos espectros de CD

⁷ Detalhes destes tipos de estruturas estão bem apresentados no cap. 7 e seção 7 do livro de Voet e Voet, 1995.

para uma variedade de estruturas do tipo β -turn. Destes estudos, somente o espectro da estrutura β -turn do tipo II (que lembra o espectro folha - β) é que ficou bem identificada.

Na região de comprimento de onda 240 a 320 nm, normalmente chamada de UV *próximo*, as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina e triptofano) apresentam bandas de absorção no espectro de CD e podem dar informações, de forma empírica, sobre alterações na estrutura terciária de uma proteína (Strickland, 1974).

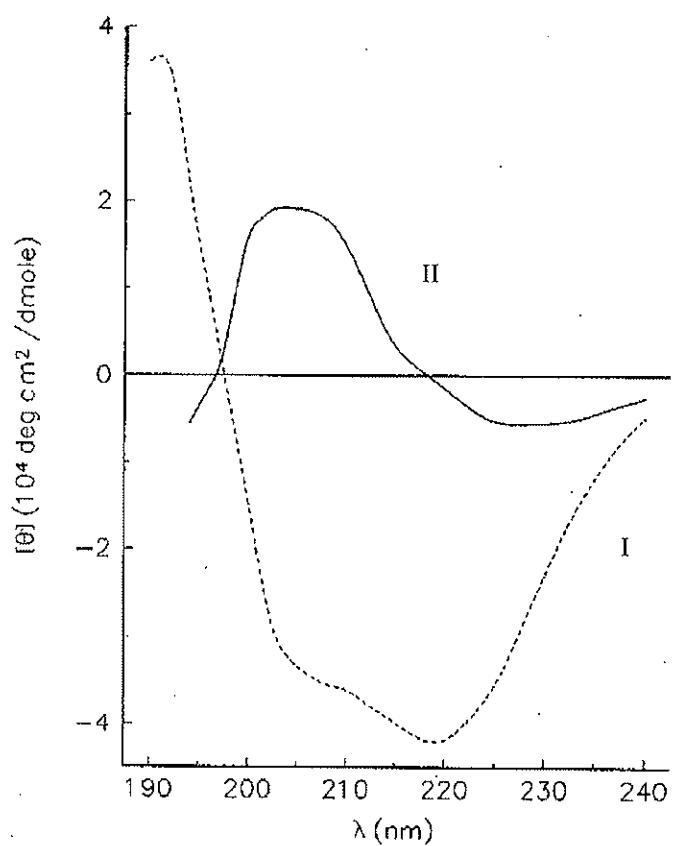


Figura 2.12 Espectros de CD de β -turns (dobras - β) (Bandekar *et al.*, 1982). (—) tipo I, β -turn, ciclo (L-Ala-L-Ala-Aca) (Aca é o ϵ -aminocaproila); (...) tipo II, β -turn, ciclo(L-Ala-D-Ala-Aca). T = 22°C. (Adaptada de Woody, 1985).

A estimativa de cada estrutura secundária de proteínas dentro do espectro de CD ainda permanece uma tarefa empírica apesar dos muitos métodos de análises propostos, desde os mais simples aos mais sofisticados. A relação entre estrutura secundária de proteína e correspondente espectro de CD tem sido discutida em muitos trabalhos de revisão (Adler *et al.*, 1973; Woody, 1985, 1992; Johnson, 1985, 1988, 1990; Yang *et al.*, 1986; Venyaminov e Yang, 1996).

Todos estes métodos têm como base algumas suposições em comum: a estrutura tri-dimensional de proteínas de referência (banco de dados) cristalizadas e obtidas por raios-X e conservadas em solução aquosa; o efeito da estrutura terciária sobre o espectro é negligenciada; somente peptídeos cromóforos de proteínas são responsáveis pelo espectro de CD na região de UV - *distante*; é negligenciado também o efeito de variabilidade geométrica da estrutura secundária.

De forma geral, levando em conta todas as suposições citadas acima, a conformação de cada estrutura secundária dentro do espectro de CD pode ser estimada com base em espectros de CD obtidos de peptídeos modelos (Greenfield e Fasman, 1969; Brahms e Brahms, 1980) e de proteínas com estrutura tri-dimensional conhecida (Chen *et al.*, 1972, 1978; Bolotina e Lugauskas, 1985). Outros métodos podem ser vistos com detalhes e referências no trabalho de Venyaminov e Yang, (1996).

Peczel *et al.*, (1991) desenvolveram um algoritmo conhecido como *convex constraint analysis* (CCA) para cálculos de espectros de CD, independentes dos dados de raios-X. Este método foi aplicado por Park *et al.*, (1992) para análise de espectros de 30 proteínas de membrana os quais foram deconvoluídos e pôde-se distinguir a α -hélice transmembranar de hélices de proteínas globulares. O espectro da α -hélice transmembranar foi caracterizado por uma banda positiva deslocada para o vermelho entre 195 e

200 nm e uma banda negativa em 208 nm e outra em 222nm. A intensidade foi sempre maior para a α -hélice transmembranar do que as obtidas para hélices de proteínas globulares (Chem *et al.*, 1974; Chou e Fasman, 1974).

É muito comum observar nos espectros de proteínas de membranas distorções na forma, intensidade e/ou posição das bandas de CD (Urry e Long, 1980). Estas distorções podem ser causadas por artefatos ópticos de espalhamento diferencial de luz e achatamento diferencial de absorção. Duysens, (1956) e Mao e Wallace (1984) mostraram que a extensão desse achatamento é função do tamanho das partículas bem como da concentração dos cromóforos na partícula. Uma excelente revisão sobre este assunto está no trabalho de Fasman, (1996).

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os peptídeos melanotrópicos estudados: α -MSH (hormônio estimulante do melanócito) e o análogo MSH-I (Figura 1.4) foram comprados da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

Os fosfolipídios utilizados na preparação das membranas, DMPG (1,2-dimiristoil fosfatidil glicerol) e DMPC (1,2-dimiristoil fosfatidil colina) (Figura 1.2), foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). O detergente SDS (dodecil sulfato de sódio.) utilizados na preparação das micelas foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Os marcadores 5-, 7-, 9- e 12-SASL (marcador de spin 5-, 7-, 9- e 12-4,4-dimetil-3-oxazolidiniloxi] ácido esteárico) e o marcador de spin CSL (.3-doxil colestano) foram comprados da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) ou doados por A. Watts, da Universidade de Oxford, UK. Os marcadores de spin fosfolipídicos 5- e 12- PCSL (1-palmitoil-2-[5- ou 12- doxil estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina]) foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). O SSL (N-2',2',6',6' - tetrametilpiperidina-1' - oxil-estearamida) foi cedido pela Profª. S. Schreier do Laboratório de Bioquímica - Instituto de Química, da Universidade de São Paulo.- SP. Estes marcadores estão apresentados na Figura 2.1.

O Tampão usado nos experimentos de RPE foi o Hepes (4-[2-hidroxietil]-1-ácido piperizine-etano sulfônico) 10mM em pH 7.4. Para os experimentos com CD foi utilizado o tampão Fosfato 5mM, pH 7.4. Nos experimentos com

variação da força iônica foram acrescentadas diferentes alíquotas de NaCl até as concentrações finais desejadas.

Todas as substâncias empregadas neste trabalho não passaram por qualquer processo de purificação posterior à sua aquisição.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de amostras para medidas de RPE

As membranas usadas nos experimentos de RPE foram dispersões multilamelares (LMV) (Figura 1.4) de lipídios preparadas da seguinte forma: uma mistura de lipídios (DMPG ou DMPC) e marcadores de spin (no máximo 1 mol %) em clorofórmio foi evaporada com fluxo de nitrogênio e em seguida deixada sob pressão reduzida (0.1 mmHg) por pelo menos 5 horas, para evaporação do solvente orgânico residual. As vesículas multilamelares são obtidas pela adição da solução tampão, sem ou com peptídeos melanotrópicos, seguida de vigorosa agitação (em *vortex* por 5 a 10 min). Nos experimentos com variação da força iônica o sal foi acrescentado ao tampão na quantidade desejada.

3.2.2 Preparação de amostras para CD

Nos experimentos com dicroísmo circular, CD, foram utilizadas membranas unilamelares pequenas (SUV). Estas vesículas foram obtidas a partir de vesículas unilamelares grandes (LUV), preparadas pelo método de extrusão (Hope *et al.*, 1985), submetidas ao ultrasom. Por efeito das vibrações ultrasônicas, as membranas se reorganizam obtendo-se vesículas de tamanhos cada vez menores.

Para a sonicação de ponta foi utilizada freqüência nominal de aproximadamente 20 kHz. As amostras foram colocadas em tubo o qual ficava mergulhado em banho de água aquecida ($\sim 30^\circ\text{C}$, para estar com membranas na fase líquido-cristalina) e a ponta imersa à meia altura para obter a máxima cavitação. A sonicação foi feita em ciclos alternados de 30 s (agitação/reposo), para evitar superaquecimento da amostra. O tempo total de sonicação até a translucidez da amostra (Sheetz e Chan, 1972) foi de 5 a 8 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 1000 g (5 minutos) para retirada de resíduos de titânio provenientes da ponta do sonicador. Desta forma, SUV com tamanhos entre 200 e 500 Å foram formadas, e uma preparação opticamente clara foi obtida, o que resulta em um espalhamento de luz mínimo. Resultados semelhantes foram obtidos com preparações utilizando ultrasom de banho.

Para a preparação das amostras contendo peptídeo, alíquota deste era adicionada, junto com o tampão, ao filme de lipídio e agitadas vigorosamente (em *vortex*) para a obtenção das vesículas multilamelares. Após a preparação das vesículas unilamelares grandes, LUV, pelo método de extrusão, seguia-se a sonicação, como descrito acima.

Para as medidas de CD também foram utilizadas micelas diretas de SDS, as quais foram preparadas a partir de determinada quantidade de detergente seco, sendo adicionado tampão com ou sem peptídeo melanotrópico, seguindo-se a agitação (em *vortex* por 5 a 10 min).

3.2.3 Medidas de ressonância paramagnética eletrônica

As medidas foram realizadas no Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica ER200D - SRC da Bruker¹, interfaceado com um computador IBM para digitalização dos espectros e com um aparelho Bruker B-

ST 100/700 para controlar a temperatura da amostra ou no espetrômetro EMX da Bruker , que neste caso a temperatura da amostra foi controlada, pelo aparelho BVT-2000 da Bruker (*Eurotherm*). A temperatura na amostra foi sempre verificada com um termopar Fluke 51 K/J. A amplitude de modulação do sinal usada foi 0,8 G e a potência da microonda de 10 mW.

Celas de quartzo, para amostras líquidas, com capacidade de 0,1 ml foram utilizada.

Os marcadores de spin derivados do ácido esteárico apresentam uma pequena partição em solução (principalmente o 12-SASL), portanto, os espectros mostrados nas figuras deste trabalho foram obtidos subtraindo do espectro composto (sinal na água mais sinal na fase lipídica) o espectro do marcador livre em solução, restando apenas o espectro do marcador na fase lipídica. Estas subtrações foram feitas usando o programa EPRANALA (J. Rowntree, P.Fajer e B. Bennet, da Universidade de Oxford - Inglaterra).

Para as medidas dos parâmetros espectrais foi utilizado o programa ORIGIN (Microcal Software, Inc., MA, USA).

Todas as medidas apresentadas foram refeitas no mínimo três vezes. Assim, cada resultado apresentado é sempre o valor médio destas várias medidas experimentais com o seu respectivo desvio padrão médio, ou seja o erro médio, o que possibilitou uma análise da reproduzibilidade dos resultados. É importante salientar que nos gráficos apresentados, os pontos nos quais não aparecem a barra de erro é devido a estas serem do tamanho do símbolo.

3.2.3.1 Determinação do coeficiente de partição, K_p , dos peptídeos entre membrana de DMPG e água, por RPE

O coeficiente de partição de um soluto s é definido como:

¹ Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo SP.

$$K_p = \frac{n_M(s)/V_M}{n_{H_2O}(s)/V_{H_2O}} \quad (3.1)$$

onde n é o número de moles do soluto e V é o volume da fase; M e H_2O correspondem à fase apolar (que no presente trabalho é a membrana de DMPG) e polar (aquosa), sendo que o número de moles total do soluto é

$$n_T = n_M + n_{H_2O} \quad . \quad (3.2)$$

A determinação do coeficiente de partição, K_p , foi obtida por método espectroscópico. Este procedimento é aplicável a qualquer técnica que proporciona um parâmetro ou *efeito* quantitativo da membrana (ou de um marcador totalmente incorporado) que seja modificado pela partição do soluto (s) na mesma membrana. É assumido que a magnitude deste *efeito* seja somente determinada pela concentração na membrana, n_M/V_M . A partir de curvas de *efeito* vs. número total de moles de soluto (s) para diferentes volumes de membrana (V_M) é possível traçar uma reta, com o número total de moles necessário para causar um mesmo efeito, para o qual a relação n_M/V_M é a mesma em todos os casos; assim, a concentração molar é

$$\frac{n_M(s)_a}{V_{M_a}} = \frac{n_M(s)_b}{V_{M_b}} = C_M(s) \quad (\text{para um mesmo efeito}). \quad (3.3)$$

Substituindo as equações (3.2) e (3.3) na equação (3.1), obtém-se:

$$n_T = \frac{C_M \cdot V_{H_2O}}{K_p} + C_M V_M \quad (3.4)$$

e portanto,

$$K_p = \frac{\text{Inclinação}}{\text{intercepto}} \cdot V_{H_2O} . \quad (3.5)$$

Assim, é possível determinar o coeficiente de partição, K_p , pela razão inclinação/intercepto dessa reta (Lissi *et al.*, 1990).

As medidas de RPE para determinação de K_p foram realizadas em duas temperaturas, 30 e 35 °C (os resultados obtidos nas duas temperaturas foram similares, portanto, optamos por apresentar os resultados obtidos em apenas uma das temperaturas, que foi de 35°C). O parâmetro utilizado foi o desdobramento hiperfino máximo, A_{\max} , (detalhes deste parâmetro estão discutidos no capítulo de Técnicas sub-ítem 2.1.2.1). A adição dos peptídeos melanotrópicos às membranas de DMPG, preparadas como descrita anteriormente, causou o aumento de A_{\max} , indicando um aumento da ordem e/ou diminuição do movimento. Gráficos da variação de A_{\max} vs. n_T (número total de moles) dos peptídeos para diferentes volumes de membrana (Figura 4.18 no capítulo de Resultados e Discussões) permitiram a medida do coeficiente de partição K_p .

3.2.4 Medidas de dicroísmo circular

Os espectros foram obtidos nos spectropolarímetros Jasco J-720² e CD6 Jobin Yvon³, com celas de quartzo de 1 mm de caminho óptico na temperatura de 35°C. A linha de base dos espectros foram corrigidas usando espectros de referência apropriados, tampão ou suspensão de vesículas.

Para verificar a reprodutibilidade dos espectros foram feitas três preparações da mesma amostra. Para cada amostra, cinco espectros foram

² Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo - São Carlos

³ Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - SP.

acumulados e o espectro final apresentado foi o médio de todas as medidas. Os espectros foram obtidos no intervalo de 185 a 260 nm e estão expressos como elipticidade residual média $[\theta]$, em (grau $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$).

4. Resultados e Discussões

No capítulo de Introdução citamos algumas questões consideradas relevantes quando se estuda a interação de peptídeos ou proteínas com membranas lipídicas, e que sintetizam os objetivos deste nosso trabalho. É evidente que no decorrer da pesquisa outras questões surgiram, muitas delas relacionadas às técnicas empregadas e aos métodos de análise. Além disso, foi sempre nossa preocupação comparar os efeitos dos dois peptídeos estudados, procurando relacioná-los aos seus diferentes efeitos biológicos, já conhecidos na literatura.

Empregamos a técnica de RPE com uso de marcadores de spin intercalados nas membranas lipídicas com objetivo de responder às questões relacionadas à fase lipídica, que correspondem à primeira parte dos resultados. Por outro lado, para observarmos possíveis modificações estruturais dos peptídeos quando na presença de bicamadas lipídicas, micelas e de um solvente indutor de α -hélice (2,2,2-trifluoroetanol - TFE), utilizamos a espectroscopia de dicroísmo circular, CD, cujos resultados e discussões estão na segunda parte deste capítulo.

4.1 Medidas com RPE

4.1.1 Efeitos dos peptídeos sobre a fluidez da bicamada, observados por marcadores fosfolipídicos e derivados de ácido esteárico

A Figura 4.1 mostra os espectros dos marcadores de spin derivados de ácido esteárico (SASL) e de fosfatidilcolina (PCSL), marcados na 5^a. (5-SASL e 5-PCSL) e 12^a. (12-SASL e 12-PCSL) posições da cadeia hidrocarbonada, incorporados em membranas lipídicas aniónicas de DMPG, na presença e ausência dos peptídeos melanotrópicos. Os espectros mostrados nesta figura foram obtidos acima da temperatura de transição de fase gel - líquido cristal do DMPG ($T_c \sim 20^\circ\text{C}$) (Riske *et al.*, 1997). Observa-se que para ambas as posições do grupo doxil o espectro de RPE é sensível à presença dos peptídeos catiônicos. Tanto o α -MSH como o MSH-I aumentam a anisotropia espectral, dando origem a espectros mais largos, apresentando desdobramentos hiperfinos maiores do que os obtidos com vesículas de DMPG puro, indicando com isso uma redução da mobilidade das cadeias acila e/ou aumento da ordem, das duas espécies de marcadores de spin (SASL e PCSL), na presença dos peptídeos (Griffith and Jost 1976).

O efeito dos peptídeos sobre as propriedades dinâmica e estrutural (fluidez) das bicamadas de DMPG foi quantificado medindo-se o desdobramento hiperfino máximo, A_{\max} (detalhe na Figura 4.1). Este parâmetro, como discutido no Capítulo 2, é sensível tanto à amplitude como à velocidade de movimento das cadeias acila dos marcadores de spin (Marsh 1981 e referências). Significa que quando o A_{\max} cresce, a micro-região observada pelo marcador de spin torna-se mais organizada e/ou menos móvel.

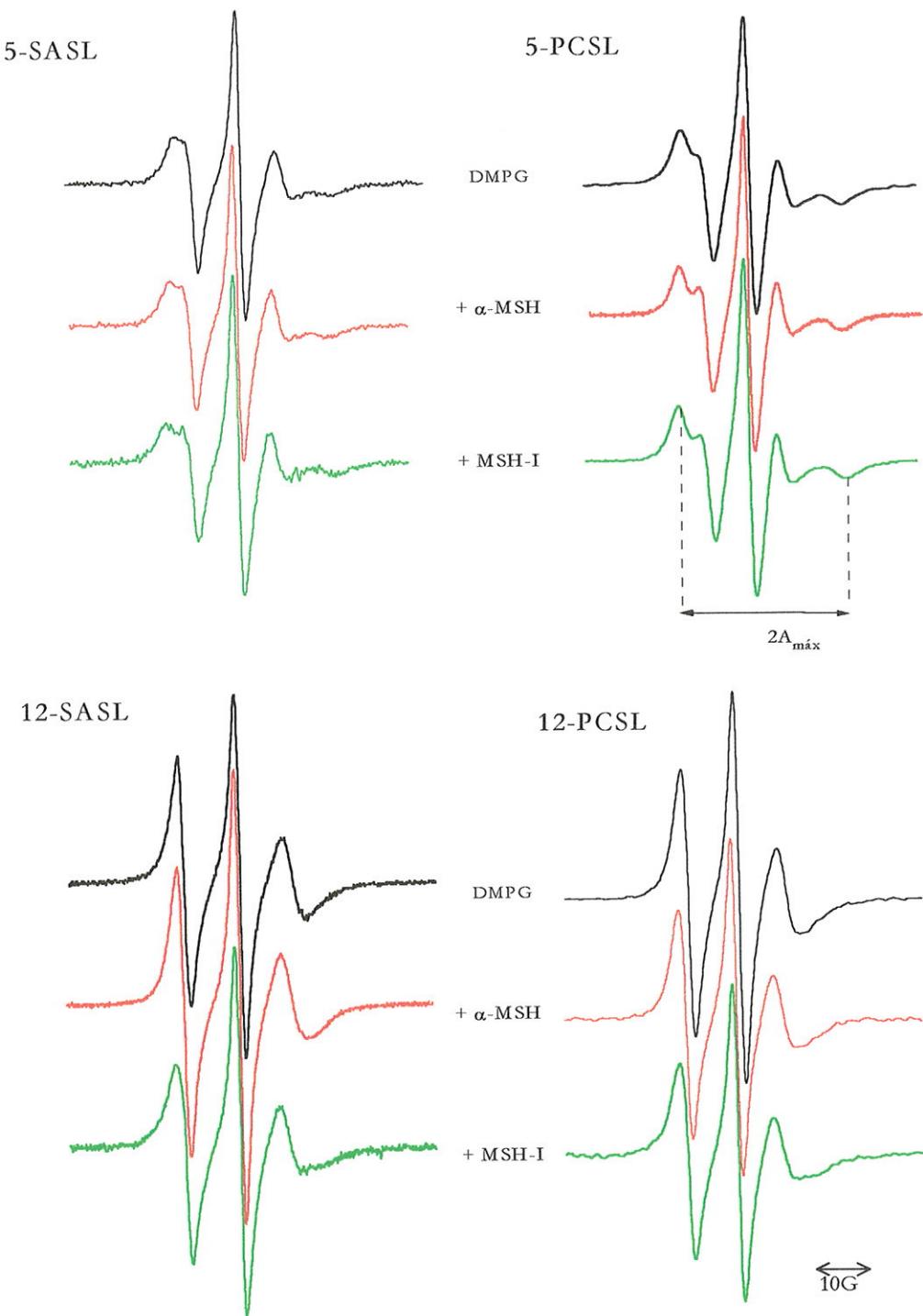


Figura 4.1 Espectros de RPE de 5 - e 12 - SASL e do 5 - e 12 - PCSL incorporados em membranas de DMPG na ausência e presença de 10 mol% de peptídeo. T = 35°C.

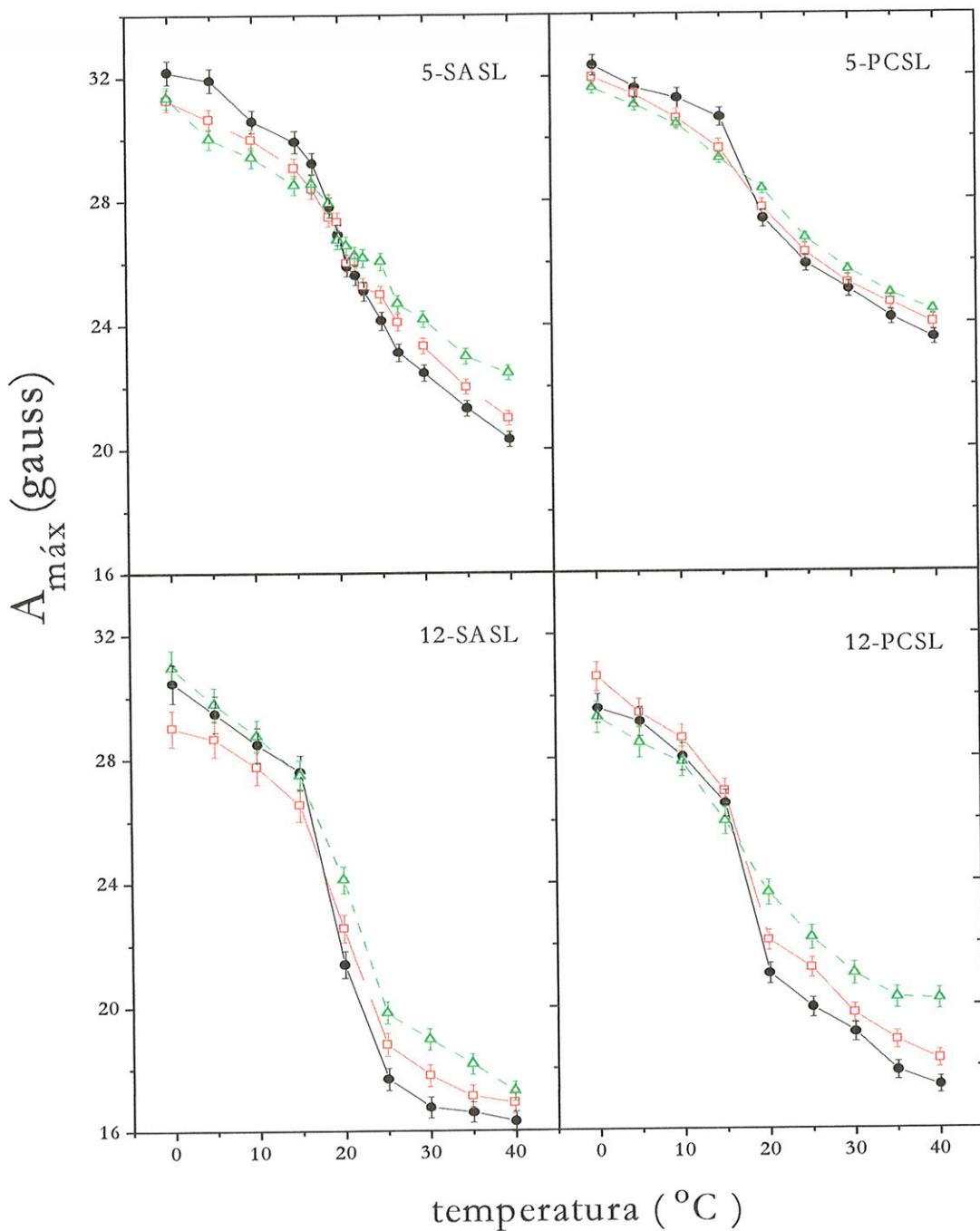


Figura 4.2 - Variação do desdobramento hiperfino máximo ($A_{\text{máx}}$) em função da temperatura dos marcadores de spin incorporados em membranas de DMPG na presença de 0, (\bullet), 10 mol % de α -MSH (\square) e MSH-I (Δ).

A Figura 4.2 mostra a dependência com a temperatura do parâmetro $A_{\text{máx}}$, dos diferentes marcadores de spin incorporados às membranas de DMPG na presença e na ausência dos peptídeos. Analisando esta figura, observa-se que acima da temperatura de transição de fase gel - líquido cristal ambos os peptídeos aumentam os valores de $A_{\text{máx}}$ tanto dos marcadores que possuem o grupo doxil próximo da cabeça polar (5-SASL e 5-PCSL) como os que estão mais fundo na bicamada (12-SASL e 12-PCSL). Nota-se que o análogo MSH-I é mais eficiente em restringir a mobilidade das cadeias acilas do que o hormônio natural. Este resultado poderia estar relacionado com uma maior constante de associação do análogo em relação ao hormônio natural (Ito *et al.* 1993), ou poderia ser atribuído a uma maior profundidade de penetração do análogo na bicamada, ou ainda a ambos os efeitos. Voltaremos a essa discussão mais adiante. Abaixo da T_c o efeito dos peptídeos é bastante confuso, e não será discutido no presente trabalho.

Nota-se que o efeito dos peptídeos sobre as membranas de DMPG é observado tanto pelos marcadores derivados de ácido esteárico como os fosfolipídicos.

Na Figura 4.2 ainda pode-se observar que a transição de fase das bicamadas de DMPG é alargada quando na presença dos peptídeos, com efeito mais pronunciado do MSH-I. Outras moléculas polares, tais como os carotenóides (Subczynski, *et al.*, 1993) e colesterol (Pasenkiewicz-Gierula, 1990), que estão totalmente inseridas na bicamada lipídica, apresentam efeito similar.

Fica evidente na Figura 4.2 o pequeno efeito observado pelo marcador 5-PCSL quando monitorando a interação dos peptídeos com a bicamada. Uma possível explicação, seria o fato deste marcador observar uma micro-região da bicamada (próxima à cabeça polar) que apresenta pouca variação da fluidez e/ou também devido ao seu espectro de RPE ser pouco sensível às pequenas variações.

Comparação entre os marcadores 5-PCSL e 5-SASL

A diferença dos efeitos observados com marcadores derivados de ácido esteárico quando comparados aos equivalentes marcadores fosfolipídicos (Figura 4.2), principalmente entre o 5-PCSL e o 5-SASL, pode provavelmente ser atribuída às suas posições diferentes na bicamada lipídica. Devido à superfície da membrana de DMPG estar carregada negativamente, os marcadores derivados de ácido esteárico estariam principalmente protonados em pH 7.4 ($pK_a \geq 8.0$, Ptak *et al.* 1980) e neste caso penetrariam mais profundamente na bicamada. Isto está de acordo com os valores mais baixos de $A_{máx}$ obtidos com 5-SASL e 12-SASL quando comparados aos obtidos com 5-PCSL e 12-PCSL, respectivamente (principalmente acima da T_c).

Num estudo paralelo, e com objetivo de mostrar as posições relativas na bicamada destes dois tipos de marcadores (esteáricos e fosfolipídicos), em função da carga na superfície, os marcadores, 5-SASL e 5-PCSL, foram incorporados também em vesículas de DMPC (neutra). Nestas membranas neutras é esperado que o ácido esteárico esteja principalmente desprotonado em pH 7,4 ($pK_a \approx 6,5$, Ptak *et al.* 1980). Assim, os SASL carregados, incorporados em DMPC estariam em uma posição mais próxima da superfície do que quando em vesículas de DMPG. Por outro lado, a posição dos PCSL não seria modificada pelas cargas na superfície das membranas. De acordo com estas suposições, a Figura 4.3 mostra que os valores de $A_{máx}$ do 5-SASL e 5-PCSL em DMPC são muito similares e também semelhantes aos obtidos com 5-PCSL em DMPG, enquanto que o 5-SASL em vesículas de DMPG apresenta valores menores para o $A_{máx}$. Se for assumido que as bicamadas de DMPC e DMPG apresentam empacotamentos similares¹, estes resultados indicam que o 5-PCSL tanto em DMPG como em

¹ Esta suposição é razoável uma vez que os dois lipídios, nas condições de pH e força iônica utilizadas aqui, têm temperatura de transição similar, apesar das áreas das cabeças polares serem ligeiramente diferentes (Pascher *et al.* 1992).

DMPC e o 5-SASL em DMPC estão localizados em profundidades similares, enquanto que o 5-SASL neutro em DMPG está mais fundo na bicamada, apresentando um valor de $A_{\text{máx}}$ menor.

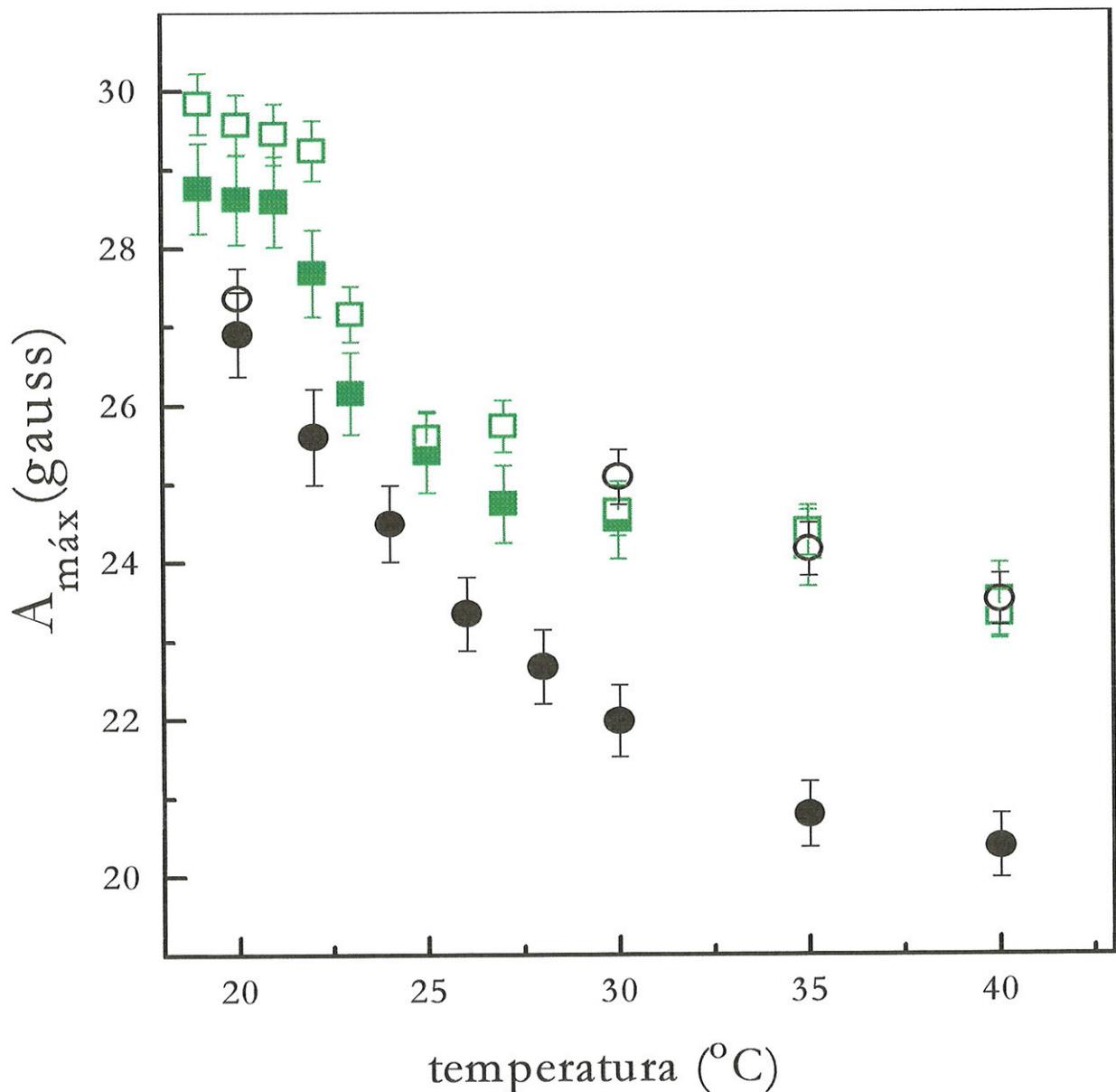


Figura 4.3 - Dependência com a temperatura dos valores de $A_{\text{máx}}$ do 5-SASL (símbolos fechados) e do 5-PCSL (símbolos abertos) em membranas de DMPC (■ e □) e DMPG (● e ○).

Assim, é importante salientar que a diferença (o marcador de spin 5-SASL observa maior efeito dos peptídeos sobre a bicamada do que o 5-PCSL (ver Figura 4.2) observada pelos dois marcadores seria devido apenas à diferença de posição média ocupada pelos mesmos na bicamada (Godici e Landsberger, 1974; Ellena *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 1988), uma vez que os dois apresentam-se neutros em bicamadas de DMPG. Não estaria portanto, relacionada com interações eletrostáticas específicas entre os peptídeos e o marcadores n-SASL.

Modificações na fluidez da membrana observadas em diferentes profundidades da cadeia hidrocarbonada

A Figura 4.4 mostra os espectros, na fase fluida das bicamadas de DMPG, dos marcadores de spin derivados de ácido esteárico, *n*-SASL, com o grupo nitróxido localizado em várias posições (*n*) ao longo da cadeia acila na ausência e presença dos dois peptídeos melanotrópicos. Observe que a anisotropia axial dos espectros em DMPG puro diminui gradualmente com a posição na cadeia do grupo nitróxido, isto é, quanto mais próximo do grupo metil terminal menor a anisotropia, o que é característico do perfil de flexibilidade das cadeias em bicamadas lipídicas na fase fluida (Görrissen *et. al.*, 1986; Rottem *et al.*, 1970). Comparando os espectros obtidos na presença dos peptídeos com os obtidos na ausência dos mesmos, pode se ver ainda na Figura 4.4 que os peptídeos induzem uma certa restrição na mobilidade ao longo de todo comprimento da cadeia acila, como observado também na Figura 4.1.

A fluidez das micro-regiões da membrana foi quantificada medindo-se o desdobramento hiperfino máximo Λ_{\max} o qual, como já discutido anteriormente, contém contribuições tanto da amplitude como da velocidade de movimento das cadeias dos marcadores de spin (Marsh, 1981 e suas referências).

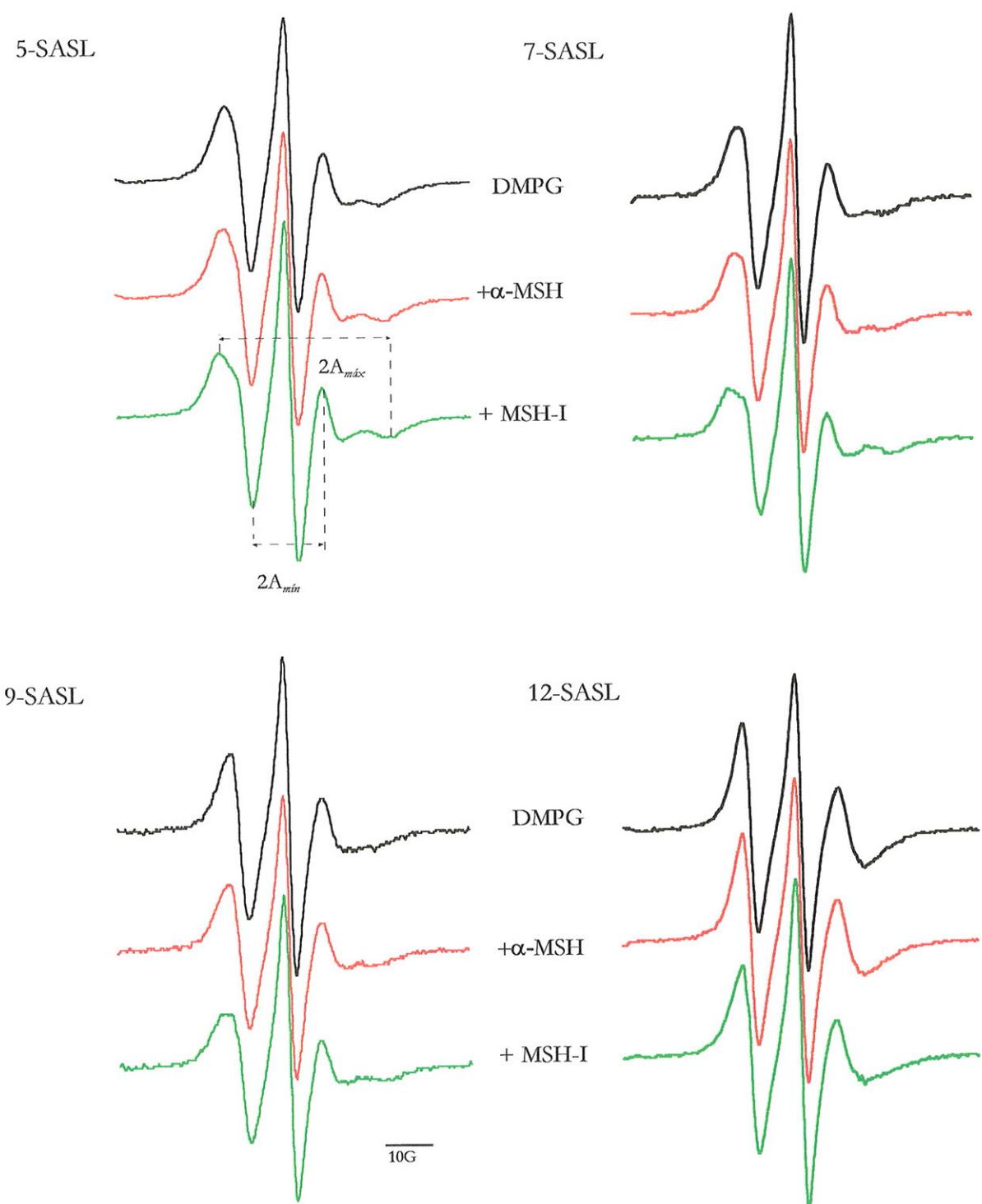


Figura 4.4 - Espectros de RPE dos marcadores de spin com o grupo nitroxido nas várias posições da cadeia acila, n-SASL, em vesículas de DMPG, na ausência e presença de 10 mol% de peptídeo. T = 40°C.

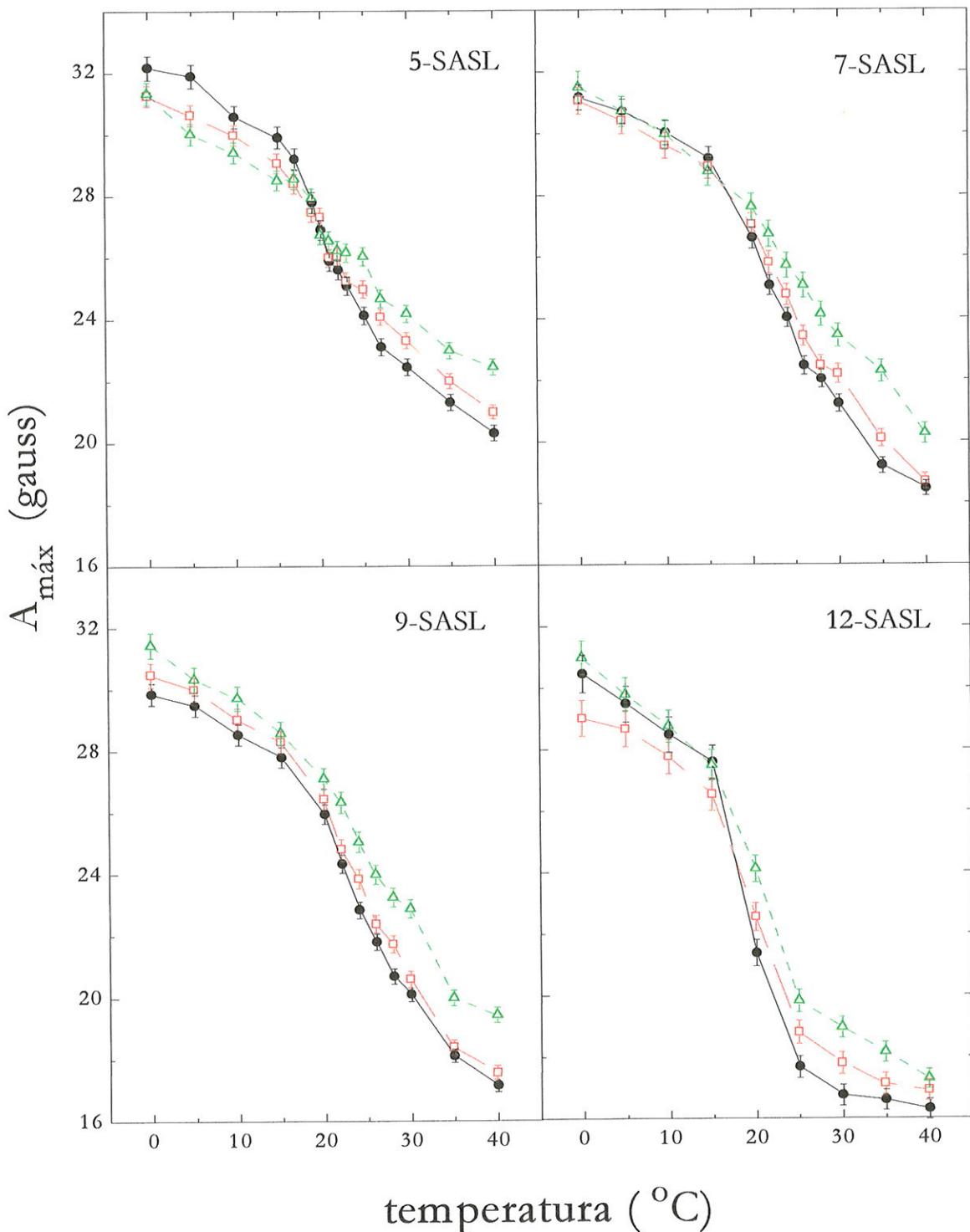


Figura 4.5 - Dependência com a temperatura do desdobramento hiperfino máximo, $A_{\text{máx}}$ dos marcadores de spin n-SASL incorporados em vesículas de DMPG na ausência de peptídeo (●), e na presença de 10 mol% do α -MSH (□) ou MSH-I (△).

A Figura 4.5 mostra a dependência com a temperatura de $A_{máx}$ dos n -SASL em membranas de DMPG com 0 e 10 mol% do α -MSH ou MSH-I. É observado claramente com os valores de $A_{máx}$, obtidos com estes diferentes marcadores incorporados em bicamadas de DMPG puro (símbolo cheio na Figura 4-6(a-d)) e acima da transição de fase deste lipídio, que quanto mais fundo na bicamada está o grupo nitróxido uma região com maior mobilidade é observada ($A_{máx}$ menor). Embora se saiba que existam certas flutuações verticais destes marcadores de spin, n -SASL, (Godici e Landsberger, 1974; Ellena *et al.*, 1988; Yin *et al.*, 1988), principalmente os que estão mais fundo na bicamada, o resultado apresentado indica que os marcadores monitoram, em média, diferentes profundidades no interior da membrana. Este resultado é consistente com outros resultados da literatura (Harris, J. *et al.*, 1983; Görriksen *et al.*, 1986 e Pérez-Gil, J. *et al.*, 1995).

Na fase gel destas membranas, os peptídeos α -MSH e MSH-I aumentam o movimento da cadeia acila do 5-SASL (como já observado anteriormente Figura 4.2) mas decresce o movimento do 9-SASL (Figura 4.5)². Nesta fase gel, o trabalho ainda necessita melhor compreensão.

Analizando ainda a Figura 4.5, acima da T_c , observa-se que quando o análogo MSH-I é adicionado às membranas de DMPG ocorre um significativo aumento no empacotamento das bicamadas, aumentando os valores de $A_{máx}$ de todos os marcadores, colocados ao longo da cadeia, com efeito maior nas posições C - 7 e C - 9. Nota-se que o hormônio nativo α -MSH também causa o mesmo efeito só que em menor proporção. Este efeito no empacotamento das bicamadas já havia sido observado na Figura 4.2.

² Com o 7 e 12 - SASL as modificações causadas, abaixo da T_c , pelos peptídeos são muito pequenas.

α -MSH e MSH-I provavelmente se localizam em profundidades diferentes na bicamada

O efeito dos peptídeos melanotrópicos nas diferentes profundidades da bicamada foi quantificado calculando o parâmetro de ordem efetivo - S_{ef} (ver cap.2, sub-item 2.1.2.1) dos espectros de RPE, obtidos acima da temperatura de transição de fase gel - cristal líquido, quando o movimento dos marcadores de spin é rápido em relação ao tempo de escala desta espectroscopia (tempo de correlação $\tau \approx 3 \times 10^{-9}$ s). No trabalho de Lange *et al.* (1985) foi mostrado que espectros similares a estes das Figuras 4.1 e 4.4 também possuem contribuições importantes de movimento molecular lento. Portanto, S_{ef} é um parâmetro similar ao A_{max} no sentido que possui contribuições tanto de ordem como de movimento, embora a contribuição principal do S_{ef} seja a amplitude do movimento segmentar da cadeia acila (Schindler e Seelig 1973). Ao contrário do A_{max} , o S_{ef} não é influenciado pela polaridade do meio em que está o marcador de spin, uma vez que a correção é feita (ver cap.2, sub-item 2.1.2.1).

A dependência do parâmetro de ordem, S_{ef} , com a posição do grupo nitróxido (n) ao longo da cadeia acila em bicamadas de DMPG é mostrada na Figura 4.6. Os valores de S_{ef} foram calculados em 30 °C, sendo que acima da T_c os valores obtidos foram similares. Observe que a variação do S_{ef} também indica que o análogo causa um forte efeito na bicamada quando comparado com a molécula nativa. É interessante notar que enquanto para o hormônio nativo α -MSH, os marcadores de spin com grupo nitróxido nas posições C-5, C-7 e C-9 da cadeia acila são mais sensíveis à interação peptídeo - lipídio, para o análogo MSH-I, é a posição C-9 a mais afetada. Este resultado pode estar indicando que o MSH-I penetra mais profundamente na bicamada do que o α -MSH. No entanto, é preciso ter cautela quanto a este resultado e conclusão, uma vez que este efeito maior observado pelo 9-SASL pode também estar relacionado com sua maior sensibilidade às mudanças de ordem e/ou mobilidade.

A maior profundidade de penetração do análogo MSH-I na parte central da membrana também tem sido sugerido pelo método da paralaxe, usando espectroscopia de fluorescência de estado estacionário (Macêdo *et al.*, 1996). Os autores usaram como supressores os mesmos marcadores de spin derivados de ácido esteárico usados aqui, e marcadores de spin derivados de fosfolipídios, marcados em diferentes posições da cadeia hidrocarbonada. Eles concluíram que o resíduo de Trp do análogo vai mais fundo na bicamada quando comparado com o mesmo resíduo da molécula nativa

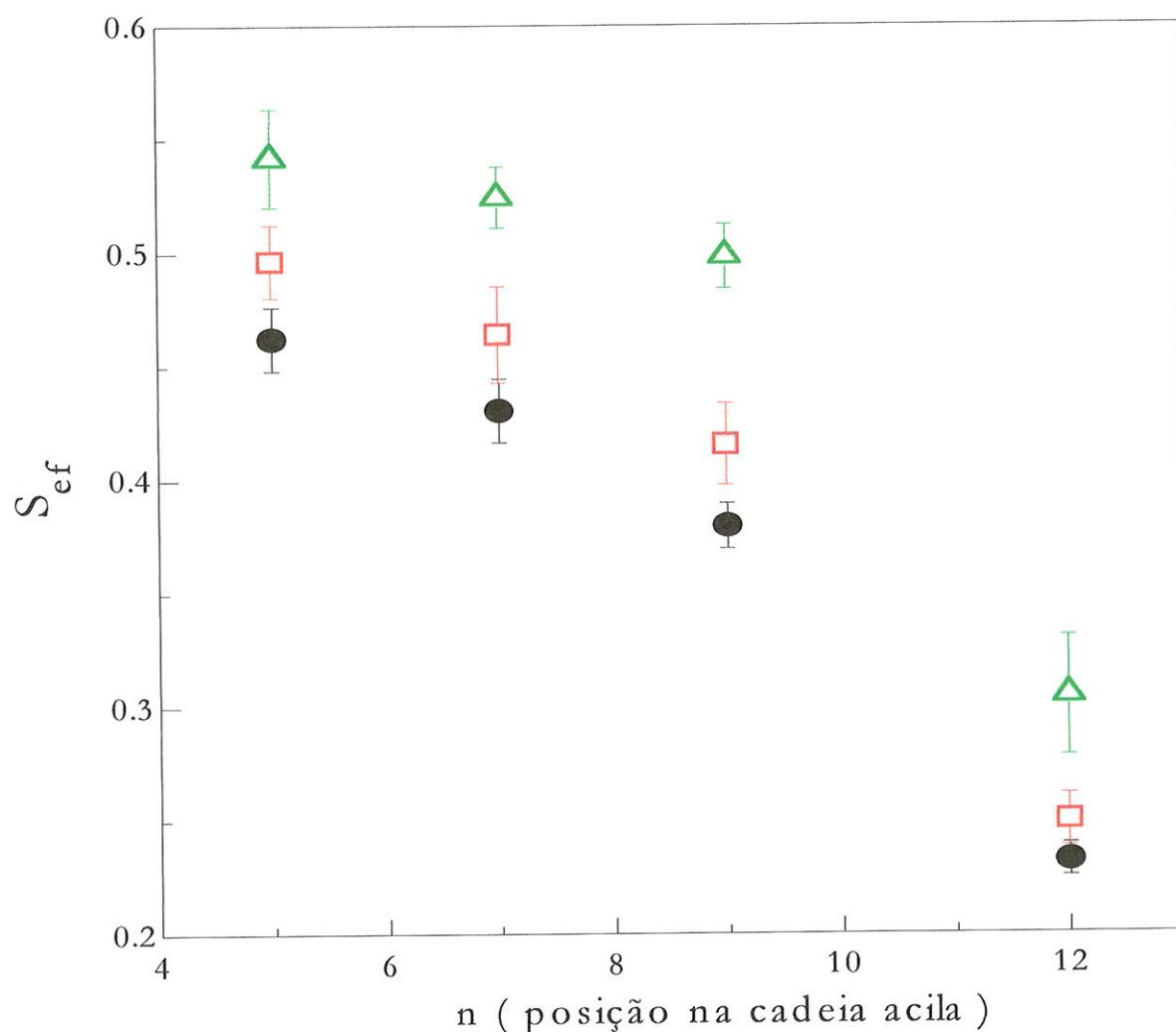


Figura 4.6 - Parâmetro de ordem efetivo, S_{ρ} , em função da posição n do grupo nitróxido dos marcadores de spin n-SASL em vesículas de DMPG na ausência de peptídeo (●), e na presença de 10 mol% do α -MSH (□) ou MSH-I (△). T = 30°C.

No entanto, não há uma correlação óbvia entre a exata profundidade de penetração de uma molécula no interior da bicamada e variação no espectro de RPE de um marcador de spin nitróxido em uma certa região da bicamada. Dependendo da ordem e/ou mobilidade do marcador, o espectro de RPE será mais ou menos sensível às mudanças na micro-região monitorada.

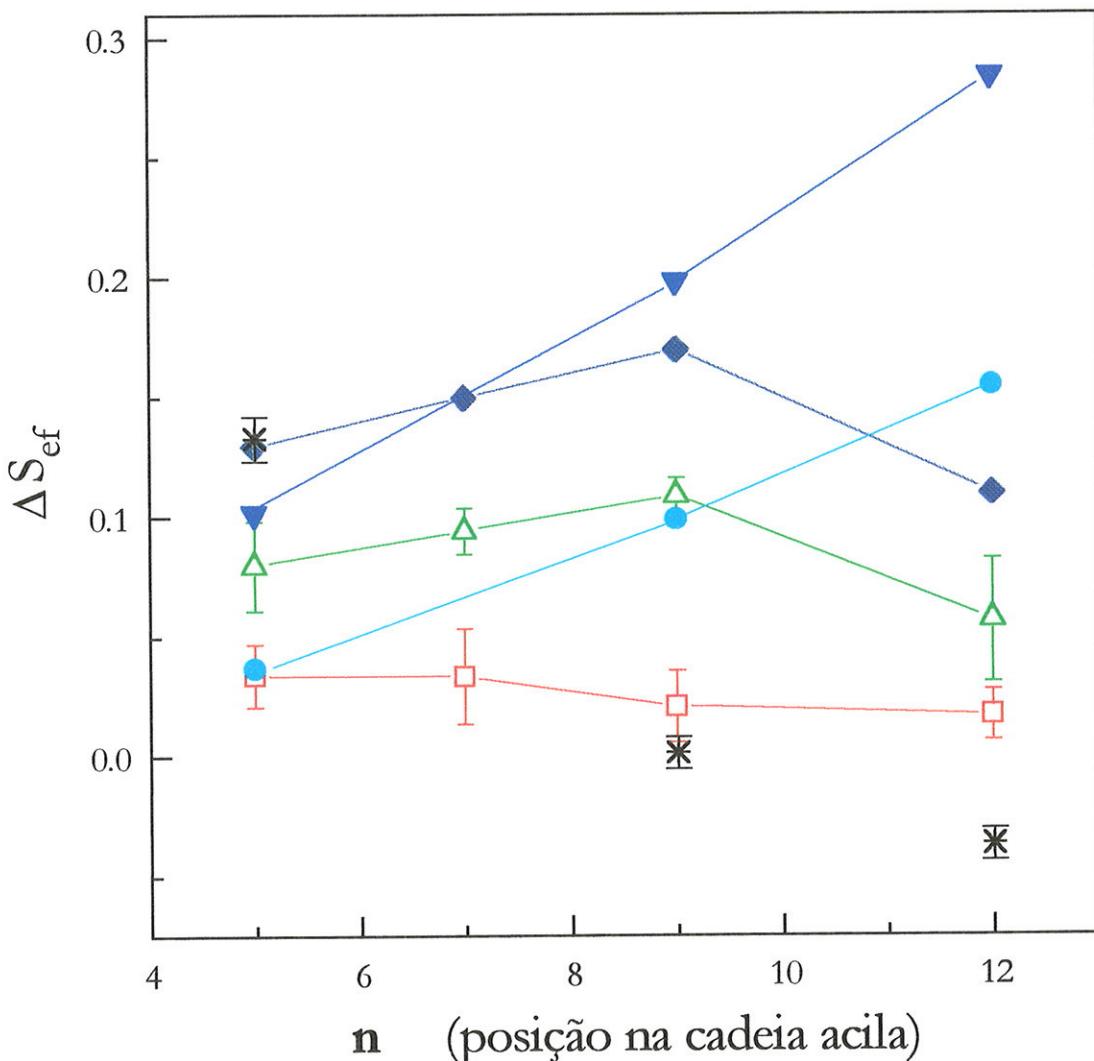


Figura 4.7- Perfis da variação de S_{eff} (relativo à bicamada de lipídio puro) dos SASL em função da posição do grupo nitróxido (n) ao longo da cadeia acila em vesículas de DMPG, na presença de 10 mol % de α -MSH (□) e MSH-I (△) e com 300 mM de NaCl (*). T = 30°C. Os perfis são comparados aos do Zeaxanthin (●) e colesterol (▽) calculado do trabalho de Subczynski *et al.*, 1992, e o da Apocitocromo *c* (◆) calculado do trabalho de Görriksen *et al.*, 1986.

Assim, para uma melhor análise dos dados aqui apresentados, foram medidas as variações do parâmetro de ordem efetivo ΔS_{ef} , relativo à bicamada com lipídio puro, dos marcadores de spin nas várias posições da bicamada lipídica, na presença dos peptídeos melanotrópicos. Com objetivo de comparação estes dados estão apresentados na Figura 4.7, juntamente com os calculados do trabalhos de Subczynski *et al.*, (1992) para o carotenóide *zeaxanthin* e colesterol em DMPC e de Görriksen *et al.*, (1986) para uma proteína extrínseca de membrana, a Apocitocromo *c* em membranas de fosfatidilserina bovina.

Observe nesta Figura 4.7 que o perfil de modificações, em função da profundidade na bicamada, causadas pelo análogo MSH-I, é diferente daquele das moléculas de colesterol e carotenóide *Zeaxanthin*. Estas últimas, é sabido que estão intercaladas no interior da bicamada³, principalmente, perturbando a região do carbono 12 (C-12) da cadeia acila (ver Figura 4.7, colesterol, triângulos (▽), e carotenóide, círculos (●)). Entretanto, observe que o MSH-I (△) mostra um perfil paralelo ao da proteína Apocitocromo *c* (Figura 4.7 losango (◆)) (Görriksen *et al.*, 1986), que é sugerido penetrar parcialmente na região apolar da membrana (Rietveld *et al.*, 1985) e afetar principalmente as posições do carbono 7 (C-7) e 9 (C-9).

Considerando que os dois peptídeos são moléculas positivamente carregadas (mesma carga), a Figura 4.7 mostra mudanças no parâmetro de ordem efetivo obtido para o DMPG na presença e na ausência de excesso de carga, 300 mM de NaCl (*). Pode ser visto claramente que um possível empacotamento da bicamada causado pela blindagem das cargas das cabeças polares, devido à alta concentração de íons na superfície da membrana, leva a um perfil do ΔS_{ef} em função da profundidade diferente do obtido na presença dos peptídeos.

³ O carotenóide atravessa toda a espessura da bicamada enquanto o colesterol ocupa só a metade desta espessura.

Observa-se que a presença de 300 mM de sal aumenta o S_{ef} próximo à superfície da bicamada, não alterando muito a ordem na região central da membrana. Voltaremos a esta discussão no sub-item 4.1.5.

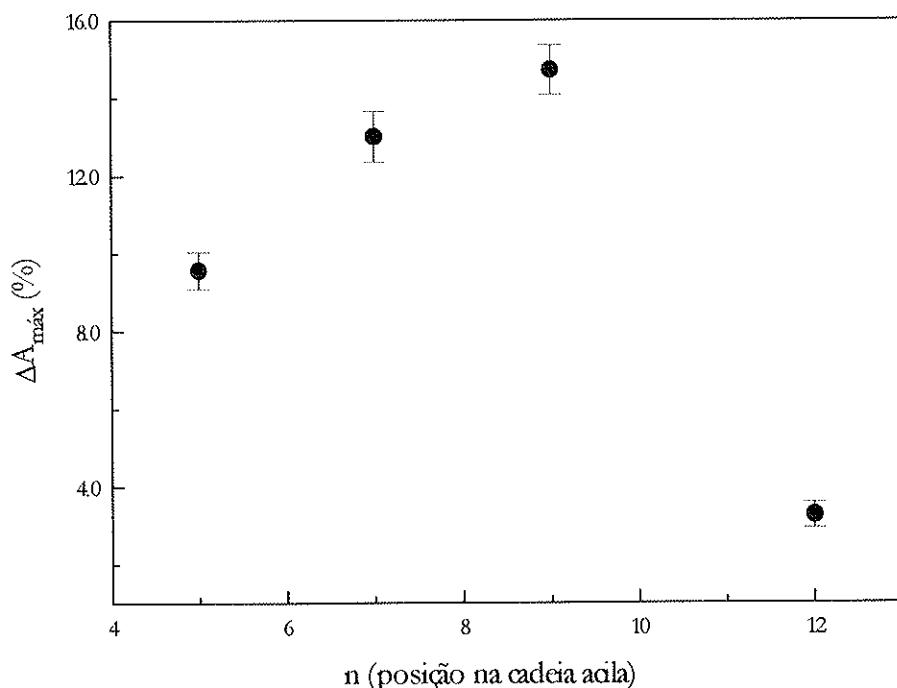


Figura 4.8 - Perfil da variação de A_{\max} dos SASL, obtido com a diminuição da temperatura da amostra ($40^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$), em função da posição do grupo nitróxido (n) ao longo da cadeia acila em vesículas de DMPG puro.

Entretanto, o perfil de variação de A_{\max} com n, causado pela presença do análogo MSH-I é semelhante ao obtido apenas com diminuição da temperatura da amostra (Figura 4.8), sendo que os marcadores de spin nas posições C-7 e C-9 “enxergam” mais o decréscimo da fluidez das cadeias hidrocarbonadas. Desta forma, apenas com os resultados apresentados acima não é possível afirmar que o peptídeo análogo penetre mais profundamente na bicamada do que o hormônio natural α -MSH. O que se pode dizer com mais certeza é que o análogo deve

interagir com a membrana, de alguma forma que cause um maior empacotamento das cadeias hidrocarbonadas.

Todos os espectros de RPE dos marcadores de spin com o grupo nitróxido ligado nas diferentes posições apresentaram somente uma componente. Portanto, diferente da proteína mencionada acima, com o MSH-I não há evidência de uma outra componente, com menor mobilidade, o que seria uma evidência direta da penetração do peptídeo no interior da membrana. Embora no trabalho de Pérez-Gil (1995) ele mostre que uma pequena proteína (35 aminoácidos) surfactante do pulmão, SP-C, suposta α-hélice transmembranar, reduz a mobilidade das cadeias fosfolipídicas, não se produz um sinal de RPE com características de estar mais imobilizado. Além deste trabalho, há outros na literatura que observam resultados similares (Ge e Freed, 1993).

4.1.2 Efeitos dos peptídeos sobre a fluidez e temperatura de transição de fase da bicamada, observados pelo marcador de spin derivado de esterol, CSL

Para uma melhor interpretação dos efeitos dos peptídeos melanotrópicos sobre as bicamadas lipídicas, foi utilizado também o marcador de spin CSL que é análogo ao colesterol. Este marcador possui uma estrutura rígida (ver Tabela 2.1 e Figura 2.4 no Cap. 2) e informa sobre a velocidade de movimento de rotação do eixo longo, enquanto os marcadores com cadeia acila informam principalmente sobre a amplitude e velocidade do movimento segmentar destas cadeias (isomerismo *gauche-trans*) (Shindler e Seelig 1973, 1974).

Na Figura 4.9 estão mostrados os espectros do CSL incorporados em bicamadas de DMPG na ausência e presença dos peptídeos, abaixo e acima da temperatura de transição de fase principal. Observa-se que o peptídeo análogo

muda significativamente a forma do espectro do CSL em baixas temperaturas, indicando um decréscimo na anisotropia espectral causada pela interação peptídeo-lipídio.

A análise dos espectros de RPE do CSL em bicamadas de DMPG foram feitas medindo-se o desdobramento hiperfino externo num dado intervalo de temperatura, embora os valores de Δ_{max} em baixas temperaturas sejam difíceis de medir com exatidão.

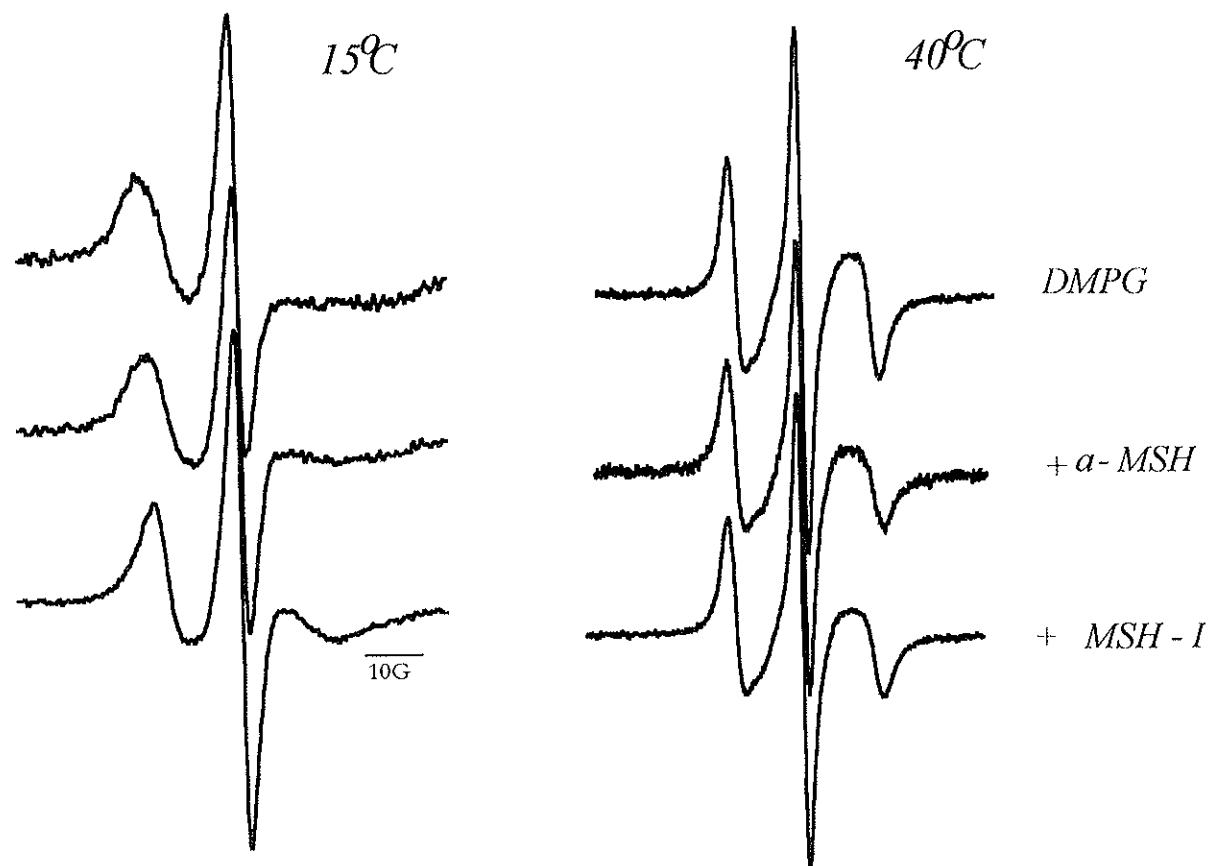


Figura 4.9 - Espectros de RPE do marcador CSL incorporado em vesículas de DMPG na ausência e na presença de 10 mol % de peptídeos, abaixo e acima da transição de fase do lipídio.

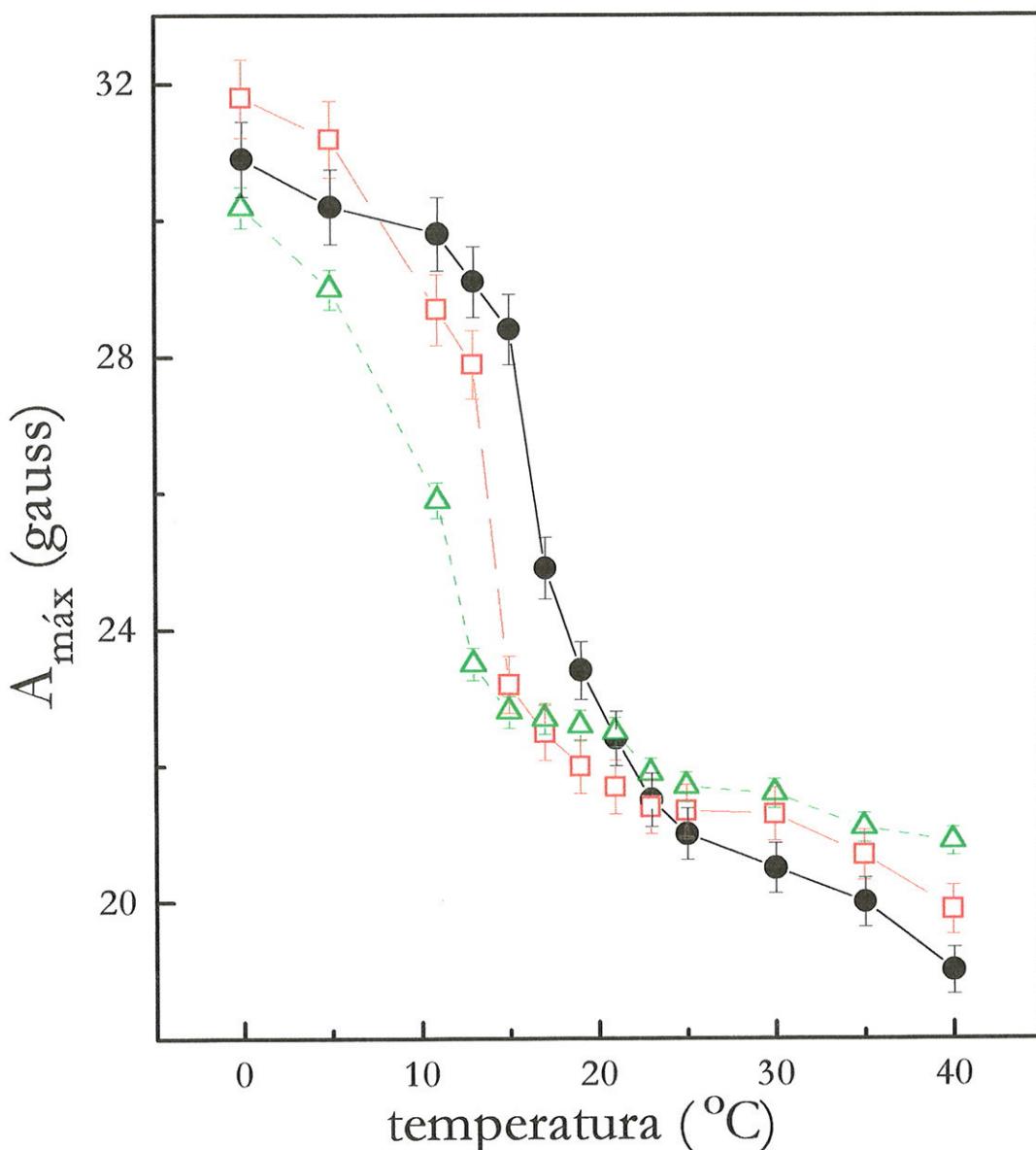


Figura 4.10 - Dependência com a temperatura do máximo desdobramento hiperfino ($A_{\text{máx}}$) do marcador CSL incorporado em vesículas de DMPG na presença de 0 (●), e 10 mol % de α -MSH (◻) e MSH-I (△).

De acordo com os resultados obtidos anteriormente com os marcadores com cadeia acila, pode-se notar na Figura 4.10 que ambos os peptídeos aumentam os valores de $A_{\text{máx}}$ acima da transição de fase principal (gel - cristal líquido), T_c , havendo portanto um efeito de empacotamento das bicamadas

lipídicas. Nota-se também nesta figura que em contraste com os outros marcadores, com o CSL observa-se um deslocamento significativo da temperatura de transição de fase principal dos lipídios causada pela presença do análogo MSH-I. Com o α -MSH também pode ser observado tal efeito, só que menos significativo. Este resultado indica que o CSL, por ter uma estrutura rígida, estaria monitorando a bicamada como um todo, e com isso “enxergando” que os peptídeos mudam o empacotamento das cadeias hidrocarbonadas, e diminuem a T_c , provavelmente porque penetram na membrana lipídica. Este é um efeito que vai contra ao observado com o aumento da força iônica (Träuble, *et al.*, 1976; Cevc, *et al.*, 1981), quando a diminuição da repulsão eletrostática estabiliza a bicamada na fase gel, aumentando a T_c .

É importante lembrar que o marcador de spin CSL é uma molécula análoga ao colesterol, (derivada do colesterol), e, mesmo sendo usado em baixa concentração (menor ou igual a 1 mol % da concentração de DMPG), pode influenciar o efeito dos peptídeos em bicamada de puro fosfolipídio. Foi observado que o colesterol, mesmo em muito baixas concentrações (0,01 - 1 mol %), causa grandes modificações estruturais em membranas (Subczynski e Kusumi, 1986).

Esta parte do trabalho em que discutimos a mudança na transição de fase causada pelos peptídeos, observada pelo CSL, está ainda em aberto, necessitando de novos experimentos, inclusive com técnicas mais apropriadas para se estudar transição de fase, por exemplo a calorimetria diferencial de varredura (DSC).

4.1.3 A região da cabeça polar da bicamada de DMPG é modificada pela presença dos peptídeos

Para observar o que ocorre na região da cabeça polar das membranas, quando da interação peptídeo-membrana, foi usado o marcador de spin, SSL.

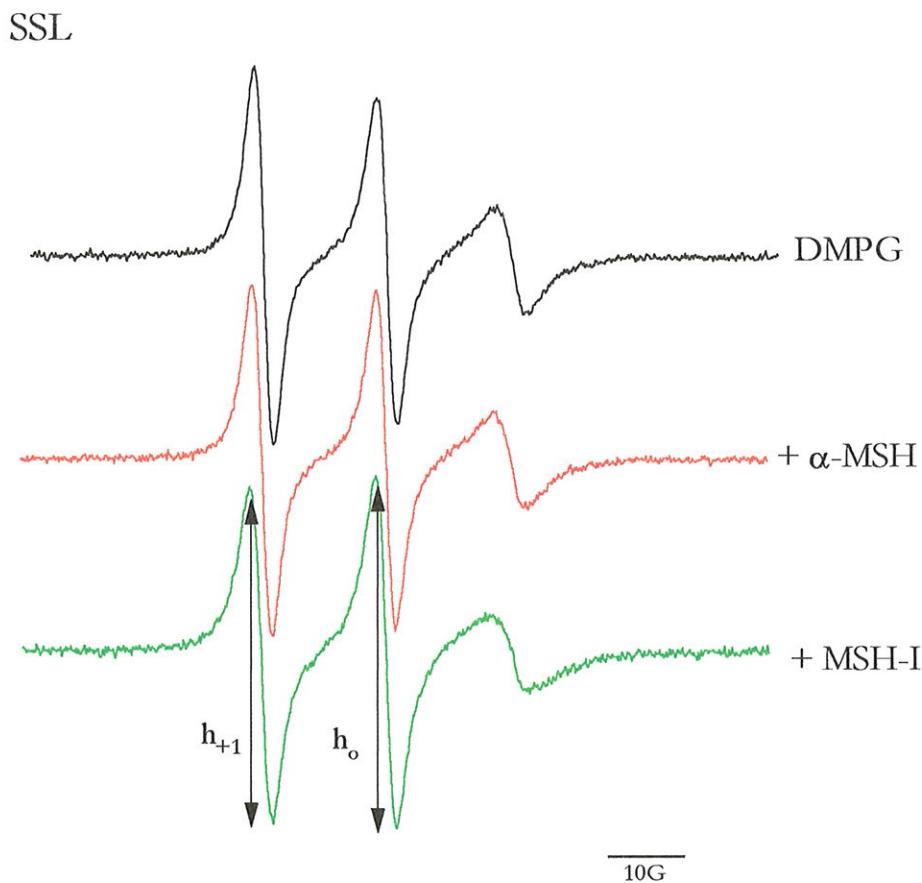


Figura 4.11 - Espectros de RPE do marcador de spin SSL em vesículas de DMPG na ausência e presença dos peptídeos melanotrópicos (indicados na figura). T = 30°C.

Uma característica deste marcador é que, diferentemente dos marcadores de spin utilizados anteriormente em que a anisotropia de rotação é preferencialmente ao redor do eixo z do nitróxido, o SSL possui rotação axial ao redor do eixo x, o que reflete numa amplitude maior da linha $m_I = +1$ (corresponde ao número quântico do nitrogênio $m_I = +1$) quando comparada às outras linhas (Figura 4.11). As linhas estreitas obtidas com SSL incorporado em membranas de DMPG indicam que a região da cabeça polar possui pouca ordem e alta mobilidade. Observe na Figura 4.11 que o efeito de empacotamento devido

à interação peptídeo-lipídio é evidenciado pelo alargamento das linhas dos espectros de RPE do SSL, principalmente com análogo MSH-I.

As alterações causadas pelos peptídeos melanotrópicos na interface da bicamada de DMPG foi avaliada pelo decréscimo do parâmetro empírico h_{+1}/h_o (h_{+1} e h_o estão indicados na Figura 4.11), razão entre as amplitudes das linhas que correspondem ao $m_I = +1$ e $m_I = 0$, calculados dos espectros de RPE do SSL. Além disso, os peptídeos parecem alterar a simetria de rotação da molécula, modificando a relação h_{+1}/h_o (Figura 4.12)

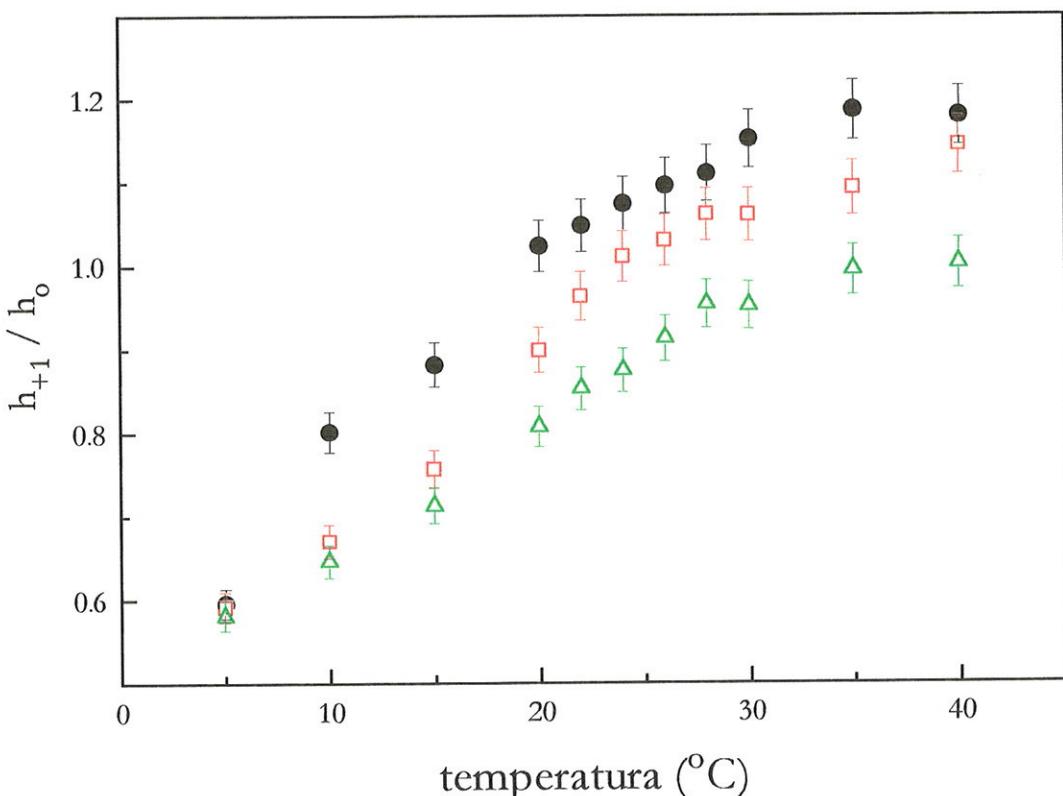


Figura 4.12 - Dependência com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_o dos espectros de SSL em vesículas de DMPG na ausência (●) e presença de 10 mol % de α -MSH (□) e MSH-I (△).

Observe na Figura 4.12 que os dois peptídeos tornam a superfície da membrana mais compacta, uma vez que, o efeito de diminuir a razão h_{+1}/h_0 está no mesmo sentido do que é causado pela diminuição da temperatura da amostra. Novamente, aqui também se observa que o análogo é muito mais efetivo em mudar a estrutura da membrana do que o hormônio nativo α -MSH.

Para comparação, é mostrada na Figura 4.13 a ausência de variação no parâmetro h_{+1}/h_0 quando são utilizadas membranas de DMPC.

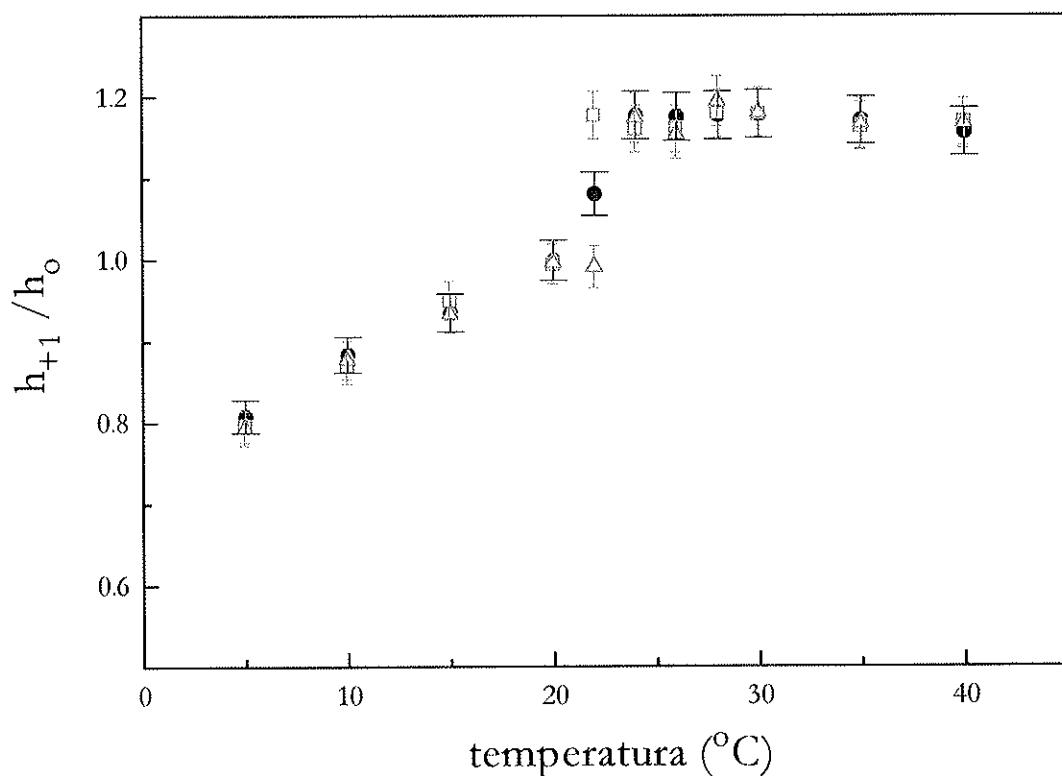


Figura 4.13 - Dependência com a temperatura do parâmetro h_{+1}/h_0 dos espectros de SSL em vesículas de DMPC na ausência (●) e presença de 10 mol % de α -MSH (□) e MSH-I (Δ).

Devido ao fato deste marcador de spin possuir pouca ordem e muita mobilidade, foi possível obter os tempos de correlação rotacional, paralelo e perpendicular, os quais foram calculados de acordo com Marsh, 1989, onde não é

assumida a existência de um potencial diretor. Os espectros foram simulados, fazendo as correções para os alargamentos inhomogêneos que aparecem devido à estrutura hiperfina não resolvida, como sugerido por Bales, 1989 (ver Cap.2 sub-item 2.1.2.2). Nestes cálculos foram usados os parâmetros apropriados para rotação preferencial em torno do eixo x, apesar do peptídeo análogo, MSH-I, alterar esta preferência do marcador. Assim, os valores dos tempos de correlação calculados devem ser vistos como valores aproximados, que são importantes na comparação dos efeitos dos dois peptídeos.

A Figura 4.14a mostra que o efeito dos peptídeos sobre os valores de $\tau_{//}$ (tempo de correlação rotacional ao redor do eixo de simetria molecular) é também semelhante ao causado pelo decréscimo de temperatura.

Fica evidente na Figura 4.14a que o MSH-I causa um grande aumento no tempo de correlação rotacional relativo ao movimento em torno do eixo x (observe e compare com o pequeno aumento observado em DMPG puro quando a temperatura diminui de 40°C para 25 °C). Nesta grande variação de $\tau_{//}$, observada quando na presença de MSH-I, deve estar incluída uma mudança da direção preferencial de movimento. No entanto, se for considerado simplesmente o movimento do nitróxido decomposto em dois eixos, paralelo e perpendicular ao eixo x da molécula, é interessante observar que os valores de τ_{\perp} (tempo de correlação perpendicular ao eixo x da molécula) se alteram pouco na presença dos peptídeos, apesar de mostrarem um pequeno decréscimo próximo de 35°C (Figura 4.14b).

Este resultados parecem deixar claro que o efeito destes peptídeos melanotrópicos na região da cabeça polar, também é o de empacotamento. Este é um resultado similar ao que foi obtido com NMR de lipídios com cabeça polar deuterada (Biaggi M.H, *et al.*, 1996 - Apêndice B). Naquele trabalho foi mostrado que os dois peptídeos diminuíam o tempo de relaxação spin rede do deutério no carbono α - DMPG, por conseguinte aumentando o tempo de correlação do movimento segmentar deste carbono. Foi observado também por NMR que o efeito do análogo MSH-I é maior do que do hormônio nativo.

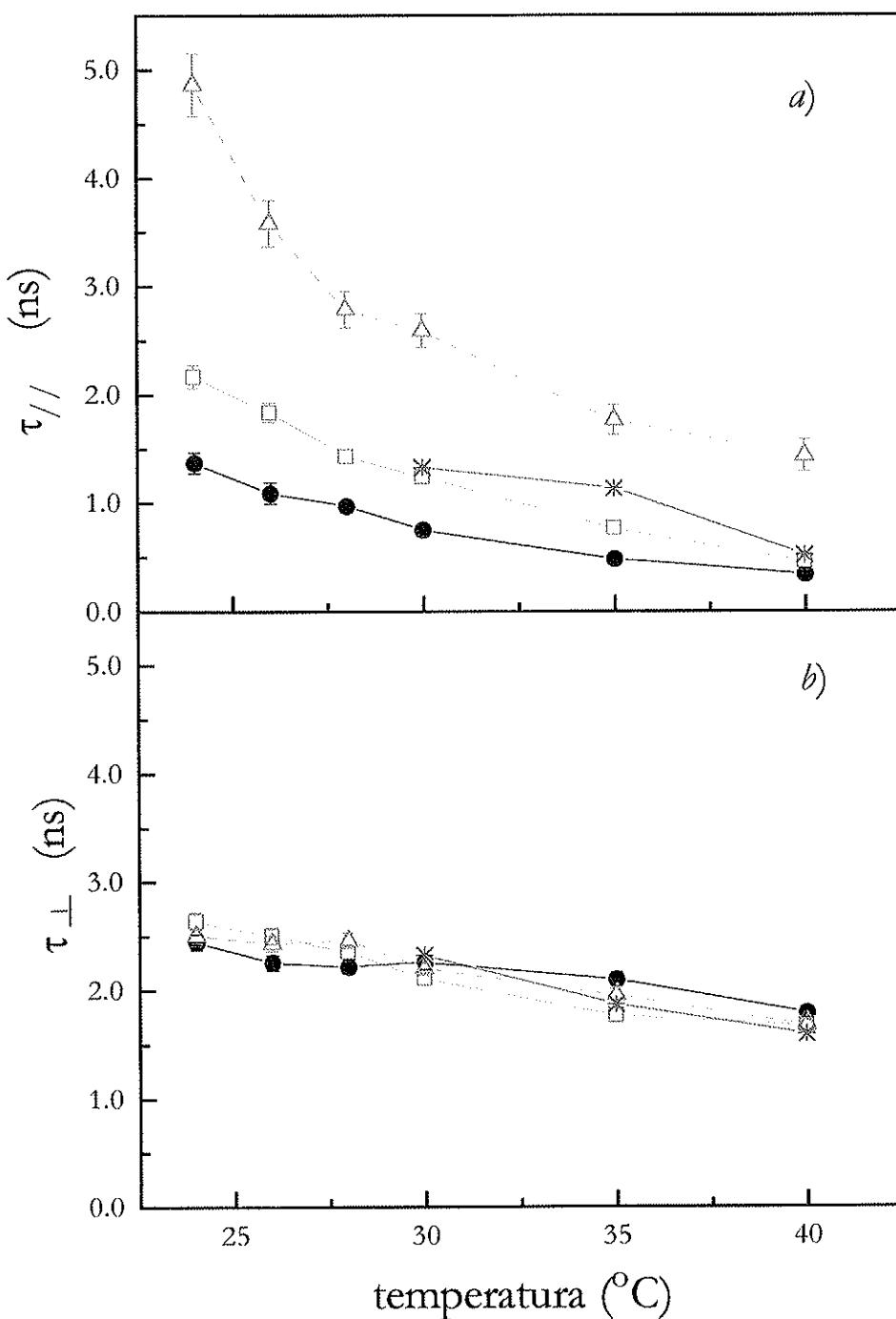


Figura 4.14 - Dependência com a temperatura dos tempos de correlação rotacional do SSL (a) ao redor do eixo molecular de simetria, τ_{\parallel} e (b) perpendicular a este eixo, τ_{\perp} , em vesículas de DMPG na ausência (●) e presença de 10 mol % de α -MSH (◻); MSH-I (Δ) e 300 mM de NaCl (*).

Novamente, é importante ressaltar, que este efeito é específico da interação destes peptídeos com a superfície do DMPG, não tendo sido observado simplesmente com o aumento de íons em solução. Observe também na Figura 4.14 que o efeito de 300 mM de NaCl, chega a ser próximo ao causado pelo α -MSH, mas ainda é muito menor do que o observado com o MSH-I.

Se for considerado que provavelmente existe um potencial de orientação na interface da membrana, os tempos de correlação aqui calculados têm a função apenas de ser um parâmetro comparativo e não de fornecer um valor numérico exato. Talvez um modelo mais extensivo do movimento (Lange *et al.*, 1985) possibilitasse uma análise mais segura dos espectros de RPE do SSL.

4.1.4 A interação peptídeo-lipídio depende da força iônica do meio

A dependência da ligação peptídeo - lipídio com a concentração de NaCl, do parâmetro $A_{máx}$, do marcador de spin 5-SASL em DMPG a 33°C, na ausência e na presença dos peptídeos melanotrópicos é dada na Figura 4.15. Como esperado, devido às cargas positivas dos peptídeos e negativas do DMPG, a adição de sal tem um forte efeito sobre a ligação de ambos os peptídeos aos lipossomos o que é mostrado pelas mudanças no parâmetro espectral ($A_{máx}$).

Com o aumento da concentração de sal ocorre um decréscimo na perturbação dos lipídios devido à presença dos peptídeos, o que já era esperado. Este resultado está mostrando que diminui a ligação dos peptídeos com o aumento da força iônica, quando as cabeças polares dos lipídios carregados já estão completamente blindadas pelos contra íons. Muito pouca modificação no $A_{máx}$ é observada para concentrações de sal acima de 300 mM (ver detalhe na Figura 4.15).

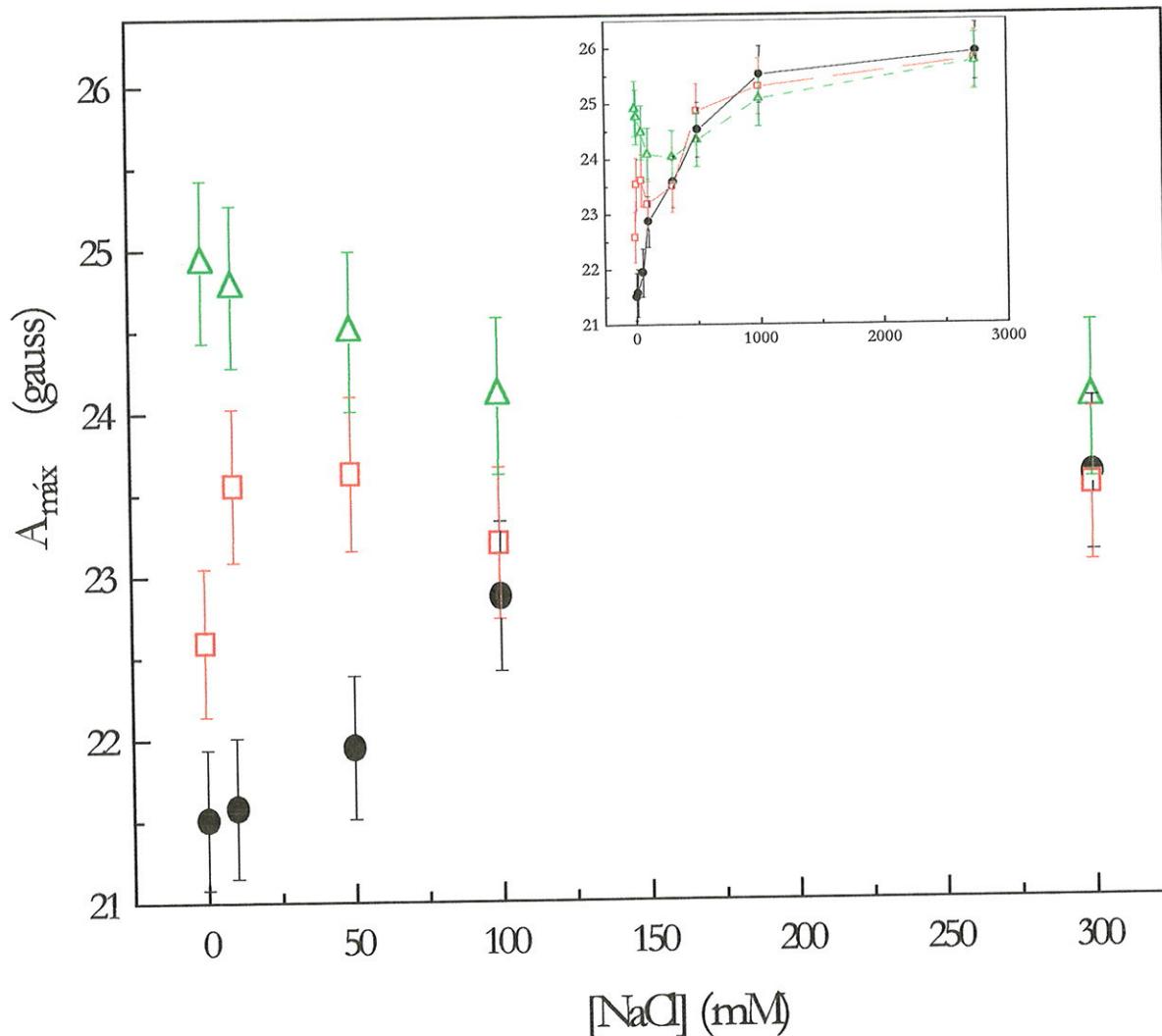


Figura 4.15 - Variação do desdobramento hiperfino máximo ($A_{\text{máx}}$) em função da concentração de NaCl do marcador de spin 5-SASL incorporados em membranas de DMPG na ausência (●) e presença de 10 mol % (1mM) de α -MSH (□) e MSH-I (△). $T = 33^{\circ}\text{C}$. A figura inserida mostra os dados de toda variação de concentração de NaCl estudada (0 - 2750 mM).

Portanto como esperado, a interação eletrostática com as cargas na superfície da bicamada constitui uma componente obrigatória da ligação, uma vez

que os peptídeos podem ser totalmente removidos em alta concentração de sal (detalhe Figura 4.15). Apoando este resultado, foi o mostrado previamente na Figura 4.13 em que os peptídeos não interagem com bicamadas neutras de fosfatidilcolina (DMPC).

Desta forma, pode se dizer que por um lado, a dependência com o sal indica que a interação eletrostática é necessária para a ligação destes peptídeos com as cargas negativas da bicamada lipídica. Por outro lado, os outros resultados obtidos até então com os marcadores de spin juntamente com os obtidos por fluorescência (Macêdo, *et al.*, 1995), também fornecem evidências de uma interação mais direta do peptídeo análogo MSH-I, com as cadeias hidrofóbicas dos lipídios.

Nota-se ainda na Figura 4.15 (detalhe) que na ausência e presença dos peptídeos os valores do A_{mix} do 5-SASL bem como do S_{ef} (ver Figura 4.7) aumentam em concentrações altas de sal, na temperatura de 33°C. Provavelmente a ligação deste com as cabeças polares dos fosfolipídios carregados faz diminuir a repulsão eletrostática entre elas, levando a um maior empacotamento na região da cabeça polar (ver Cevc *et al.*, 1981). É importante lembrar o resultado mostrado na Figura 4.7 que este aumento do parâmetro S_{ef} dos marcadores de spin, na presença de alta concentração de sal, não é observado com os marcadores 9- e 12- SASL.

4.1.5 O efeito do MSH-I sobre o “empacotamento” das bicamadas é maior do que de uma alta força iônica

É importante lembrar que esta discussão teve inicio no sub-item 4.1.1, voltou-se a discutir no sub-item 4.1.3 e aqui está se desenvolvendo mais sobre este assunto.

Para comparar o efeito de uma alta concentração iônica (300 mM de NaCl) com o efeito do peptídeo melanotrópico análogo, o MSH-I, sobre o “empacotamento” das bicamadas de DMPG foi usado o marcador de spin 9-SASL, que possui o nitróxido monitorando o interior da membrana.

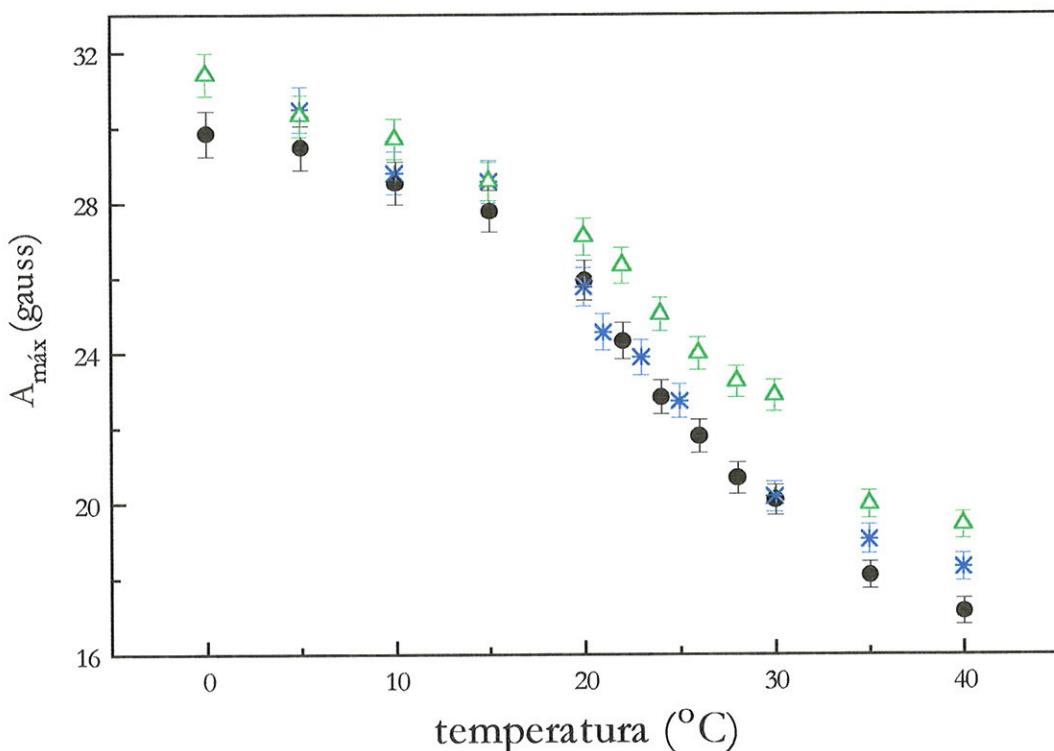


Figura 4.16 - Variação do desdobramento hiperfino máximo ($A_{\text{máx}}$) em função da temperatura do marcador de spin 9-SASL incorporados em membranas de DMPG na presença de 0, (●); 10 mol % (1mM) de MSH-I (Δ) e 300 mM de NaCl (*).

É claro na Figura 4.16 que o peptídeo análogo é muito mais efetivo em aumentar a ordem e/ou diminuir a mobilidade do marcador de spin do que a presença de uma grande quantidade de íons. Com o peptídeo nativo o efeito é similar ao de 300 mM de sal (dados não mostrados). Considerando que os dois peptídeos são moléculas pequenas (comparada às proteínas) com

aproximadamente uma carga positiva, os resultados desta Figura 4.16, juntamente com os das Figuras 4.7 e 4.14 sugerem que o efeito de 10 mol% de MSH-I sobre as membranas de DMPG não deve ser somente devido a uma interação eletrostática na superfície, que resulta em um decréscimo da densidade superficial de carga, o que levaria a um maior “empacotamento” das cadeias hidrocarbonadas. É realmente provável que o análogo penetre parcialmente na bicamada lipídica.

4.1.6 Os peptídeos modificam a polaridade da bicamada

Para investigar se estaria ocorrendo algum efeito dos peptídeos sobre a polaridade do meio em que se encontra o marcador de spin fosfolipídico, foram calculados os desdobramentos hiperfinos isotrópicos, α_o , na ausência e presença dos peptídeos. Lembrando que um ambiente mais polar tende aumentar a densidade de spin de elétrons desemparelhados sobre o átomo de nitrogênio afetando com isso a interação hiperfina entre o spin do elétron e o spin nuclear do nitrogênio, levando a um aumento no desdobramento hiperfino isotrópico (ver detalhes no cap.2, sub-ítem 2.1.2.3) (Seelig *et al.*, 1972; Griffith *et al.*, 1974).

Acima de 25 °C os valores de α_o são aproximadamente independentes da temperatura e a Tabela 4.1 mostra os valores médios de 25 a 40 °C. Como esperado, o nitróxido próximo da interface polar - apolar (5-PCSL) sente uma região com maior polaridade do que próximo do grupo metil terminal da cadeia acila (12-PCSL).

Tabela 4.1 - Efeito dos peptídeos melanotrópicos (10 mol%) sobre o desdobramento hiperfino isotrópico, α_o (gauss) observado com os dois marcadores de spin fosfolipídicos.

| | 5-PCSL | 12-PCSL |
|---------|--------------|--------------|
| DMPG | 14.95 ± 0.05 | 14.21 ± 0.08 |
| + α-MSH | 15.05 ± 0.06 | 14.00 ± 0.04 |
| + MSH-I | 14.97 ± 0.05 | 13.63 ± 0.06 |

Observa-se na Tabela 4.1 que a polaridade da região superior da bicamada não é significativamente afetada pela presença dos peptídeos, quando os valores α_o são dados pelo marcador 5-PCSL. No entanto, a polaridade das micro-regiões fornecida pelo 12-PCSL decresce na presença dos peptídeos. Novamente, o análogo é mais efetivo na mudança do valor de α_o do que o α-MSH. Estes resultados são consistentes com o fato de que quando o peptídeo interage com a membrana ele diminui a liberdade de movimento das cadeias acilas, e com isso causa um decréscimo das flutuações verticais dos marcadores. O marcador de spin com o grupo doxil no carbono 5 (C-5) não seria muito afetado, uma vez que nesta posição as flutuações verticais são muito pequenas (Yin *et al.* 1988), no entanto o marcador na posição 12 (C-12) ficaria restrito mais no fundo da bicamada, o que resultaria em média numa polaridade menor para esta micro-região.

4.1.7 Efeitos de diferentes concentrações dos peptídeos melanotrópicos na bicamada lipídica

A variação do parâmetro de ordem Sef do marcador de spin 12-SASL incorporado em bicamadas lipídicas de DMPG, para três temperaturas, em função da concentração de peptídeo é mostrada na Figura 4.17. Os experimentos foram realizados, mantendo fixa a concentração lipídica em 10 mM, e variando a concentração de peptídeo até o máximo de 1mM..

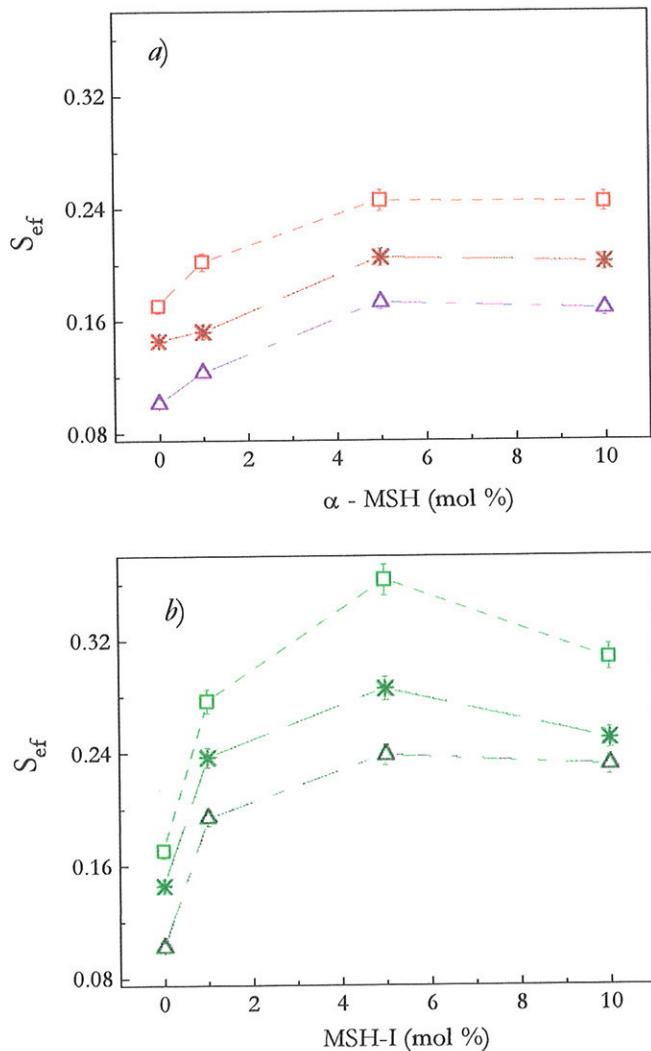


Figura 4.17 Variação do parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}) do marcador 12-SASL em lipossomos de DMPG (10mM) em função da concentração de peptídeo (a) α -MSH e (b) MSH-I em (V) 30°C; (*) 35°C e (Δ) 40°C.

Observa-se que em torno da concentração de 0,5 - 1,0 mM já ocorre uma saturação. A partir desse resultado (Figura 4.17) é que se decidiu trabalhar com 1 mM de peptídeo nos experimentos comparativos mostrados até então neste trabalho. Embora esta concentração possa ser relativamente muito alta, a real concentração do peptídeo na bicamada pode ser menor, o que vai depender da partição do peptídeo na fase lipídica.

No entanto, observou-se posteriormente que a concentração saturante de peptídeo parece depender da posição que o marcador de spin se encontra na bicamada. Isso pode ser observado na Figura 4.18 em que está mostrada a porcentagem de variação dos parâmetros $A_{máx}$ do marcador 5-SASL e h_{+1}/h_0 do marcador SSL, com diferentes concentrações lipídicas e peptídicas. Observa-se que para os dois marcadores que estão monitorando regiões na interface da membrana, a concentração saturante de peptídeo não é atingida, apesar do efeito do MSH-I ser sempre maior do que o do α -MSH.

Coeficiente de partição, K_p , dos peptídeos em membrana de DMPG

Os coeficientes de partição dos peptídeos na membrana, K_p , foram calculados baseados no efeito que estes peptídeos causam na estrutura da bicamada (Lissi *et al.*, 1990). Neste método é assumido que a magnitude do efeito observado é determinado somente pela concentração de peptídeos ligados à membrana, C_M (maiores detalhes deste método estão no sub-item 3.3.3.1 em Materiais e métodos). Foram utilizados os dados da Figura 4.18 para estimar esses coeficientes.

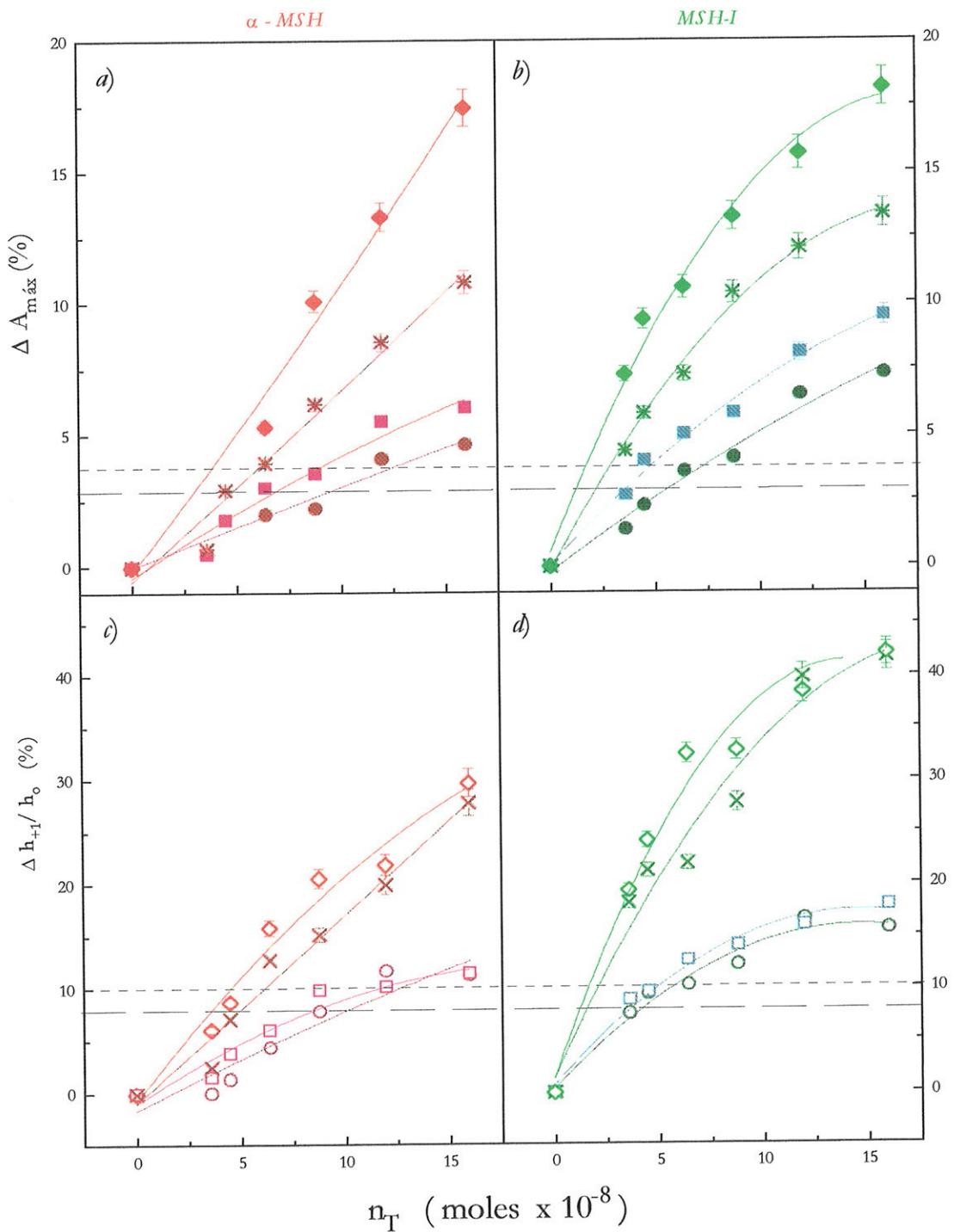


Figura 4.18 - Efeito do (a) α -MSH; (b) MSH-I sobre o desdobramento hiperfino máximo, A_{\max} , do marcador de spin 5-SASL e (c) α -MSH; (d) MSH-I sobre o parâmetro h_+/h_o , do marcador SSL, em vesículas de DMPG nas concentrações (mM): (\blacklozenge \diamond) 5.0; ($*$ \times) 10.0; (\blacksquare \square) 20.0 e (\bullet \circ) 24.0. T= 35°C. As linhas tracejadas, paralelas à abscissa, geram os conjuntos de valores de n_T e V_M para os quais o efeito do peptídeo é o mesmo.

As linhas tracejadas correspondem ao efeito constante que foi obtido com diferentes relações de concentração total de peptídeo e lipídio (n_T é o número total de moles do peptídeo), levando à mesma concentração de peptídeo ligado à membrana.

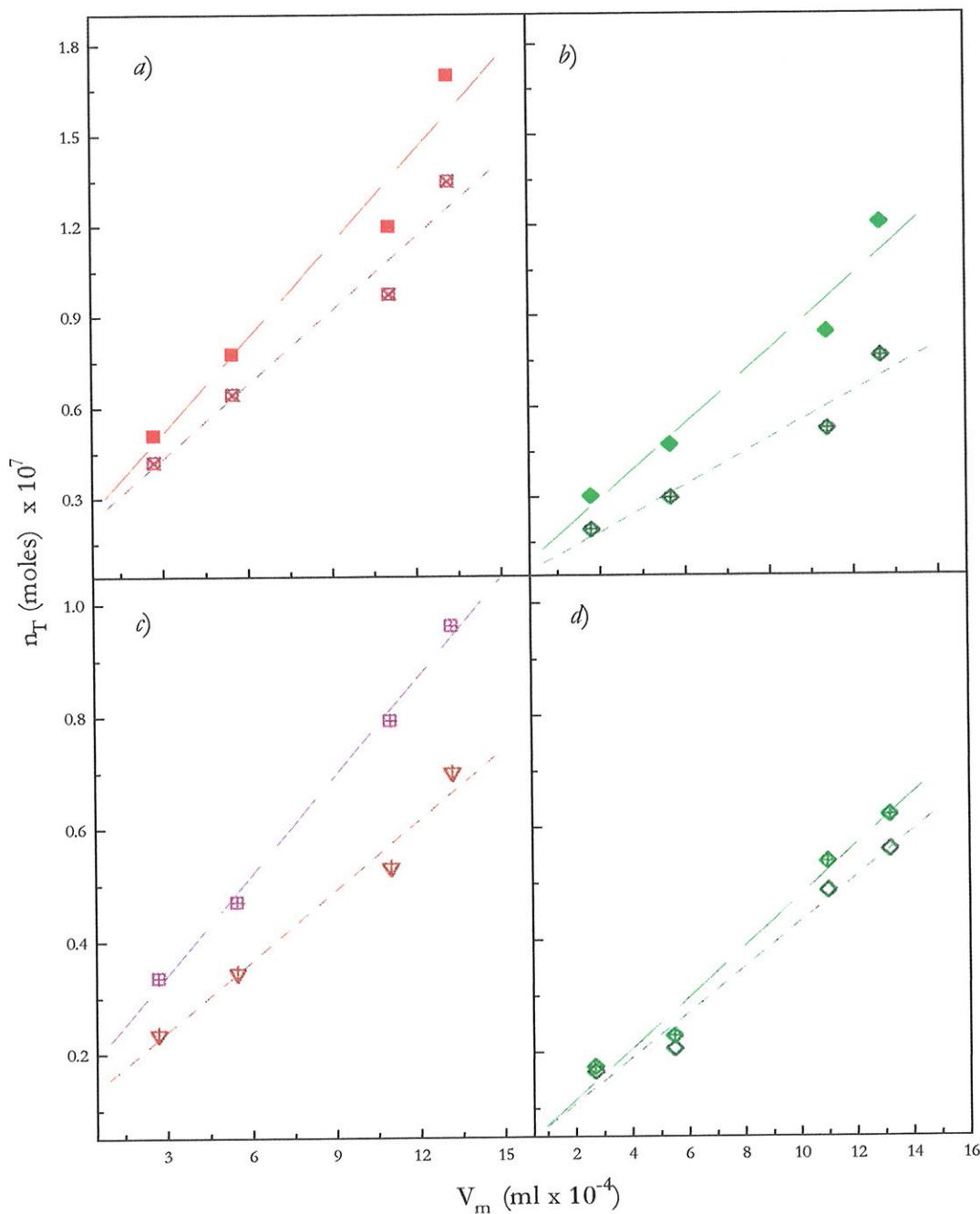


Figura 4.19 - Gráficos de n_T vs. V_M gerados pelas linhas tracejadas na Figura 4.18.

A partir do gráfico de n_T vs. V_M (volume total de membrana) com os valores gerados pela linha tracejada (Figura 4.19) é possível obter a concentração de peptídeo na membrana, C_M , e consequentemente o coeficiente de partição K_p , através da Equação (3.4) (Cap. 3 - Materiais e Métodos).

Desta forma foram calculados os coeficientes de partição para o α -MSH e análogo MSH-I cujos valores estão na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Coeficientes de partição membrana/água para os peptídeos dos melanotrópicos.

| | K _p | |
|---------------|----------------|----------------|
| | com 5-SASL | com SSL |
| α -MSH | 360 ± 70 | 290 ± 50 |
| MSH-I | 1330 ± 160 | 1360 ± 160 |

O modelo empregado é bastante simplificado e com certeza não considera a parte eletrostática das interações entre peptídeos e lipídios e mesmo entre os peptídeos. Como os peptídeos estudados possuem a mesma carga, os valores obtidos dos coeficientes de partição são valores comparativos entre os mesmos. Também neste modelo não é feita qualquer correção para o fato de que na superfície da membrana de DMPG, negativa, a concentração peptídica é muito maior do que livre na solução.

Com o objetivo de refazer os cálculos destes coeficientes de partição, empregou-se alguns outros marcadores de spin (com o grupo nitróxido em outras posições da bicamada). Nestes experimentos observou-se um outro problema na utilização deste modelo simplificado. Verificou-se que com estes outros marcadores, não era possível obter retas no gráfico n_T vs. V_M , a partir de diferentes conjuntos de pontos com mesmo C_M , que fornecessem valores de K_p semelhantes entre si, e, que pudessem ser considerados. Uma discussão mais

aprofundada sobre este assunto permanece em aberto, necessitando de outros experimentos.

Para verificar se o maior efeito observado para o análogo MSH-I sobre a estrutura da bicamada de DMPG foi somente devido a sua maior constante de associação, foram comparadas as alterações causadas pela mesma quantidade de peptídeo sobre a estrutura da membrana.

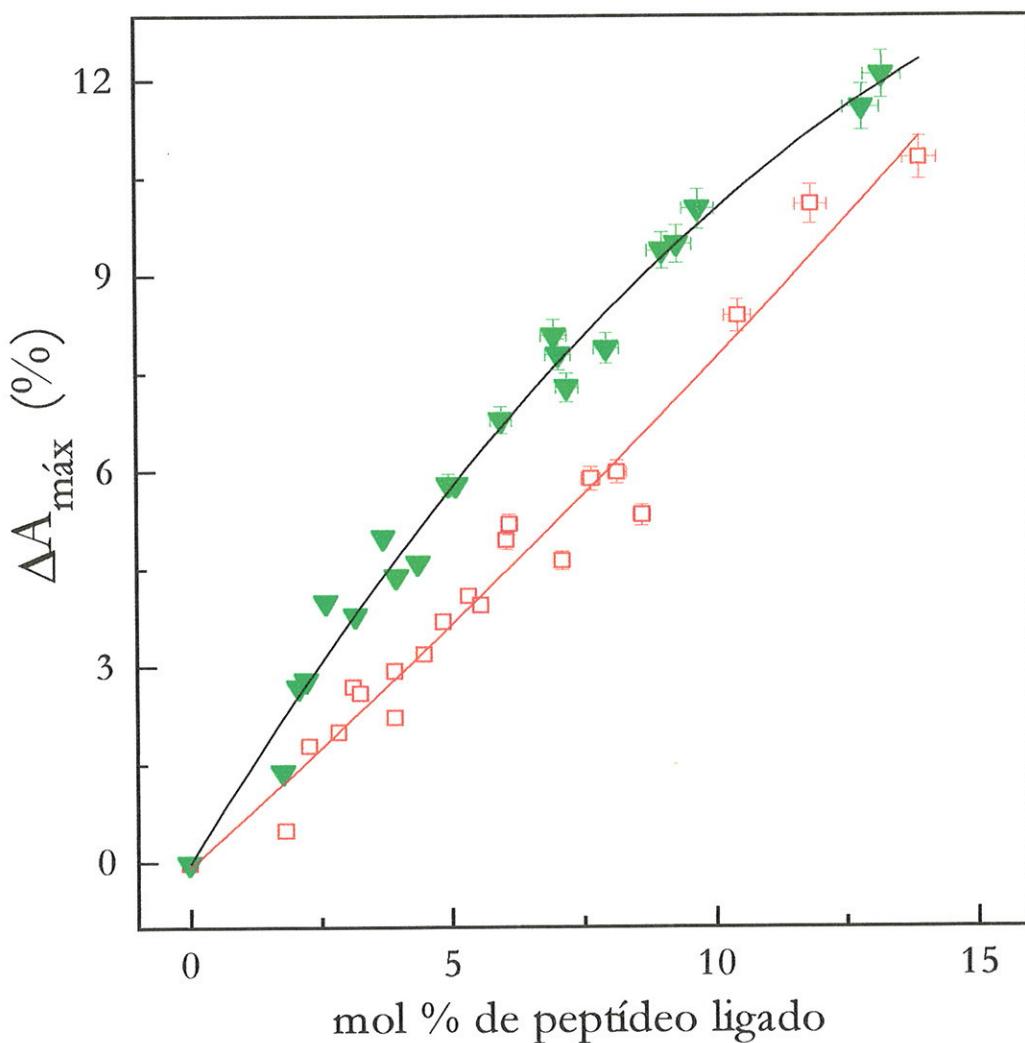


Figura 4.20 - Dependência do desdobramento hiperfino externo do 5-SASL em vesículas de DMPG (Hepes 10 mM, pH 7.4), com a concentração atual de α -MSH (◻) ou MSH-I (▲) ligado às vesículas [(moles de peptídeo ligado/moles de DMPG) $\times 100$].

Para esta normalização foram assumidos os valores 360 e 1330 para os coeficientes de partição do α -MSH e MSH-I, respectivamente, e as variações do $A_{máx}$ nos espectros do 5-SASL foram calculados em função da concentração atual de peptídeo interagindo com a bicamada. Pode-se observar na Figura 4.20 que para uma mesma porcentagem de peptídeo ligado na membrana o efeito no empacotamento é um pouco maior para o análogo MSH-I.

Considerando os coeficientes de partição calculados, e os diferentes efeitos causados na estrutura da bicamada, com a mesma quantidade dos dois peptídeos, pode-se inferir que o análogo MSH-I não apenas se liga preferencialmente na bicamada, quando comparado com a molécula nativa, mas também parece mudar mais pronunciadamente a estrutura da bicamada. Isto parece estar de acordo com o que foi obtido anteriormente, que foi sugerido que o MSH-I perturba a membrana em posições mais no fundo da bicamada do que o α -MSH (Figura 4.7), apesar das questões então levantadas.



4.2 Dicroísmo Circular

Usamos a técnica de dicroísmo circular CD, por ser uma técnica muito útil em observar a ocorrência de estrutura secundária ordenada em proteínas. Embora quando se trata de pequenos peptídeos fica muito difícil a determinação quantitativa de tal ocorrência, devido à falta de informações estruturais, no entanto a forma e intensidade dos espectros de CD podem ser bastante informativos a respeito de mudanças conformacionais destas moléculas.

O objetivo portanto, foi o de observar a estrutura secundária destes peptídeos melanotrópicos em diferentes solventes e na presença de micelas e vesículas aniônicas.

Na Figura 4.21a e b observa-se que os dois peptídeos apresentam espectros de CD similares em água (linha cheia), apresentando uma pronunciada banda negativa próximo de 200 nm, indicativo de estrutura aleatória (*random coil*). Entretanto, quando colocados na presença de um solvente, que é indutor de α -hélice, o TFE (trifluoroetanol), se comportam diferentemente. Os espectros de CD destes peptídeos na presença de concentrações diferentes de TFE mostram claramente que o α -MSH adquire mais facilmente uma estrutura α -hélice do que análogo MSH-I.

Esta estrutura não ordenada, observada para os dois peptídeos em água, está de acordo com o estudo de Hruby *et al.* (1988), no qual utilizaram a técnica de NMR para determinar as estruturas secundárias de vários fragmentos análogos do α -MSH.

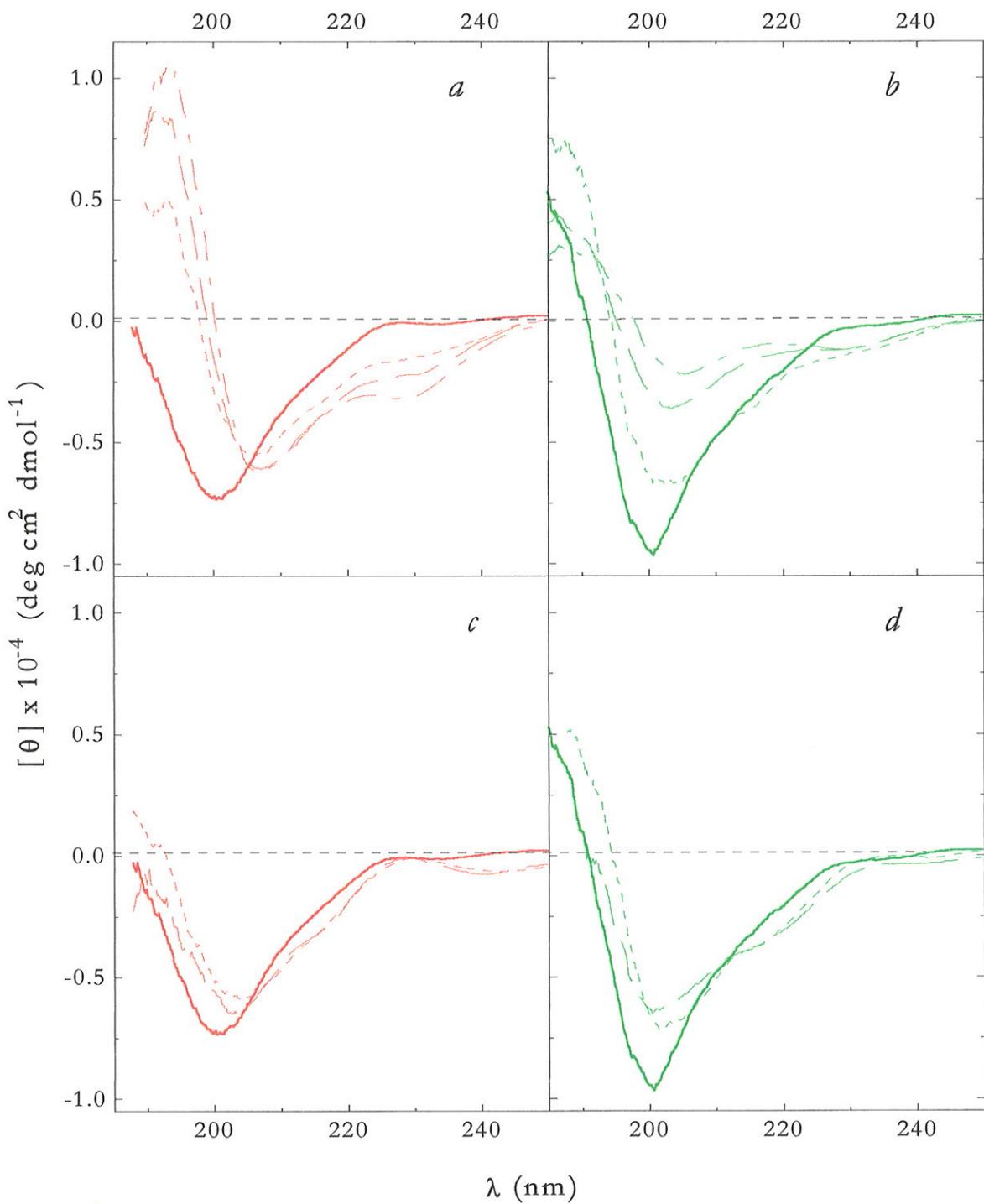


Figura 4.21. Espectros de CD do α -MSH (*a* e *c*) e MSH-I (*b* e *d*), em 5 mM de tampão foscato, pH 7.4 (—). Em *a* e *b*, os espectros foram obtidos na presença de 50% (· · ·), 75% (- - -) e 100% (- · -) em volume de TFE, e em *c* e *d* na presença de 40 mM de SDS (· · ·) e 5 mM de DMPG (- - -). A concentração dos peptídeos foi $1,2 \times 10^{-4}\text{M}$. Temperatura = 35°C.

Eles sugerem que estes peptídeos possuem uma grande flexibilidade conformacional em água, mas ressaltam também que não se deve descartar a possibilidade de que uma das conformações seja predominante. Por outro lado, também observaram que nos fragmentos com D-Phe⁷, tal com o MSH-I, a interação entre as cadeias laterais dos aminoácidos His⁶, D-Phe⁷ e Arg⁸ estabilizaria uma estrutura do tipo-β. No entanto, embora nenhuma estrutura do tipo-β é claramente detectada no espectro de CD do MSH-I em água, a estrutura deste peptídeo teve mais dificuldade em adquirir uma conformação α-hélice, quando comparada com a molécula nativa, o que certamente é uma indicação de que o peptídeo análogo possui uma outra estrutura preferencial em meio aquoso.

Considerando a grande dificuldade de uma análise mais quantitativa de espectros de CD, de peptídeos pequenos, pode-se especular que a banda positiva próximo de 185 nm, que é observada para o MSH-I em água (linha cheia na Figura 4.21*b* ou *d*) seria uma indicação de que este peptídeo possui uma certa estrutura secundária ordenada. Nos trabalhos de Jacchieri e Ito (1994; 1995) nos quais eles fazem cálculos para modelagem de estruturas, levando em conta os diferentes rotâmeros da cadeia lateral do Trp, foi mostrado que a conformação mais estável para o α-MSH (Jacchieri e Ito 1994) e MSH-I (Jacchieri e Ito 1995) seria uma estrutura do tipo-β. Embora a barreira de energia para ocorrer as interconversões entre as diferentes famílias conformacionais tenha sido muito mais baixa para o α-MSH do que para o análogo. Assim, esta variedade de estruturas diferentes assumidas pelo α-MSH com energias similares explicaria a maior flexibilidade deste peptídeo, o que favoreceria a formação de estrutura secundária do tipo α-hélice em um solvente apropriado (Figura 21*a* e *b*).

Na presença de micelas de SDS e vesículas de DMPG - ambas as interfaces aniónicas - os dois peptídeos mostram uma pequena tendência em formar estrutura do tipo-β (Figura 4.21*c* e *d*). Observa-se na Figura 4.21*c* e *d*, uma clara indicação, embora pequena, de uma banda negativa com máximo ao redor de 220 nm após interação dos peptídeos com as interfaces. Isto é provável

pelo fato destes peptídeos possuírem uma pequena quantidade de estrutura tipo- β em sua conformação. Wu e Yang (1981) também observaram que o α -MSH em baixo pH (2 - 3) adota a forma β quando na presença de SDS, mas somente abaixo da concentração micelar crítica de surfactante.

No trabalho de Pascutti, *et al.*, (1998), em que estuda a dinâmica do peptídeo α -MSH na interface água/membrana, também foi sugerido que a estrutura deste peptídeo em meio de alta constante dielétrica (água, $\epsilon = 80$) apresenta grande flexibilidade e nenhuma estabilização conformacional foi observada. A membrana foi simulada por uma superfície de descontinuidade dielétrica com $\epsilon = 2$ em um meio (solvente) de $\epsilon = 80$ e foi observado que o α -MSH prefere ficar no interior da membrana ($\epsilon = 2$)⁴, apresentando uma dobra β na posição 8 (Arg). Os resultados de CD aqui apresentados e já mencionados anteriormente também acusam, em pequena porcentagem, a presença de dobra β para os peptídeos melanotrópicos em contato com agregados anfifílicos.

É interessante notar que os dois peptídeos apresentam espectros de CD similares tanto na presença de micelas de SDS ou vesículas de DMPG. Além disso, embora os resultados já apresentados neste trabalho usando RPE e os dados de fluorescência (Macêdo *et al.*, 1996) tenham mostrado que o análogo MSH-I vai mais fundo na bicamada do que o α -MSH, as alterações conformacionais na estrutura dos dois peptídeos, após interação com vesículas de DMPG, quando observada por CD, são bastante similares.

⁴ É importante lembrar que esta total penetração do peptídeo na fase lipídica não foi observada nos resultados aqui apresentados por RPE.

5 Conclusões

Os resultados obtidos por RPE mostraram que ambos os peptídeos α -MSH e o análogo MSH-I aumentam o empacotamento da bicamada de DMPG, tanto na região da cabeça polar como ao longo da cadeia hidrocarbonada, que é um efeito bastante semelhante a interação de proteínas superficiais de membrana. Embora os dois peptídeos tenham a mesma carga, a interação do análogo MSH-I com membrana de DMPG é muito mais evidente, sugerindo uma possível maior penetração do análogo na bicamada lipídica.

Além disso, o coeficiente de partição obtido para o peptídeo análogo, mais potente biologicamente, foi cerca de quatro vezes maior do que para o hormônio nativo. Assim, para uma mesma concentração de peptídeo ligado à membrana, foi observado que o efeito do MSH-I sobre a estrutura da membrana é um pouco maior do que do α -MSH, o que estaria de acordo com uma possível penetração mais fundo na bicamada. Concordando com resultados obtidos por fluorescência (Ito *et al.*, 1993; Macêdo *et al.*, 1996).

Variando a concentração de íons foi observado que a ligação dos peptídeos com bicamadas aniónicas de DMPG diminui com o aumento da força iônica, indicando que a interação eletrostática é um pré-requisito necessário para que possa ocorrer uma subsequente interação hidrofóbica. A necessidade da interação eletrostática também foi observada pela não interação dos peptídeos com bicamadas neutras de DMPC.

Os resultados com CD indicam que ambos os peptídeos adquirem uma pequena porcentagem de estrutura tipo- β após interação com vesículas ou micelas aniónicas. Este resultado, juntamente com a sugestão de que uma estrutura tipo dobra- β favoreceria a maior atividade dos peptídeos, reforça a idéia da relevância da fase lipídica na atividade biológica dos mesmos, sendo que a bicamada atuaria como um catalisador favorecendo uma determinada conformação da molécula.

O resultados apresentados aqui devem ser considerados somente como uma indicação do que realmente poderia acontecer em um sistema biológico, uma vez que foram obtidos com um sistema modelo bastante simplificado. Com estas considerações, nossos dados sugerem que o peptídeo mais potente, MSH-I é o que apresenta maior constante de associação e poderia ir mais fundo na membrana, consequentemente perturbando mais a estrutura da bicamada. Considerando o fato de que o empacotamento lipídico estaria relacionado com a atividade de algumas proteínas de membrana (ver Gibson e Brown, 1993; McCallum e Epand, 1995), poderia se considerar que a interação do MSH-I com bicamadas lipídicas teria a função de aumentar a atividade biológica do peptídeo, induzindo uma conformação apropriada do receptor. Por outro lado, a superpotência do MSH-I seria parcialmente explicada pelo seu alto coeficiente de partição na membrana, o que levaria a um aumento da concentração local de receptores. Adicionalmente, a prolongada atividade biológica em células de cultura, após lavagem com sal (Hadley *et al.*, 1985), poderia estar relacionada a sua maior afinidade pela fase lipídica, de acordo com algumas sugestões de que o análogo MSH-I seria de alguma forma seqüestrado pelos receptores de melanotropinas que se encontram na membrana (Hadley *et al.*, 1985).

6. Referências Bibliográficas

- ABDEL-MALEK, Z.; SWOPE, V.B.; SUZUKI, I.; AKCALI, C.; HARRIGER, M.D.; BOYCE, S.T.; URABE, K.; HEARING, V.J. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.1789-93, 1995.
- ABRAGAM, A.; PRYCE, M.H.L. Theory of nuclear hyperfine structure of paramagnetic resonance spectra in crystals. *Proc. Roy. Soc. (London)*, v.205, p.135, 1951.
- ADLER, A.J.; GREENFIELD, N.J.; FASMAN, G.D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol.*, v.27, p.675-735, 1973.
- AL-OBEIDI, F.; HADLEY, M.E.; MONTGOMERY, P.; HRUBY, V.J. Design of new class of superpotent cyclic α -melanotropins based on quenched dynamic simulations. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.111, p.3413-6, 1989.
- AL-OBEIDI, F.; HRUBY, V.J.; HADLEY, M.E.; SAWYER, T.K.; CASTRUCCI, A.M. Design, synthesis and biological activities of a potent and selective α -melanotropin antagonist. *Int. J. Pept. Protein Res.*, v.35, p.228-34, 1990.
- AROCA, P.; URABE, K.; KOBAYASHI, T.; TSUKAMOTO, K.; HEARING, V.J. Melanin biosynthesis patterns following stimulation. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.25650-5, 1993.
- BACKLUND, B.M.; WIKANDER, G.; PEETERS, T.L.; GRASLUND, A. Induction of secondary structure in the peptide hormone motilin by interaction with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1190, p.337-44, 1994.
- BALES, B.L. Inhomogeneously broadened spin-label spectra. In: Berliner L.J. *Biological Magnetic Resonance - Spin Labeling - Theory and Applications*. Vol.8, New York, Academic Press, 1989. p.77-130.
- BATEMBURG, A.M.; de KRUIJFF, B. Modulation of membrane surface curvature by peptide-lipid interaction. *Biosci. Rep.*, v.4, p.299-307, 1988.
- BAYLEY, P.M.; NIELSEN, E.B.; SCHELLMAN, J.A. The rotatory properties of molecules containing two peptides groups: Theory. *J. Phys. Chem.*, v.73, p.228-43, 1969.
- BERLINER, L.J., (Ed). *Spin Labeling, Theory and Applications*, New York, Academic Press, 1976.

- BERLINER, L.J., (Ed). *Spin Labeling, Theory and Applications*, New York, Academic Press, 1978.
- BERLINER; L.J.; REUBEN, J., (Ed). *Biological Magnetic Resonance - Spin Labeling - Theory and Application*, New York, Academic Press, 1989.
- BERTAGNA, X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol Metab Clin North Am.* v.23, p.467-85, 1994.
- BHARDWAJ, R.S.; LUGER, T.A. Proopiomelanocortin production by epidermal cells: Evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch. Dermatol. Res.*, v.287, p. 85-90, 1994.
- BHATTACHARYYA, K.; BASAK, S. Fluorescence study of melanocyte stimulating hormones in AOT reverse micelles. *Biophys. Chem.*, v.47, p.21-31, 1993.
- BIAGGI, M.H.; SCHREIER, S.; CASTRUCCI, A.M.; LAMY-FREUND, M.T. Interaction of melanotropic peptides with lipid membranes, *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, v.680, p.459-61, 1993
- BIAGGI, M.H.; PINHEIRO, T.J.; WATTS, A.; LAMY-FREUND, M.T. Spin label and ²H-NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.*, v.24, p.252-9, 1996.
- BIAGGI, M.H.; RISKE, K.A.; LAMY-FREUND, M.T. Melanotropic peptides-lipids bilayers interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog, *Biophys. Chem.*, v.67, p.139-49, 1997.
- BITBOL, M.; DEVAUX, P.F. Measurement of outward translocation of phospholipids across human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85, p. 6783-7, 1988.
- BOLOTINA, I.A.; LUGAUSKAS, V.J. Determination of protein secondary structure from circular dichroism spectra. 4. Consideration of contribution of aromatic amino acid residues to the circular dichroism spectra of proteins in the peptide region. *Mol. Biol.*, v.19, p.1154-66, 1985.
- BORISSEVITCH, G.P.; TABAK, M.; OLIVEIRA, O.N. Interaction of dipyridamole with lipids in mixed Langmuir monolayers. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.1278, p.12-8, 1996.
- BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.*, v.138, p.149-78, 1980.
- BRIERE, R.; LEMAIRE, H.; RASSAT, A. Nitroxides. XV. Synthèse de radicaux libres stables piperidiniques et pyrrolidinique. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, v.32, p.3273-83, 1965.
- BRIERE, R. et al. Nitroxides. XXI. Mise en évidence par résonance paramagnétique électronique de l'effet spécifique des sels sur la solvation des radicaux nitroxides. *J. Chim. Phys.*, v. 63, p.1575-6, 1966.
- BRIGGS, M.S.; CORNELL, D.G.; DLUHY, R.A.; GIERASCH, L.M. Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science*, v.233, p.206-8, 1986.
- BURCHILL, S.A.; THODY, A.J.; ITO, E.S. Melanocyte-stimulating hormone tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and

- pheomelanogenesis in hair follicular melanocytes of the mouse. *J. Endocrinol.*, v.109, p.15-21, 1986.
- CANNON, B.; POLNASZEK, C.F.; BUTLER, K.W.; ERIKSSON, L.E.; SMITH, I.C. The fluidity and organization of mitochondrial membrane lipids of the brown adipose tissue of cold-adapted rats and hamsters as determined by nitroxide spin probes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.167, p.508-18, 1975.
- CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. Techniques for the study of biological structure and function. In: *Biophysical Chemistry*, v.2, cap. 8, San Francisco, W.E Freeman and Company, 1980. p. 409-14.
- CARNIE, S.; ISRAELACHVILI, J.N; PAILTHORPE, B.A. Lipid packing and transbilayer asymmetries of mixed lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.554, p.340-57, 1979.
- CARRINGTON, A.; MCLACHLAN, A.D. *Introduction to Magnetic Resonance (with applications to chemistry and chemical physics)*. New York, Harper & Row, 1967.
- CASTRUCCI, A.M.; HADLEY, M.E.; SAWYER, T.K.; WILKES, B.C.; AL-OBEIDI, F.; STAPLES, D.J.; DE VAUX, A.E.; DYM, O.; HINTZ, M.F.; RIEHM, J.P. et al. α -Melanotropin: The minimal active sequence in lizard skin bioassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.73, p.157-63, 1989.
- CASTUMA, C.E.; BRENNER, R.R.; DELUCCA-GATTAS, E.A.; SCHREIER, S.; LAMY-FREUND, M.T. Cholesterol modulation of lipid-protein interactions in liver microsomal membrane: a spin label study. *Biochemistry*, v.30, p. 9492-7, 1991.
- CATANIA, A.; LIPTON, J.M. α -Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocrin. Rev.*, v.14, p.564-76, 1993.
- CEVC, G.; WATTS, A.; MARSH, D. Titration of phase of phosphatidylserine bilayer membranes. Effects of pH, surface electrostatics, ion binding, and head-group hydration. *Biochemistry*, v.20, p.4955-65, 1981.
- CEVC, G. Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1062, p.59-69, 1991.
- CHAKRABORTY, A.K. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta.* v.1313, p.130-8, 1996.
- CHAPMAN, D.; GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GOÑI, F.M. Intrinsic protein-lipid interactions. *FEBS Lett.*, v.98, p.211-23, 1979.
- CHATTOPADHYAY, A.; LONDON, E. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilising fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*, v.26, p.39-45, 1987.
- CHEN, Y.-H.; YANG, J.T.; MARTINEZ, H.M. Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry*, v.11, p.4120-31, 1972.
- CHEN, Y.-H.; YANG, J.T.; CHAU, K.H. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*, v.13, p.3350-9, 1974.

- CHAKRABORTY, A.K.; PLATT, J.T.; KIM, K.K.; KWON, B.S.; BENNETT, D.C.; PAWELEK, J.M. Polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin by pMel17/silver locus protein. *Eur. J. Biochem.*, v.236, p.180-8, 1996.
- CHOU, P.Y.; FASMAN, G.D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry*, v.13, p.222-45, 1974.
- DREGER, M., KRAUSS, M.; HERRMANN, A.; HUCHO, F. Interactions of the nicotinic receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor-rich membranes. *Biochemistry*, v. 36, p.839-47, 1997.
- DUYSENS L.N.M. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, v.19, p.1-12, 1956.
- DZUBA, S.A.; MARYASO, A.G.; SALIKHOV, K.M.; TSVETKOV, YU. D. Super slow rotations of nitroxide radicals studied by pulse EPR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* v.58, p.95-117, 1984.
- ELLENA, J.F. Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.940, p.63-70, 1988.
- ERNANDES, J.R.; EPAND, R.M.; SCHREIER, S. Studies on the complex formed between glucagon and dicaprylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.733, p.75-86, 1983.
- FAJER, P.; THOMAS, D.D.; FEIX, J.B.; HYDE, J.S. Measurement of rotational molecular motion by time-resolved saturation transfer electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.*, v.50, p.1195-202, 1986.
- FAROOQUI, J.Z.; MEDRANO, E.E.; ABDEL-MALEK, Z.; NORDLUND, J. The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. *Ann. N.Y. Acad. Sci USA.*, v.680, p.508-10, 1993.
- FASMAN, G.D. Detecting transmembrane helices by CD. In: Fasman G.D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. New York, Plenum Press, 1996. p. 381-412.
- FREED, J.H. Theory of slow tumbling ESR spectra for nitroxides. In: Berliner L.J. *Spin Labeling. Theory and Applications*. Vol. I, New York, Academic Press, 1976. p.53-132.
- FREISLEBEN, H.J.; RUCKERT, S.; WIERNSPERGER, N.; ZIMMER, G. The effects of glucose, insulin and metformin on the order parameters of isolated red cell membranes - An electron paramagnetic resonance spectroscopic study. *Biochem. Pharmacol.*, v.43, p.1185-94, 1992
- FUJII, G. Liposomal amphotericin B (AmBisome): Realization of the drug delivery concept. In: *Vesicles - Surfactant science series*, vol. 62, p.491-526, ed. Rosoff, M. New York, Marcel Dekker, Inc, 1996
- GAFFNEY, B.J.; McCONNELL, H.M. The paramagnetic resonance spectra of spin labels in phospholipid membranes. *J. Magn. Res.*, v.9, p.474-85, 1974.
- GAFFNEY, B.J. Practical considerations for the calculation of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. In: Berliner L.J. *Spin Labeling. Theory and Applications*. Vol. I. New York, Academic Press, 1976. p.567-71.

- GE, M.; FREED, J.H. An electron spin resonance study of interactions between gramicidin A' and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.*, v.65, p.2106-23, 1993.
- GELDWERTH, D.; DE KERMEL, A.; ZACHOWSKI, A.; GUERBETTE, F.; KADER, J.C.; HENRY, J.P.; DEVAUX, P.F. Use of spin-labeled and fluorescent lipids to study the activity of the phospholipid transfer protein from maize seedlings. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1082, p.255-64, 1991.
- GENNIS, R.B. *Biomembranes - Molecular Structure and Function*. New York, Springer-Verlag Inc., 1989.
- GODICI, P.E.; LANDSBERGER, F.R. The dynamic structure of lipid membranes. A ¹³C nuclear magnetic resonance study using spin labels. *Biochemistry*, v.13, p.362-8, 1974.
- GOLDMAN, S.A.; BRUNO, G.V.; POLNASZEK, C.F.; FREED, J.H. An ESR study of anisotropic rotational reorientation and slow tumbling in liquid and frozen media. *J. Chem. Phys.*, v.56, p.716-35, 1972.
- GORRISSEN, H.; MARSH, D.; RIETVELD, A.; DE KRUIJFF, B. Apocytochrome c binding to negatively charged lipid dispersions studied by spin-label electron spin resonance. *Biochemistry*, v.25, p.2904-10, 1986.
- GREENFIELD, N.J.; FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for evaluation of proteins. *Biochemistry*, v.8, p.4108-16, 1969.
- GRIFFITH, O.H.; DEHLINGER, P.J.; VAN, S.P. Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (Evidence for water penetration in biological membranes). *J. Membrane Biol.*, v.15, p.159-92, 1974.
- GRIFFITH, O.H.; JOST, P.C. Lipid spin labels in biological membranes. In: Berliner L.J. "Spin Labeling. Theory e Applications" v. I., New York, Academic Press, 1976. p. 453-523
- HADLEY, M.E.; HRUBY, V.; JIANG, J.; SHARMA, S.D.; FINK, J.L.; HASKELL-LUEVANO, C.; BENTLEY, D.L.; AL-OBEIDI, F.; SAWYER, T.K. Melanocortin receptors: Identification and characterization by melanotropic peptide agonists and antagonists. *Pigment Cell. Res.*, v.9, p.213-34, 1996.
- HADLEY, M.E.; LEVINI, N. Hormonal control of melanogenesis In: Levini N. e. Maiback H. I. *Pigmentation and pigmentary disorders*. New York, CRC Press, Boca Raton, 1993. p.133-46.
- HALABAN, R.; TYRRELL, L.; LONGLEY, J.; YARDEN, Y.; RUBIN, J. Pigmentation and proliferation of human melanocytes and effects of melanocyte stimulating hormone and ultraviolet B light. In: Vaudry, H. e Eberle A.N. *The Melanotropic Peptides*, Ann N Y Acad Sci., v.680, 1993. p.290-301.
- HALABAN, R.; LERNER A.B. The dual effect of melanocyte-stimulating hormone (MSH) on the growth of cultures mouse melanoma cells. *Exp. Cell Res.*, v.108, p.111-7, 1977.
- HAMEKA, H.F. *Advanced Quantum Mechanics*. Oxford, Pergamon, 1965.
- HARRIS, J.; POWER, T.J.; BIEBER, A.L.; WATTS, A. An electron-spin-resonance spin-label study of the interaction of purified Mojave toxin with

- synaptosomal membranes from rat brain *Eur. J. Biochem.*, v.131, p.559-65, 1983.
- HIEMENZ, P.C. Principles of Colloid and Surface Chemistry. In *Undergraduate Chemistry*, ed. Lagowski, J.J. v.9, New York, Marcel Dekker Inc, 1986
- HEIMBURG, T.; BILTONEN, R.L. Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry*, v.33, p.9477-88, 1994.
- HEMMINGA, M.A.; JAGER, P.A. de. Saturation transfer spectroscopy of spin labels: techniques and interpretation of spectra. In: Berliner L.J *Biological Magnetic Resonance - Spin Labeling - Theory and Applications*. Vol.8, New York, Academic Press, 1989. p.131-78.
- HOPE M.J.; BALLY, M.B.; WEBB, G.; CULLIS, P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta.*, v.812, p.55-65, 1986.
- HRUBY, V.J.; WILKES, B.C.; HADLEY, M.E.; AL-OBEIDI, F.; SAWYER, T.K.; STAPLES, D.J.; deVAUX, A.E.; DYN, O.; CASTRUCCI, A.M.L.; HINTZ, M.E.; RIEHM, J.P.; RANGA RAO, K. α -Melanotropin: The minimal active sequence. I. Frog skin bioassay., *J. Med. Chem.*, v.30, p.2126-30, 1987.
- HRUBY, J. et al. Conformational and biological analysis of α -MSH fragment analogues with sterically constrained amino acid residues. *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* v.53, p.2549-73, 1988.
- HSIA, J.C.; PIETTE, L.H. Spin-labeling as a general method in studying antibody active site. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.129, p.296-307, 1969.
- HUANG, C. Studies on phosphotidylcholine vesicles formation and physical characteristics. *Biochemistry*, v.8, p. 344-9, 1969.
- HUBBEL W.L.; McCONNELL, H.M. Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.93, p. 314-26, 1971
- HYDE, J.S.; DALTON, L.R. Saturation-transfer spectroscopy. In: *Spin Labeling. Theory and Applications*. Ed. Berliner L.J. Vol.2, p.1-70, New York, Academic Press, 1979.
- ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, v.72, p. 1525-68, 1976.
- ISRAELACHVILI, J.N.; MARCELJA, S.; HORN, R. Physical principles of membrane organization, *Q. Rev. Biophys.*, v.13, p. 121-200, 1980.
- ISRAELACHVILI, J.N. *Intermolecular e Surface Forces*. 2.ed. Londres, Academic Press, 1985
- ITO, A.S.; CASTRUCCI, A.M.; HRUBY, V.J.; HADLEY, M.E.; KRAJCARSKI, D.T.; SZABO, A.G. Structure-activity correlation of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry*, v.32, p.12264-72, 1993.

- JACCHIERI, S.G.; ITO, A.S. Characterization of structural transitions from aqueous solution to a lipid phase for α -MSH. *Int. J. Quant. Chem.*, v.53, p.335-41, 1995.
- JACCHIERI, S.G.; ITO, A.S. Análise conformacional de MSH e de seu análogo MSH1. In: ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 18., Caxambú, 1995. *Resumos*. São Paulo, S.B.F., 1995.
- JIANG, J.; SHARMA, S.D.; NAKAMURA, S.; LAI, J.Y.; FINK, J.L.; HRUBY, V.J.; HADLEY, M.E. The melanotropic peptide, [$\text{Nle}^4\text{D-Phe}^7\alpha$]-MSH, stimulates human melanoma tyrosinase activity and inhibits cell proliferation. *Pigment Cell. Res.*, v.8, p.314-23, 1995.
- JOHNSON, W.C., Jr. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, v.17, p.145-66, 1988.
- JOHNSON, W.C., Jr. Protein secondary structure and circular dichroism? A practical guide. *Proteins*, v.7, p.105-14, 1990.
- JOHNSON, W.C., Jr. Determination of the Conformation of Nucleic Acids By Electronic CD. In: Fasman G.D. *Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York, Plenum Press, 1996. p. 433-67
- de JONGH, H.H.J.; GOORMAGHTIGH, E.; KILLIAN, A. Analysis of circular dichroism spectra of oriented protein-lipid complexes: toward a general application. *Biochemistry*, v.33, p.14521-8, 1994a.
- de JONGH, H.H.J.; BRASSEUR, R.; KILLIAN, A. Orientation of the α -helices of Apocitochrome c and derived fragments at membrane interfaces, as studied by circular dichroism. *Biochemistry*, v.33, p.14529-35, 1994b.
- JOST, P.C. LIBERTINI, L.J.; HEBERT, V.C.; GRIFFITH, O.H. Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along of motion along acid chains. *J. Mol. Biol.*, v.59, p.77-98, 1971.
- KALLENBACH, N.R.; Lyu, P.; Zhou, H. CD Spectroscopy and the Helix-Coil Transition in Peptides and Polypeptides. In: "Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules" ed. Gerald D. Fasman, p.201-60, New York, Plenum Press, 1996.
- KAISER, E.T.; KÈZDY, F.J. Amphiphilic secondary structure: Design of peptide hormones. *Science*, v.223, p.249-55, 1984.
- KAISER, E.T.; KÈZDY, F.J. Secondary structures of proteins and peptides in amphiphilic environments (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.80, p.1137-43, 1983.
- KAISER, E.T.; KÈZDY, F.J. Peptides with affinity for membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, v.16, p.561-81, 1987.
- KLEINSCHMIDT, J.H.; MAHANEY, J.E.; THOMAS, D.D.; MARSH, D. Interaction of bee venom melittin with zwitterionic and negatively charged phospholipid bilayers: a spin-label electron spin resonance study. *Biophys J.* v.72, p.767-78, 1997.
- KNOWLES, P.F.; MARSH, D.; RATTLE, H.W.E. ESR Applied to Biomolecules. In: Magnetic Resonance of Biomolecules. London, John Wiley & Sons, 1982. p.237-295.

- KROON, de A.I.P.M.; GIER, de J.; KRUIJFF, de B. The effect of a membrane potential on the interaction of mastoporan X, a mitochondrial presequence, and several regulatory peptides with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1068, p.111-24, 1991.
- LAJZEROWICZ-BONNETEAU, J. Molecular Structures of Nitroxides. In: Berliner, L.J. *Spin Labeling - Theory and Applications*. New York, Academic Press, 1976. p.239-48.
- LANGE, A.; MARSH, D.; WASSMER, K.H.; MEIER, P.; KOTHE, G. Electron spin resonance study of phospholipid membranes employing a comprehensive line-shape model, *Biochemistry*, v.24, p.4383-92, 1985.
- LANGEVIN, D. Structure of Reversed Micelles. In: Pilani, M.P *Structure and Reactivity in Reverse Micelles.*, Amsterdam, Elsevier, 1989. p.13-43.
- LASIC, D.D. Liposomes in drug delivery. In: Rosoff, M. *Vesicles - Surfactant science series*, vol. 62, New York, Marcel Dekker, Inc, 1996. p.447-89
- LISSI,E.; BIANCONI, M.L.; AMARAL, A.T.; PAULA, E.; BLANCH, L.E.B.; SCHREIER, S. Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta.* , v.1021, p.46-50, 1990.
- LIU, P.Y. et al. The possible role of α -, β - and γ -melanocyte stimulating hormone-containing keratinocytes in the initiation of vitiligo vulgaris. *Eur. J. Dermatol.*, v.5, p.625-30, 1995.
- LOXSOM, F.M.; TTERLIKIS, L.; RHODES, W. non-perturbation method for the optical properties of helical polymers. *Biopolymers*, v.10, p.2405-20, 1971.
- LUNEC, J.; PIERON, C.; SHERBET, G.V.; THODY, A.J. Alpha-melanocyte-stimulating hormone immunoreactivity in melanoma cells. *Pathobiology*, v.58, p.193-7, 1990.
- MACÊDO, Z.S.; FURQUIM, T.; ITO, A.S Estimation of average depth of penetration of melanotropins in DMPG vesicles. *Biophys. Chem.*, v.59, p.193-202, 1996.
- MADISON, V.; SCHELLMAN, J. Optical activity of polypeptides and proteins. *Biopolymers*, v.11, p.1041-76, 1972.
- MAO, D.; WALLACE, B.A. Differential light scattering and absorption flattening optical effects are minimal in the circular dichroism spectra of small unilamellar vesicles. *Biochemistry*, v.23, p.76-85, 1984.
- MARSH, D. Molecular motion in phospholipid bilayers in gel phase: Long axis rotation. *Biochemistry*, v.19, p.1632-7, 1980.
- MARSH, D. Electron spin resonance: spin labels. In: Greel E. *Membrane Spectroscopy*, Berlin, Springer-Verlag, 1981. p.51-142
- MARSH, D. Experimental Methods in Spin-Label Spectral Analysis. In: Berliner L.J. *Spin Labeling. Theory and Applications*. Volume 8., New York, Academic Press, 1989. p.255-303.
- MEIER, P.; BLUME, A.; OHMES, E.; NEUGEBAUER, F.A.; KOTHE, G.; Structure and dynamics of phospholipid membranes: An electron spin resonance study employing biradical probes. *Biochemistry*, v.21, p.526-34, 1982.

- McCALLEY, R.C.; SHIMSHICK, E.J.; McCONNELL, H.M. The effect of slow rotational motion on paramagnetic resonance spectra. *Chem. Phys. Lett.* v.13, p.115-9, 1972.
- MOFFITT, W. Optical rotatory dispersion of helical polymers. *J. Chem. Phys.*, v.25, p.736-46, 1956.
- MONTICH, G.G.; MARSH, D. Interaction of α -Lactalbumin with phosphatidylglycerol. Influence of protein binding on the lipid phase transition and lipid acyl chain mobility. *Biochemistry*, v.34, p.13139-45, 1995.
- MORHENN V.B. The physiology of scratching: Involvement of proopiomelanocortin gene-coded proteins-Langerhans cells. *Prog. Neuro. Endocr. Immunol.*, v.4, p.265-7, 1991.
- MOSCOWITZ, A. Theoretical aspects of optical activity. Part one: Small molecules. *Adv. Chem. Phys.* v.4, p. 67-112, 1962.
- MUELHER, P. et al. *Circulation*, v.26, p.1167-88, 1962
- NAKAMURA, M.; SEKINO, N.; IWAMOTO, M.; OHNO-IWASHITA, Y. Interaction of θ -Toxin (Perfringolysin O) a cholesterol-binding cytolysin, with liposommal membranes: change in the aromatic side chains upon binding and insertion. *Biochemistry*, v.34, p.6513-20, 1995.
- NORDIO, P.L. General magnetic resonance theory. In: Berliner L.J. *Spin Labeling. Theory and Applications*. Vol. I., New York, Academic Press, 1976. p.5-52
- OHNISHI, S.-i.; McCONNELL, H.M. Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.87, p.2293-8, 1965.
- PARK, K.; PERCZEL, A.; FASMAN, G.D. Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by deconvolution of circular dichroism spectra of membrane proteins. *Protein Sci.*, v.1, p.1032-49, 1992.
- PASENKIEWICZ-GIERULA, M.; SUBCZYNSKI, W.K.; KUSUMI, A. Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine-cholesterol membranes: Fluid-phase microimmiscibility in unsaturated phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Biochemistry*, v.29, p.4059-69, 1990.
- PASCHER, I.; LUNDMARK, M.; NYHOLM, P.G.; SUNDELL, S. Crystal structures of membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* v.113, p.339-373, 1992.
- PAWELEK, J.M.; CHAKRABORTY, A.K.; OSBER, M.P.; ORLOW. S.J.; MIN. K.K.; ROSENZWEIG, K.E.; BOLOGNIA., J.L. Molecular cascades in UV-induced melanogenesis: A central role for melanotropins? *Pigment Cell Res.*, v.5, p.348-56, 1992.
- PECZEL, A.; HOLLÓSI, M.; TUSNÁDY, G.; FASMAN, G.D. Convex constraint analysis: A natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng.*, v.4, p.669-79, 1991.
- PÉREZ-GIL, J.; CASALS, C.; MARSH, D. Interactions of hydrophobic lung surfactant SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by spin resonance spectroscopy. *Biochemistry*, v.34, p. 3964-71, 1995.

- PERTINHEZ, T.A.; NAKAIE, C.R.; CARVALHO, R.S.; PAIVA, A.C.; TABAK, M.; TOMA, F.; SCHREIER, S. Conformational changes upon binding of a receptor loop to lipid structures: possible role in signal transduction. *FEBS Lett.*, v.375, p.239-42, 1995.
- POLNASZEK, C.F.; MARSH, D.; SMITH, I.C.P. Simulation of the EPR spectra of the cholestane spin probe under conditions of slow axial rotation. Application to gel phase dipalmitoyl phosphatidylcholine. *J. Magn. Reson.* v.43, p. 54-64, 1981.
- PRESTI, F.T.; CHAN, S.I. Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. 1. cholestane spin-label studies of phase behavior of cholesterol-phospholipid liposomes. *Biochemistry*, v.21, p.3821-30, 1982.
- PTAK, M.; EGRET-CHARLIER, M.; SANSON, A.; BOULOUSSA, O. A NMR study of the ionization of fatty acids, fatty amines and N-acyl-amino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. *The Biochim. Biophys. Acta.*, v.600, p.387-97, 1980.
- PYSH E.S. The calculated ultraviolet optical properties of polypeptide β -configurations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 56, p. 825-32, 1966
- REDFIELD, A.G. The theory of relaxation processes. *Adv. Magn. Reson.*, v.1, p. 1, 1965.
- REIF, F. *Fundamentals of Statistical and Thermal Physics*. Singapore, McGraw-Hill Co.,1965.
- RIETVELD, A.; PONJEE, G.A.; SCHIFFERS, P.; JORDI, W.; VAN DE COOLWIJK, P.J.; DEMEL, R.A.; MARSH, D.; DE KRUIJFF, B.. Investigations on the insertion of the mitochondrial precursor protein apocytochrome c into model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.818, p.398-409, 1985.
- RIGAUD, J.L.; PITARD, B.; LEVY, D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1231, p.223-46, 1995
- RISKE, K.A.; POLITI, M.J.; REED, W.F.; LAMY-FREUND, M.T. Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions. *Chem. Phys. Lipids*, v.89, p.31-44, 1997.
- ROTTEN, S.; HUBBELL, W.L.; HAYFLICK, L.; MCCONNELL, H.M. Motion of fatty acid spin labels in the plasma membrane of mycoplasma. *Biochim. Biophys. Acta.*,v.219, p.104-13, 1970.
- SARGENT S.; SCHWYZER, R. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.83, p.5774-8, 1986.
- SARGENT S.; BEAN, J.W.; SCHWYZER, R. Conformation and orientation of regulatory peptides on lipid membranes. Key to molecular mechanism of receptor selection. *Biophys. Chem.* v.31, p.183-93, 1988.
- SAXENA, V.P.; WETLAUFER, D.B. A new basis for interpreting the circular dichroic spectra of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.68, p.969-72, 1971.
- SAWYER, T.K.; SANFILIPPO, P.J.; HRUBY, V.J.; ENGEL, M.H.; HEWARD, C.B.; BURNETT, J.B.; HADLEY, M.E. 4-Norleucine, 7-D-Phenylalanine- α -

- melanocyte stimulating hormone: A highly potent melanotropin with ultra long biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.77, p.5754-8, 1980.
- SAWYER, T.K.; HRUBY, V.J.; HADLEY, M.E.; ENGEL, M.H. α -Melanocyte stimulating hormone: chemical nature and mechanism of action. *Amer. Zool.*, v.23, p.529-40, 1983.
- SAWYER, T.K.; STAPLES, D.J.; CASTRUCCI, A.M.; HADLEY, M.E.; AL-OBEIDI, F.A.; CODY, W.L.; HRUBY, V.J. α -Melanocyte stimulating hormone message and inhibitory sequences: comparative structure-activity studies on melanocytes. *Peptides*, v.11, p.351-8, 1990.
- SCHELLMAN, J.A.; ORIEL, P. Origin of the Cotton effect of helical polypeptides. *J Chem. Phys.*, v.37, p.2114-24, 1962.
- SCHIFF, L.I. *Quantum Mechanics*, 3^a. edição, New York, McGraw-Hill Book Company, 1968.
- SCHINDLER, H.; SEELIG, J. ESR spectra of spin labels in lipid bilayers. *J. Chem. Phys.*, v.59, p.1841-50, 1973.
- SCHINDLER, H.; SEELIG, J. ESR spectra of spin labels in lipid bilayers II. Rotation of steroid spin probes. *J. Chem. Phys.* v.61, p.2946-9, 1974.
- SCHNEIDER, D.J.; FREED, J.H. Calculation slow motional magnetic resonance spectra. In: Berliner L.J. *Spin Labeling. Theory and Applications*. Vol. 8. New York, Academic Press, 1989. p.1-76
- SCHREIER-MUCCILLO, S.; MARSH, D.; SMITH, I.C.P. Monitoring the permeability profile of lipid membranes with spin probes. *Arch. Biochemistry and Biophysics*, v. 172, p.1-11, 1976.
- SCHREIER, S.; POLNASZEK, C.F.; SMITH, I.C.P. Spin labels in membranes. Problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.515, p.375-436, 1978.
- SCHWYZER, R. Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry*, v.25, p.6335-41, 1986.
- SEGEI, Y.V.; YANG, J.T. Determination of protein secondary structure. In: Gerald D. Fasman *Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York, Plenum Press, 1996. p. 69-107.
- SHEETZ, M.P.; CHAN, S.I. Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers. *Biochemistry*, v.11, p.4573-81, 1972.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, p.720-31, 1972.
- SЛИCHTER, C.P. *Principles of Magnetic Resonance*. New York, Harper, 1963.
- SMITH, I.C.P. A spin label study of the organization and fluidity of hydrated phospholipid multibilayers – a model membrane system. *Chimia*, v.25, p.349-80, 1971.
- SMITH, I.C.P.; SCHREIER-MUCCILLO, S.; MARSH, D. Spin Labelling. In: Pryor, W.A. *Free radicals in biology*. Vol. I, New York, Academic Press, 1976. p.149-97.
- STEVENS, E.S. Carbohydrates. In: Fasman G.D. *Circular Dicroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York, Plenum Press, 1996. p. 501-29.

- STRICKLAND E.H. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, v.2, p.113-75, 1974.
- SUBCZYNSKI, W.K.; HYDE, J.S.; KUSUMI, A. Oxygen permeability of phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86, p.4474-8, 1989.
- SUBCZYNSKI, W.K.; MARKOWSKA, E.; GRUSZECKI, W.I.; SIELEWIESIUK, J. Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1105, p.97-108, 1992.
- SUBCZYNSKI, W.K.; WISNIEWSKA, A.; YIN, J.J.; HYDE, J.S.; KUSUMI, A. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry*, v.33, p.7670-81, 1994.
- SWOPE, V.B.; MEDRANO, E.E.; SMALARA, D.; ABDEL-MALEK, Z.A.. Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens α -melanotropin, endothelin-1, and basic fibroblast growth factor. *Exp. Cell Biol.*, v.217, p.453-9, 1995.
- SZOKA, F.; OLSON, F.; HEATH, T.; VAIL, W.; MAYHEW, E.; PAPAHADJOPOULOS, D. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.601, p.559-7, 1980.
- TERZI E.; HÖLZEMANN, G.; SEELIG, J. Alzheimer β -amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry*, v.33, p.7434-41, 1994.
- THODY, A.J.; RIDLEY, K.; PENNY, R.J.; CHALMERS, R.; FISHER, C.; SHUSTER, S. MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides*, v.4, p.813-6, 1983.
- THODY, A.J.; SHUSTER, S. Control and function of sebaceous glands. *Physiol. Rev.*, v.69, p.383-416, 1989.
- THOMAS, D.D.; DALTON, L.R.; HYDE, J.S. Rotational diffusion studied by passage saturation transfer electron paramagnetic resonance. *J. Chem. Phys.* v. 65, p.3006, 1976.
- TRÄUBLE, H.; TEUBNER, M.; WOOLLEY, P.; EIBL, H.. Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. *Biophys. Chem.*, v.4, p.319-42, 1976.
- URRY, D.; LONG, M.M. Ultraviolet absorption, circular dichroism, and optical rotatory dispersion in biomembrane studies. In: Andreoli, T.E; Hoffman, J.F. e Fanestil, D.D. *Membrane Physiology*, New York, Plenum Medical, 1980. p.107-24
- VENKATACHALAN, C.M. Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three peptide units. *Biopolymers*, v.6, p. 1425-36, 1968.

- VENYAMINOV.S.Y.; YANG, J.T. Determination of protein secondary structure. In: Gerald D. Fasman *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, New York, Plenum Press, 1996. p. 69-107.
- VOET, D.; VOET, J.G. *Biochemistry*. 1.ed. EUA, John Wiley & Sons, Inc., 1990. Cap. 11, p.271-304: Lipids and Membranes.
- WAKAMATSU, K.; GRAHAM, A.; COOK, D.; THODY, A.J. Characterization of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. *Pigment Cell Res.*, v.10, p.288-97, 1997.
- WERTHEIM, G.K.; BUTLER, M.A.; WEST, K.W.; BUCHANAM, D.N.E. Determination of the Gaussian and Lorentzian content of experimental line shapes. *Rev. Sci. Instrum.* v.45, p. 1369-71, 1974. .
- WINTZEN, M.; GILCHREST, B. A. Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, v.106, p.673-8, 1996.
- WOODY, R.W. Optical properties of polypeptides in the β -conformation. *Biopolymers*, v.8, p.669-83, 1969.
- WOODY, R.W. Studies of theoretical circular dichroism of polypeptides. contributions of β -turns. In: Blout E.R., Bovey F.A., Goodman M., e Lotan N., *Peptides, Polypeptides, and Proteins*, New York, VCH Publishers, 1974. p. 59-84.
- WOODY, R.W. Circular dichroism of peptides. In: Hruby V.J., *The Peptides*, vol.7, New York, Academic Press, 1985. p. 15-114.
- WOODY, R.W. Circular dichroism and conformation of unordered polypeptides. *Adv. Biophys. Chem.* v.2, p.37-79, 1992.
- WOODY, R.W. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In: Gerald D. Fasman *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, , New York, Plenum Press, 1996. p. 25- 67
- WOODY, R.W.; TINOCO, I., Jr. Optical rotation of oriented helices. III. Calculation of the rotatory dispersion and circular dichroism of alpha- and 3_{10} -helix. *J. Chem. Phys.*, v. 46, p. 4927-45, 1967.
- WU C-S.C, et al. Conformation of beta-endorphin analogues in cerebroside sulfate solution. *Mol. Pharmacol.*, v.19, p.302-6, 1981.
- WU, C-S.C.; YANG, J.T. Sequence-dependent conformations of short polypeptides in a hydrophobic environment. *Mol. Cell. Biochem.*, v.40, p.109-22, 1981.
- YAMAOKA, K.; UEDA, K.; KOSAKO, I. Far-ultraviolet electric linear dichroism of poly(γ -methyl-L-glutamate) in hexafluoro-2-propanol and the peptide band in the 187-250 nm wavelength region. *J. Am. Chem. Soc.*, v.108, p.4619-25, 1986.
- YANG, J.T.; WU, C.-S.C.; MARTINEZ, H.M. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.*, v.30, p.208-69, 1986.
- YIN J.-J.; FEIX, J.B.; HYDE, J.S. Mapping of collision frequencies for stearic acid spin labels by saturation-recovery electron paramagnetic resonance. *Biophys. J.* v.53, p.521-31, 1988.

7 Apêndice

ARTIGOS PUBLICADOS

Referência A

Título: Interaction of Melanotropic Peptides with Lipid Membranes.
Autores: M.H. Biaggi; S. Schereier; A.M.L. Castrucci e M.T. Lamy-Freund
Revista: *Annals New York Academy of Sciences USA*
Volume: 680, Ano: 1993 , Página inicial: 459 Página final: 461

Referência B

Título: Spin label and ^2H -NMR studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers.
Autores: Biaggi, M.H.; Pinheiro, T.J.; Watts, A.; Lamy-Freund, M.T.
Revista: *European Biophysical Journal*
Volume: 24, Ano: 1996, Página inicial: 252 Página final: 259

Referência C

Título: Melanotropic peptides-lipids bilayers interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog.
Autores: Biaggi, M.H.; Riske, K.A.; Lamy-Freund, M.T.
Revista: *Biophysical Chemistry*
Volume: 67, Ano: 1997, Página inicial: 139 Página final: 149

Referência D

Título: How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies
Autores: Costa, E.J.X.; Shida, C.S.; Biaggi, M.H.; Ito, A.S.; Lamy-Freund, M.T.
Revista: *FEBS Letters*
Volume: 416, Ano: 1997, Página inicial: 103 Página final: 106.

Referência A

Interaction of Melanotropic Peptides with Lipid Membranes.

Interaction of Melanotropic Peptides with Lipid Membranes^a

M. H. BIAGGI,^b S. SCHIREIER,^c A. M. L. CASTRUCCI,^d
AND M. T. LAMY-FREUND^{b,c}

^bInstituto de Física
^cInstituto de Química
^dInstituto de Biociências
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

Although the melanotropic peptides most certainly interact with protein receptors on the melanocyte/melanoma cell membrane, the lipid phase is supposed to be important as a catalyst for the peptide-receptor interaction.¹ The present work studies the interaction of the tridecapeptide α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) and the biologically more active analogue [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH, with pure lipid bilayers, through the analysis of the electron paramagnetic resonance (EPR) signal of the 3-doxyl cholestearine spin label (CSL) incorporated in the lipid phase. Oriented multibilayers were prepared with dimyristoylphosphatidyl choline (DMPC) and dimyristoylphosphatidyl glycerol (DMPG), both preparations containing 10% of cholesterol (in moles) necessary for organizing the oriented films.² Both peptides are positively charged at physiological pH, and display stronger interaction with the negatively charged bilayer (DMPG) than with the neutral one (DMPC). The effect of the peptides on the degree of organization and dynamics of the oriented bilayers was analyzed by calculating the order parameter S , related to the angular amplitude of motion of the CSL long molecular axis, and the correlation time τ , related to the rotation rate of the steroid about its long axis.³ FIGURE 1 shows that while the natural hormone decreases both S and τ , the analogue causes an opposite effect on DMPG + 10% cholesterol membranes.

Similar results, though less evident, were obtained with the same lipids organized in isotropic liposomes. Considering the difficulty in separating order from mobility in the analysis of the EPR spectra of spin probes incorporated in liposomes, the effect of the peptides on the membrane fluidity was monitored by the ratio of the low field/center field EPR line heights (h_{+1}/h_0). An increase in h_{+1}/h_0 is proportional to both a decrease in order and/or an increase in mobility.³ FIGURE 2a shows the h_{+1}/h_0 ratios obtained at different temperatures, above the lipid phase transition. In agreement with the results obtained for oriented bilayers (FIGURE 1), it is evident that while α -MSH decreases lipid fluidity the analogue increases the fluidity. However, when DMPG liposomes were prepared without cholesterol, both peptides were found to decrease membrane fluidity, as shown in FIGURE 2b, with [$\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7$]- α -MSH displaying a stronger effect.

In non-cholesterol-containing membranes, both peptides cause the ordering effect already observed for divalent cations,⁴ or cationic molecules.⁵ These latter

^a Financial support: CNPq, FAPESP, BIID, FINEP.

^b Author to whom correspondence should be addressed at Universidade de São Paulo, Instituto de Física, C. Postal 20516, CEP 01498-970, São Paulo, S.P., Brasil.

substances are supposed to interact at the membrane surface, neutralizing part of the surface charge, allowing for a better packing of the lipids. A specific hydrophobic interaction between peptides and lipids should also contribute to the packing of the latter, as both peptides are equally charged and $[Nle^4,D-\text{Phe}^7]\alpha\text{-MSH}$ is slightly more effective in altering membrane fluidity. Considering the well-known condensing effect of cholesterol on liquid-crystalline membranes,² the present work shows that the interaction of $\alpha\text{-MSH}$ with lipid membranes depends both on membrane charge and degree of packing, although a specific interaction between $\alpha\text{-MSH}$ and cholesterol, or cholesterol-rich domains, cannot be ruled out. Cholesterol is an important component in biological membranes and has been found to modulate the activity of several membrane proteins.⁶ The different interactions of the two peptides with lipid membranes might be related to their different conformations in both aqueous and lipid phases, or at the aqueous/lipid interface, and could partially explain their different biological activities.

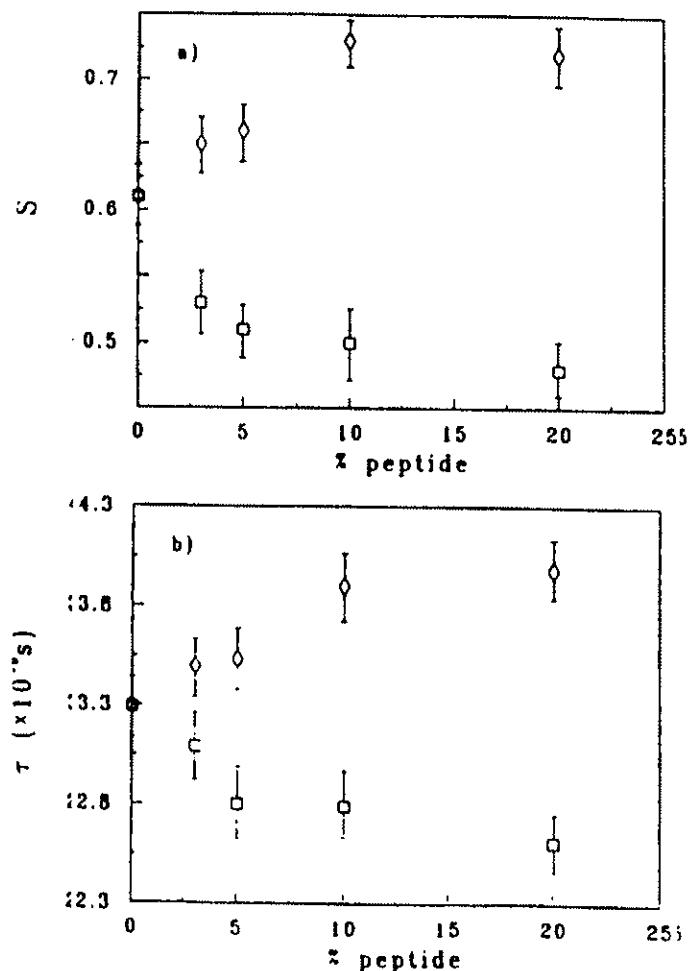


FIGURE 1. Effect of melanotropic peptides on DMPG + 10% cholesterol oriented films. Order parameter S (a) and rotational correlation time τ (b) of CSL incorporated in oriented multilayers of DMPG + 10% cholesterol, in the presence of 10% $\alpha\text{-MSH}$ (squares) and $[Nle^4,D-\text{Phe}^7]\alpha\text{-MSH}$ (diamonds), at 40°C. Cholesterol and peptide concentrations are reported as mole percent of phospholipid.

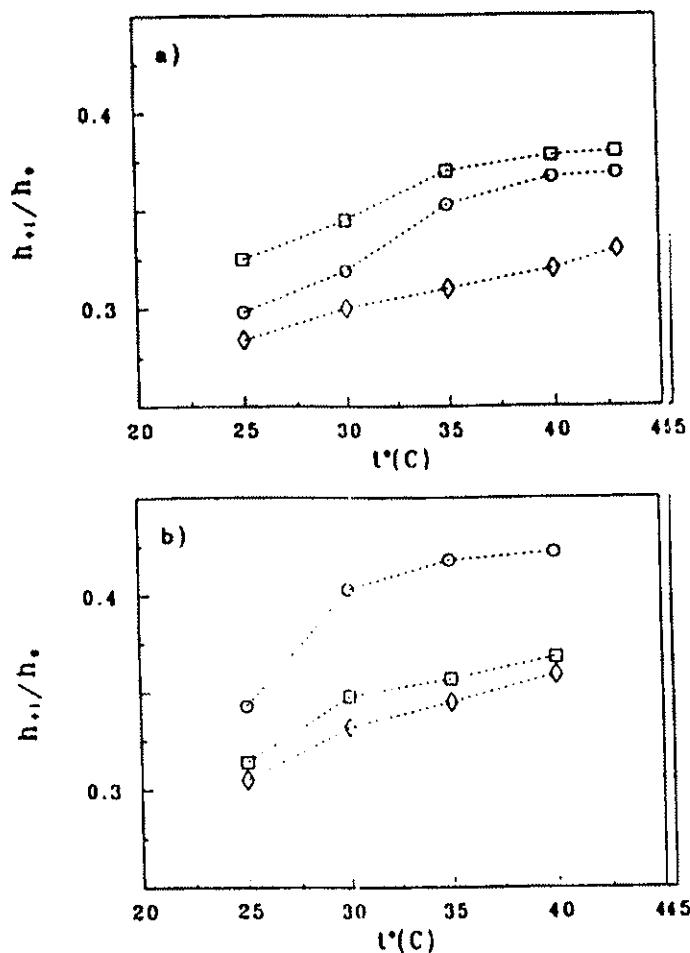


FIGURE 2. Temperature dependence of the effect of melanotropic peptides on DMPG liposomes. h_{+1}/h_0 values calculated from the EPR spectra of CSL incorporated in DMPG + 10% cholesterol (a) and DMPG vesicles (b), in the presence of 10% α -MSH (squares) and $[\text{Nle}^4, \text{D-Phe}^7]\text{-}\alpha\text{-MSH}$ (diamonds), and in the absence of peptide (circles).

REFERENCES

- SARGENT, D. F. & R. SCHWYZER. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 5774-5778.
- SCHREIER-MUCILLO, S., D. MARCH, H. DUGAS, H. SCHNEIDER & I. C. P. SMITH. 1973. Chem. Phys. Lipids **10**: 11-27.
- SCHREIER, S., C. F. POLNASZEK & I. C. P. SMITH. 1978. Biochim. Biophys. Acta **515**: 375-436.
- TRAUBLE, H. & H. EIBLE. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**: 2214-219.
- SEELIG, A. & P. M. MACDONALD. 1989. Biochemistry **28**: 2490-2496.
- CASTUMA, C. EJ., R. R. BRENNER, E. A. DELUCCA-GATTAS, S. SCHREIER & M. T. LAMY-FREUNID. 1991. Biochemistry **30**: 9492-9497.

Referência B

Spin label and $^2\text{H-NMR}$ studies on the interaction of melanotropic peptides with lipid bilayers

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

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

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

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

Received: 21 November 1995 / Accepted: 19 January 1996

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Correspondence to: M. Teresa Lamy-Freund

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

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

Materials and methods

Materials

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

ESR sample preparation

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

NMR sample preparation

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

ESR spectroscopy

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

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

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

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

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

where $2A_{\min}$ is the measured inner hyperfine splitting (Griffith and Jost 1976; Gaffney 1976). The polarity was normalized from a'_0/a_0 where

$$a'_0 = (1/3)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$$

and

$$a_0 = (1/3)(A_{||} + 2A_{\perp})$$

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

NMR spectroscopy

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

Results and discussion

ESR of stearic acid and phospholipid spin labels

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

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

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

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

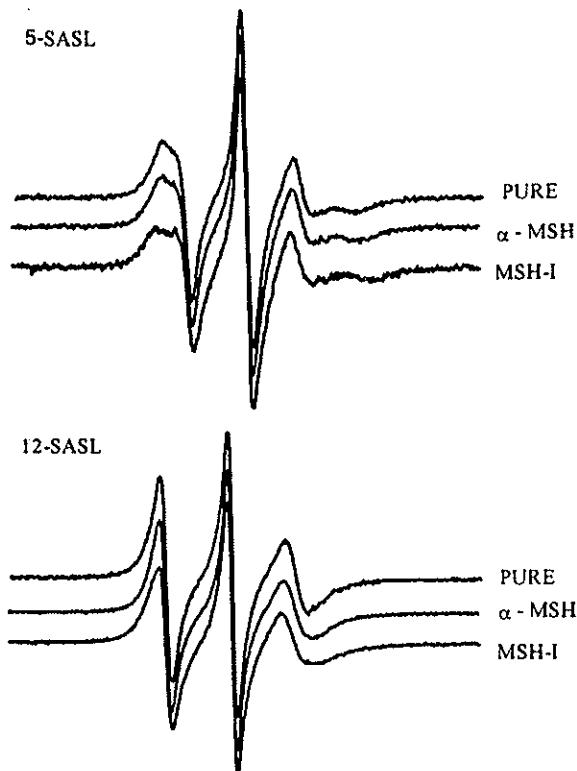


Fig. 1. ESR spectra of 5-SASL and 12-SASL incorporated in DMPG liposomes in the absence and in the presence of 10 mol% peptide. Total spectrum width is 100 G. T=40 °C

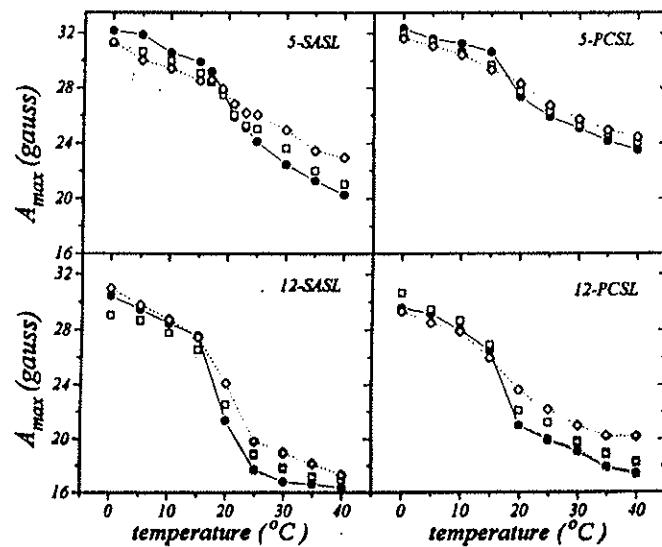


Fig. 2. Temperature profiles of maximum hyperfine splitting (A_{max}) of different acyl chain spin labels incorporated in DMPG liposomes in the presence of 0, (●), and 10 mol% α -MSH (□) and MSH-I (◇)

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

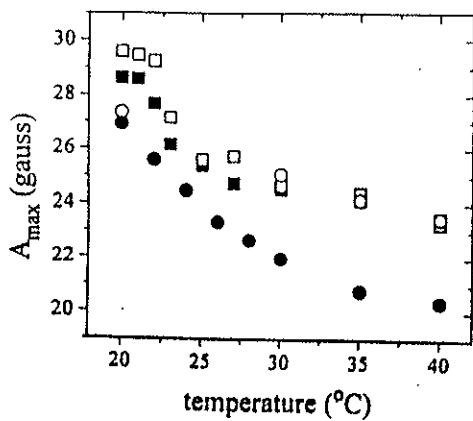


Fig. 3. Temperature dependence of A_{\max} values of 5-SASL (filled symbols) and 5-PCSL (open symbols) in DMPC (■ and □) and DMPG (● and ○) membranes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

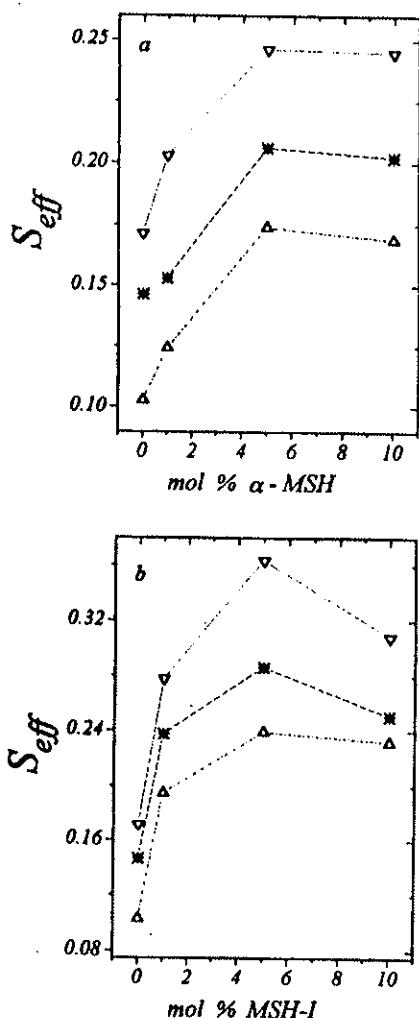


Fig. 4. Dependence of the effective order parameter (S_{eff}) of 12-SASL in DMPG liposomes on the mole fraction of α -MSH a and MSH-I b at 30 °C (▽), 35 °C (*) and 40 °C (△)

ESR of cholestan spin label

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

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

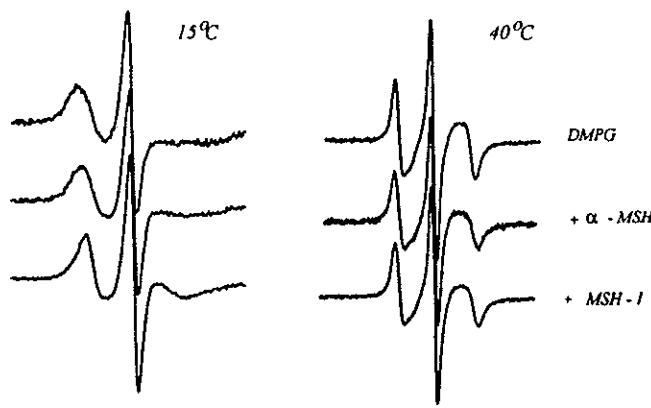


Fig. 5. ESR spectra of CSL incorporated in DMPG liposomes in the absence and in the presence of 10 mol% peptide, below and above the lipid main phase transition. Total spectra width is 100 G

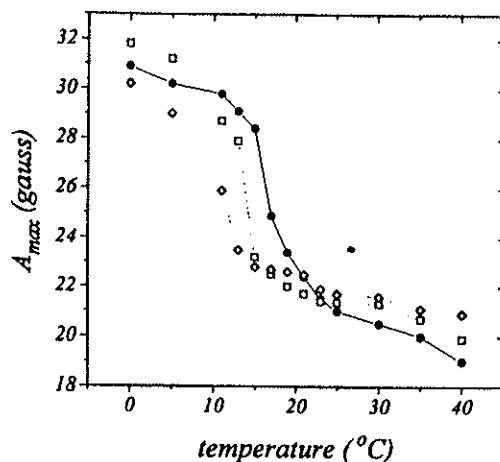


Fig. 6. Temperature profiles of maximum hyperfine splitting (A_{max}) of CSL incorporated in DMPG liposomes in the presence of 0 (●), and 10 mol% α -MSH (□) and MSH-I (◇)

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

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

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

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

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

NMR of headgroup deuterated DMPG-d₅ and DMPC-d₄

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

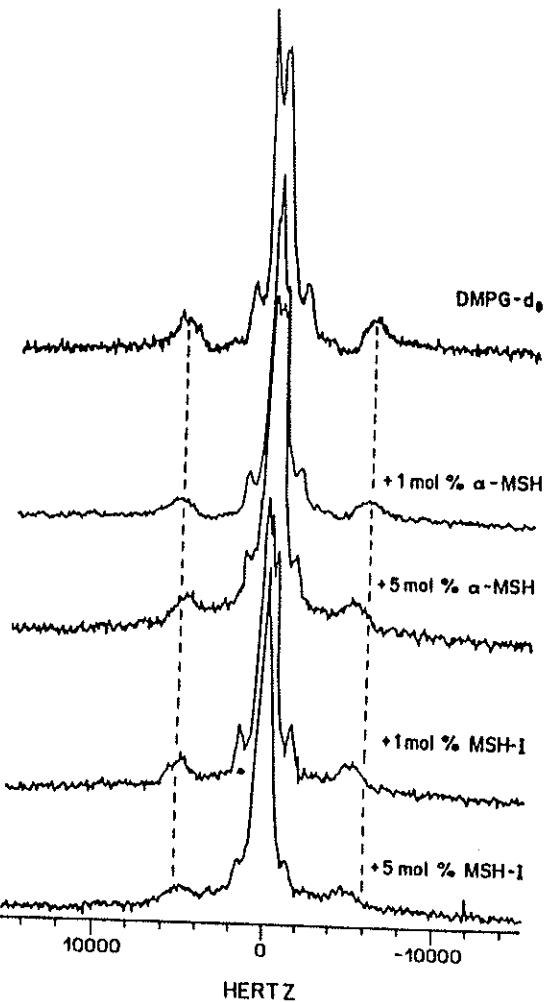


Fig. 7. Deuterium quadrupolar NMR spectra of DMPG-d5 liposomes in the presence of different concentrations of α -MSH and MSH-I

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

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

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

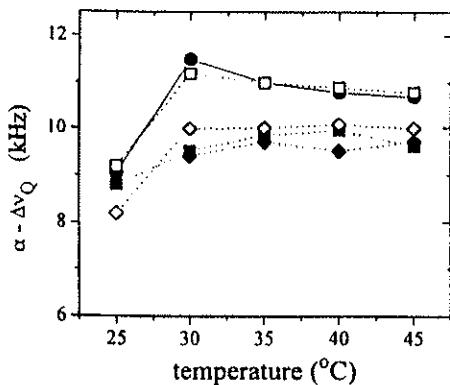


Fig. 8. Temperature dependence of the α -quadrupolar splitting ($\alpha - \Delta\nu_Q$) of headgroup deuterated DMPG in the presence of 0 (●), 1 (□) and 5 mol% α -MSH (■) and 1 (◇) and 5 mol% of MSH-I (◆)

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

| | $\alpha\text{-CD}_2$ | $\beta\text{-CD}$ | $\gamma\text{-CD}_2$ |
|--------------------|--------------------------------------|-------------------|----------------------|
| DMPG | 17.0 ± 0.4 (5.4) ^a | 14.0 ± 0.9 | 19.2 ± 0.2 |
| + 1% α -MSH | 15.5 ± 0.8 (5.9) | 14.0 ± 0.7 | 18.7 ± 0.1 |
| + 5% α -MSH | 14.8 ± 0.8 (6.2) | 14.9 ± 0.4 | 18.2 ± 0.1 |
| + 1% MSH-I | 15.2 ± 0.5 (6.1) | 14.0 ± 0.8 | 17.8 ± 0.5 |
| + 5% MSH-I | 14.0 ± 1.0 (6.6) | 14.0 ± 0.9 | 18.6 ± 0.6 |

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

where $(e^2 qQ/h)$ is the static quadrupolar splitting constant.

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

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

groups. Upon interaction with PG membranes, other cationic molecules have been found to decrease the lipid $\alpha\text{-CD}_2$ quadrupolar splitting (Beschiashvili and Seelig 1990; Marassi and Macdonald 1991) and decrease both the splitting values and the spin-lattice relaxation times (Sixl et al. 1984; Sixl and Watts 1985).

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

General discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

- Beschiaschvili G, Seelig J (1990) Peptide binding to lipid membranes spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers. *Biochemistry* 29: 52–58
- Biagi M, Schreier S, Castrucci AML, Lamy-Freund MT (1993) Interaction of melanotropic peptides with lipid membranes. *Ann NY Acad Sci* 680: 459–461
- Brown MF, Seelig J (1977) Ion-induced changes in head group conformation of lecithin bilayers. *Nature (London)* 269: 721–723
- Brown MF, Seelig J, Häberlen U (1979) Structural dynamics in phospholipid bilayers from deuterium spin-lattice relaxation time measurements. *J Chem Phys* 70: 5045–5053
- Castrucci AML, Sawyer TK, Al-Obeidi F, Hruby VJ, Hadley ME (1990) Melanotropic peptide antagonists: Recent discoveries and biomedical implications. *Drugs of the Future* 15: 41–55
- Cvec G, Watts A, Marsh D (1983) Non-electrostatic contribution to the titration of the ordered-fluid phase transition of phosphatidylglycerol bilayers. *FEBS Lett* 120: 267–270
- Davis JH (1983) The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by $^2\text{H-NMR}$. *Biochim Biophys Acta* 737: 117–171
- Ellena JF, Archer SJ, Dominey RN, Hill BD, Cafiso DS (1988) Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 940: 63–70
- Gaffney BJ (1976) Practical considerations for the calculation of order parameters for fatty acid or phospholipid spin labels in membranes. In: Berliner LJ (ed) *Spin Labelling. Theory and Applications*, vol I. Academic Press, New York, pp 567–571
- Godici PE, Landsberger FR (1974) The dynamic structure of lipid membranes. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study using spin labels. *Biochemistry* 13: 362–368
- Griffith OH, Jost PC (1976) Lipid spin labels in biological membranes. In: Berliner LJ (ed) *Spin Labelling. Theory and Applications*, vol I. Academic Press, New York, pp 453–523
- Heimburg T, Biltonen RL (1994) Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry* 33: 9477–9488
- Ito AS, Castrucci AML, Hruby J, Hadley ME, Krajcelski T, Szabo A (1993) Structure-activity correlations of melanotropin peptides in model lipids by tryptophan fluorescence studies. *Biochemistry* 32: 12264–12272
- Lange A, Marsh D, Wassmer K-H, Meier P, Kothe G (1985) Electron spin resonance study of phospholipid membranes employing a comprehensive line-shape model. *Biochemistry* 24: 4383–4392
- Macêdo ZS, Furquim T, Ito AS (1996) Estimation of average depth of penetration of melanotropins in DMPG vesicles. *Biophys Chem* (in press)
- Marassi FM, Macdonald PM (1991) Response of the headgroup of phosphatidylglycerol to membrane surface charge as studied by deuterium and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 30: 10558–10566
- Marsh D (1980) Molecular motion in phospholipid bilayers in gel phase: Long axis rotation. *Biochemistry* 19: 1632–1637
- Marsh D (1981) Electron spin resonance: spin labels. In Grell E (ed) *Membrane Spectroscopy*. Springer, Berlin, pp 51–142
- Pascher I, Lundmark M, Nyholm P-G, Sundell S (1992) Crystal structures of membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* 1113: 339–373
- Pinheiro TJT, Duralski A, Watts A (1994) Phospholipid headgroup-headgroup electrostatic interactions in mixed bilayers of cardiolipin with phosphatidylecholines studies by $^2\text{H NMR}$. *Biochemistry* 33: 4896–4902
- Presti FT, Chan SI (1982) Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. I. Cholestanate spin-label studies of phase behavior of cholesterol-phospholipid liposomes. *Biochemistry* 21: 3821–3830

Referência C

Melanotropic peptides-lipids bilayers interaction. Comparison of the hormone α -MSH to a biologically more potent analog.



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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

1. Introduction

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

Several modifications made within the primary structure of α -MSH have yielded peptides with superpotent activity [1,6]. The present work focuses on the native hormone α -MSH and the analog [N le⁴, D-Phe⁷]- α -MSH (hereafter referred to as MSH-I), wherein norleucine was substituted for methionine, and D-phenylalanine was substituted for the L-enantiomer. The latter was reported to exhibit an increased potency and prolonged activity in the frog skin bioassay when compared to the native molecule [1]. It was suggested that the increased potency of MSH-I could be attributed to a reverse turn within the α -MSH_{4–10} sequence which would be conformationally-stabilized by the D-Phe⁷ substitution [7]. Though the prolonged activity of MSH-I *in vivo* could be ascribed to its resistance to degradative inactivation by serum enzymes, its ultra-long action *in vitro* remains to be understood. It was suggested [1] that MSH-I could be sequestered into some compartment of the membrane, possibly irreversibly bound to a receptor.

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

which would enhance the peptide–receptor interaction.

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

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

2. Materials and methods

2.1. Materials

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

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

2.2. ESR sample preparation

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

2.3. CD sample preparation

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

2.4. ESR spectroscopy

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

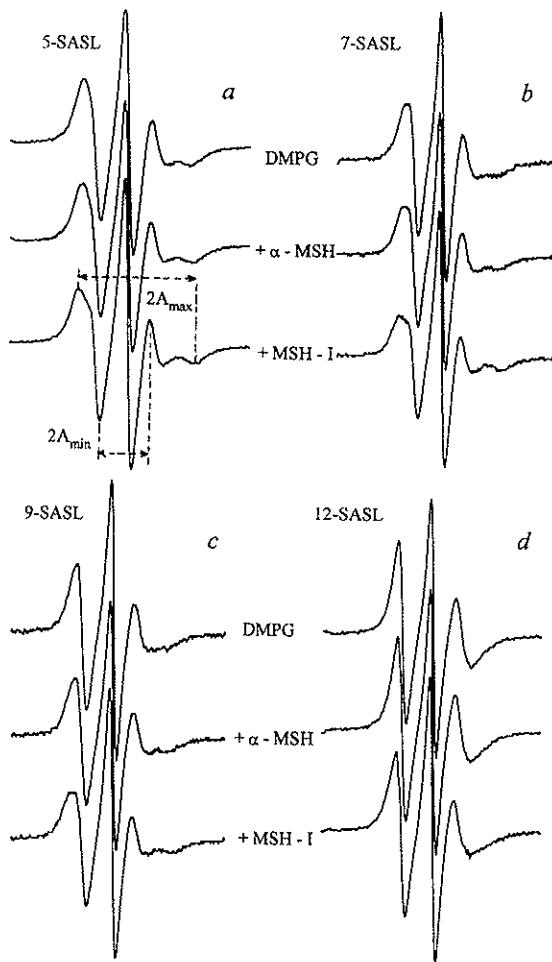


Fig. 1. ESR spectra of stearic acid spin label positional isomers, n-SASL, in DMPG dispersion (10 mM Hepes, pH 7.4) in the absence and presence of 10 mol% of α -MSH or MSH-I. Total spectral width is 100 G. Temperature = 40°C .

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

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

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

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

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

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

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

and

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

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

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

2.5. Circular dichroism

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

3. Results and discussion

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

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

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

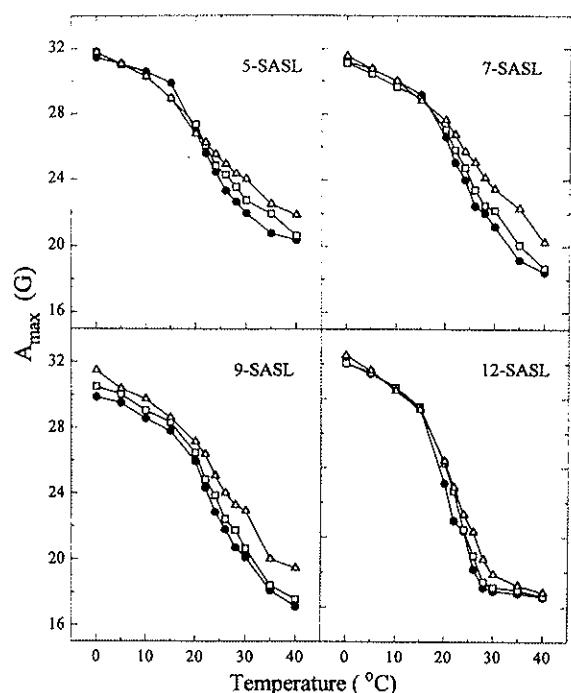


Fig. 2. Temperature dependence of the maximum hyperfine splitting constant, A_{\max} , of n-SASL stearic acid positional isomers in DMPG dispersion in the absence of peptide (●), and in the presence of 10 mol% of α -MSH (□) or MSH-I (\triangle).

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

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

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

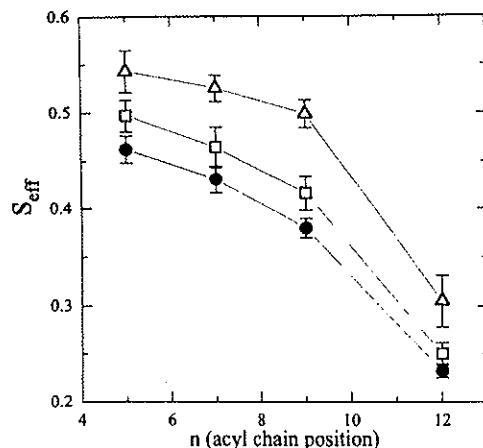


Fig. 3. Effective order parameter, S_{eff} , as a function of the nitroxide position, n -SASL stearic acid isomers in DMPG dispersion in the absence of peptide (●) and in the presence of 10 mol% of α -MSH (□) or MSH-I (△). Temperature = 30°C.

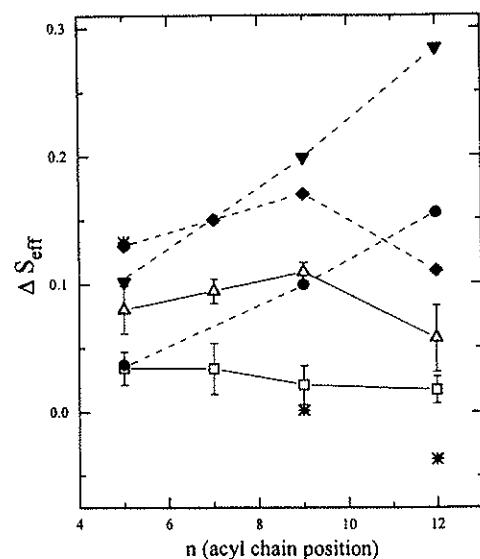


Fig. 4. Depth profiles of the variation of the effective order parameter, S_{eff} , relative to the pure lipid bilayer, of stearic acid positional isomers in DMPG dispersions, in the presence of 10 mol% of α -MSH (□) and MSH-I (△), and 0.3 M NaCl (★). Temperature = 30°C. The profiles are compared to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

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

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

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

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

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

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

3.2. ESR of spin labels at the bilayer interface

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

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

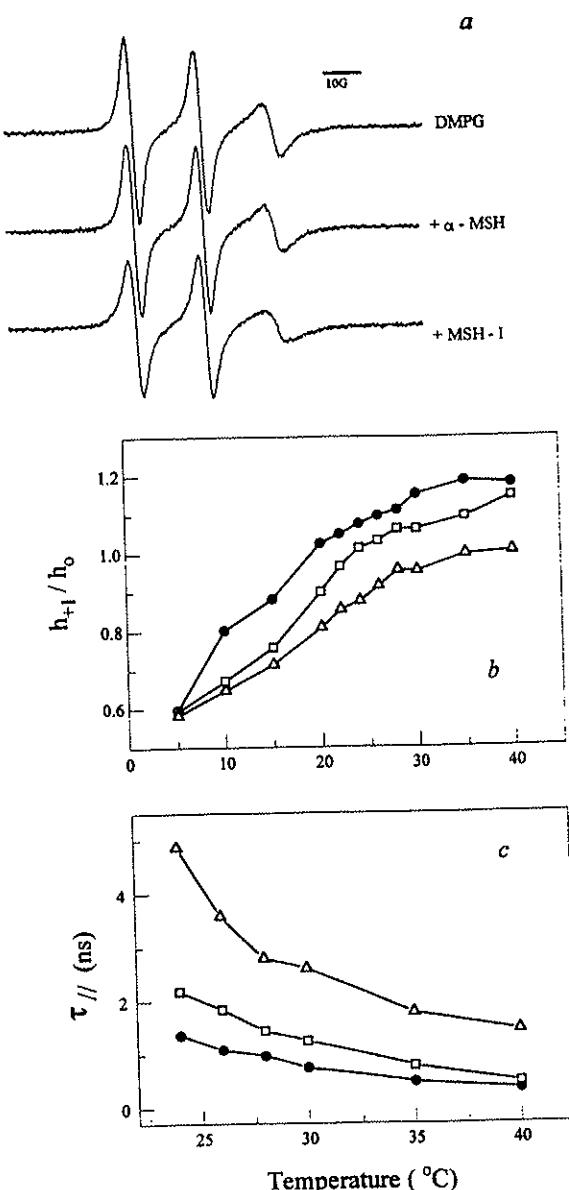


Fig. 5. Dependence of the ESR spectra of SSL in DMPG liposomes on the presence of 10 mol% of α -MSH (\square) or MSH-I (\triangle). (\bullet) corresponds to pure DMPG dispersions. (a) ESR spectra at a temperature of 30°C. Temperature variation of (b) the ratio between the amplitude of the lines corresponding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

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

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

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

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

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

3.3. Peptides–membrane partition coefficient

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

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

K_p is defined as

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

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

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

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

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

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

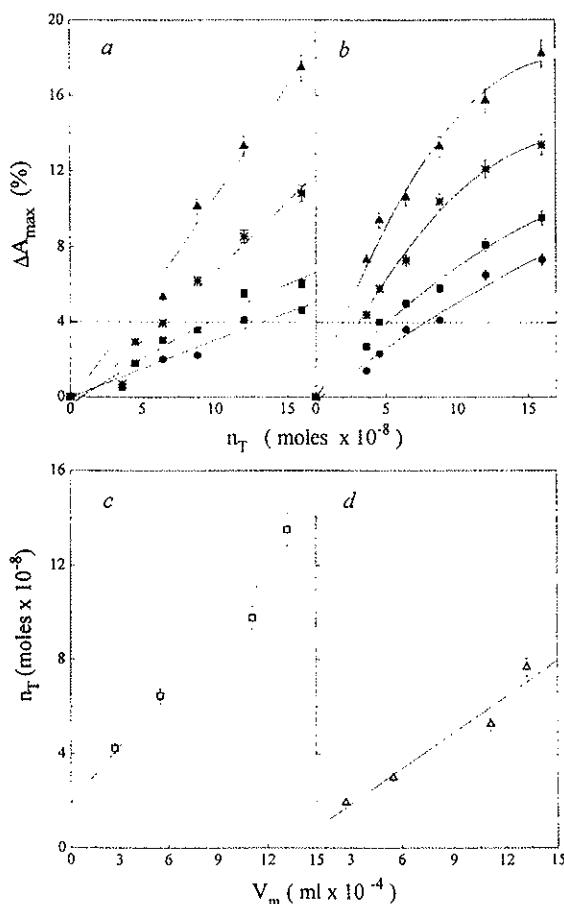


Fig. 6. Effect of (a) α -MSH and (b) MSH-I on the maximum hyperfine splitting, A_{\max} , parameter of 5-SASL in DMPG dispersions lipid concentration (mg/ml): (\blacktriangle) 3.4, (\star) 6.9, (\blacksquare) 13.8, (\bullet) 16.0. The dashed lines parallel to the abscissa generate sets of n_T and V_M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

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

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

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

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

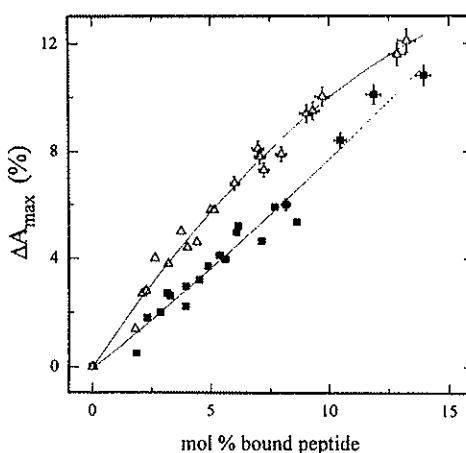


Fig. 7. Dependence of the outer hyperfine splitting of 5-SASL in DMPG dispersions (10 mM Hepes, pH 7.4), on the actual concentration of α -MSH (■) or MSH-I (\triangle) bound to the liposomes ((moles of bound peptide/moles of DMPG) $\times 100$).

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

3.4. Circular dichroism

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

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

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

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

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

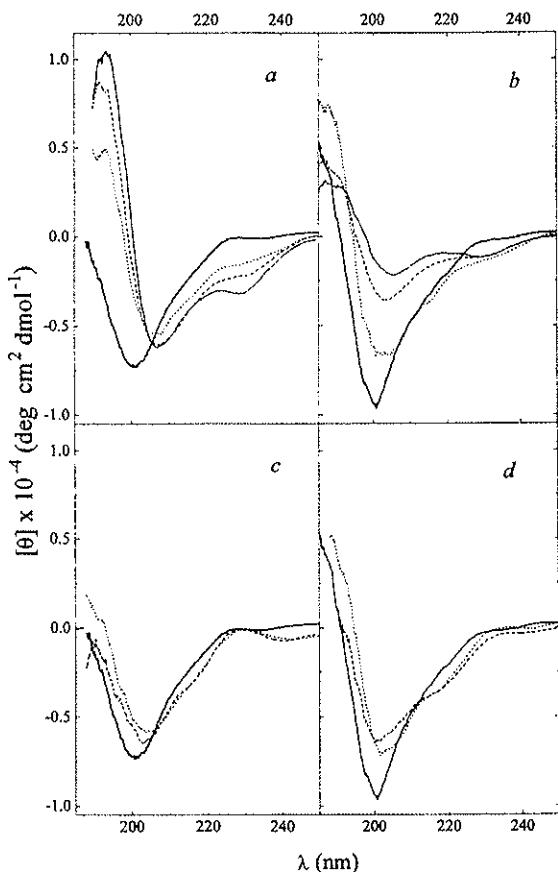


Fig. 8. CD spectra of α -MSH (a and c) and MSH-I (b and d), in 5 mM phosphate buffer, pH 7.4 (—). In a and b, the spectra were recorded in the presence of 50% (· · ·), 75% (— · —) and 100% (— · —) in volume of TFE, and in c and d in 40 mM SDS (· · ·) and 5 mM DMPG (— · —). Peptide concentration was 1.2×10^{-4}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

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

4. Concluding remarks

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

References

- [1] T.K. Sawyer, P.J. Sanfilippo, V.J. Hruby, M.H. Engel, C.B. Heward, K.B. Burnett, M.E. Hadley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 5754.
- [2] D.G. Klemes, K.L. Kreutzfeld, M.E. Hadley, W.L. Cody, V.J. Hruby, Biochem. Biophys. Res. Commun. 137 (1986) 722.
- [3] U. Rodeck, M. Herlyn, Cancer Res. 10 (1991) 89.
- [4] J. Jiang, S.D. Sharma, S. Nakamura, J.-Y. Lai, J.L. Fink, V.J. Hruby, M.E. Hadley, Pigment Cell Res. 8 (1995) 314.
- [5] A.M.L. Castrucci, T.K. Sawyer, F. Al-Obeidi, V.J. Hruby, M.E. Hadley, Drugs Future 15 (1990) 41.
- [6] V.J. Hruby, S.D. Sharma, K. Toth, J.Y. Jaw, F. Al-Obeidi, T.K. Sawyer, M.E. Hadley, Ann. NY Acad. Sci. 680 (1993) 51.
- [7] V.J. Hruby, W.L. Cody, A.M.L. Castrucci, M.E. Hadley, Collection Czech. Chem. Commun. 53 (1988) 2549.

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

Referência D

How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies

How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies

Ernane J.X. Costa¹, Claudio S. Shida, Márcia H. Biaggi, Amando S. Ito,
M. Teresa Lamy-Freund*

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

Received 24 July 1997

Abstract ESR spectra of spin labels placed at the membrane surface and at different depths of the bilayer core, and melatonin fluorescence in the presence of lipid vesicles, suggest an average shallow position for the hormone in the membrane. However, according to the melatonin ability to cross lipid bilayers, nitroxides placed deep in the bilayer were able to quench the melatonin fluorescence. Melatonin membrane partition coefficients were calculated for bilayers in different packing states, and similar and rather high values were found. The data presented here may be quite important to the understanding of melatonin physiological actions at the membrane level.

© 1997 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Melatonin; Lipid bilayer; Fluorescence;
Spin label

1. Introduction

Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine), a pineal hormone derived from tryptophan, has been reported to interact with many different cells, playing a number of distinct physiological roles. The hormone has been shown to participate in many biological process via its interaction with membrane protein receptors (for instance see [1–4]). On the other hand, melatonin's action as a free radical scavenger is well established [5–7], being effective in protecting DNA, membrane lipids and some cytosolic proteins. Supporting the idea that melatonin could cross the cell membrane barrier, it was shown that the hormone could cross pure lipid bilayers [8], therefore being able to act at the cytosol or nuclear levels. It was also shown that although melatonin partitions in lipid bilayers it is highly soluble in aqueous medium (up to 5×10^{-3} M) [9].

Considering the action of melatonin at the membrane level, both its interaction with membrane protein receptors and its role as a membrane antioxidant, it seems important to understand how melatonin interacts with lipid bilayers: how it partitions in the water/membrane system, how the bilayer changes the melatonin structure, how the hormone disrupts the lipid environment, and what the distribution profile of the hormone is inside the bilayer.

The present work uses the ESR signal of spin labels incorporated in lipid bilayers, and the melatonin fluorescence, to analyze the hormone's interaction with lipid vesicles. Stearic acids and phospholipids labeled at different positions along

the acyl chain and at the headgroup were used either as spin labels or as quenchers of the melatonin fluorescence. The well studied zwitterionic lipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) was chosen as the model membrane system, due to its very convenient main transition temperature, $T_m \approx 23^\circ\text{C}$, easily allowing studies with the membrane at the gel and liquid crystal phases, below and above T_m , respectively. Those two phases would mimic micro-regions of different packing in a biological membrane.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Melatonin, DMPC, the spin labels 5- and 12-SASL (5- and 12-doxylstearic acid spin label) and the cholestan spin label CSL were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The spin labels 5- and 12-PCSL (1-palmitoyl-2-[5- or 12-doxyl stearoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine) were obtained from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). SSL (stearamide spin label) was a gift from S. Schreier's laboratory, at the University of São Paulo. The buffer used was 10 mM HEPES (*N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) at pH 7.4. All reagents were used without further purification. Deionized double distilled water was used throughout.

2.2. Melatonin sample preparation

A concentrated melatonin solution, 10^{-3} M, was prepared either as described elsewhere [9], or by directly dissolving the powder in buffer using a bath-type sonicator. The integrity of melatonin prepared by the last method was checked by its light absorption and fluorescent emission spectra, and by biological activity measurements [10]. Diluted samples were prepared from the stock solution. The two preparations avoid the presence of even small amounts of organic solvent in the final melatonin solution.

2.3. ESR sample preparation

Stock solutions of spin labels were prepared in chloroform and stored at -80°C . The membranes were multilamellar dispersions of lipids (10 mM) containing 1 mol% of spin label. A lipid film was formed from a chloroform solution of lipids and spin labels, dried under a stream of N_2 and left under vacuum for a minimum of 5 h, to remove all traces of the organic solvent. Liposomes were prepared by the addition of the buffer solution, without or with the desired concentration of melatonin, followed by vortexing.

2.4. Fluorescence sample preparation

DMPC large unilamellar vesicles (LUV) were prepared by the method of extrusion [11], resulting in 2.5 ± 0.1 mM stock suspensions (inorganic phosphate was quantitated based on [12]). Lipid titration was performed by adding small amounts of the concentrated lipid vesicle suspension to 10^{-5} M melatonin aqueous solution. The lipid concentration varied from 0.1 to 2.0 mM. Appropriate corrections for volume changes were made. For the quenching experiments, the samples were prepared as described above for the ESR experiments, but with 10 mol% of spin label, prior to extrusion.

2.5. ESR spectroscopy

ESR measurements were performed in a Bruker ER 200D-SRC spectrometer interfaced with an IBM-PC like computer for spectrum

*Corresponding author. Fax: (55) (11) 8134334.
E-mail: mtlfreund@fge.if.usp.br

¹Present address: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP, Brazil.

digitalization. A field modulation amplitude of 0.08 mT and microwave power of 5 mW were used. The temperature was controlled to about 0.5°C with a Bruker B-ST 100/700 variable temperature device. The temperature was always monitored with a Fluka 51 K/J thermometer. The LOWFIT program (B. Bales) was used for the SSL spectrum simulations above the lipid transition temperature. For the measurement of several ESR spectrum parameters the ORIGIN software (MicroCal Software, Inc., MA, USA) was used. The data shown here are the mean values of at least three experiments, and the error bars are the calculated standard deviations.

2.6. Fluorescence spectroscopy

Melatonin fluorescence emission spectra ($\lambda_{ex} = 290$ nm) were registered in a Hitachi 3010 spectrofluorimeter, interfaced with an IBM-PC like computer, and were corrected for the instrumental sensitivity variation with wavelength. Slit widths were typically set at 5 nm, for both the excitation and emission. Fluorescence intensity was properly corrected for vesicle light scattering, making use of correction factors calculated from the experiment with pyranin (8-hydroxy-1,3,6-pyrenetrifluoride) and DMPG (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) vesicles, which are known not to interact with one another [13]. The concentrations of DMPG were such that they yielded the same turbidity as those of DMPC, measured in a Hewlett Packard 8452A diode array spectrophotometer. Alternatively, a home-made front face fluorescence cell was used, with the excitation beam making an angle of 36° with the normal to the cell face, to avoid specularly reflected light from reaching the emission optics [14]. The fluorescence data are also the mean values of at least three experiments, and the error bars are the calculated standard deviations.

3. Results and discussion

3.1. Membrane spin label ESR

To study the effect of the melatonin-lipid interaction in the bilayer structure, spin labels that monitor different depths of the lipid bilayer were used. The alterations caused by melatonin in the ESR signal of SSL, which monitors the lipid head-group region, can be evaluated by the decrease of the empirical parameter h_{+1}/h_0 (ratio between the amplitude of the lines corresponding to $M_I = +1$ and $M_I = 0$) calculated from the SSL ESR spectra (Fig. 1). The hormone alters the DMPC membrane surface, below and above T_m , indicating that melatonin binds to the bilayer independent of its packing state. For temperatures above 30°C, rotation correlation times were calculated according to [15]. The spectra were simulated using the corrections for inhomogeneous broadening due to unresolved hyperfine structure, as suggested by [16]. Fig. 2 shows that the effect of melatonin on the $\tau_{//}$ values (rotation correlation time about the molecular symmetry axis) is analogous to that caused by decreasing the temperature, suggesting that melatonin increases the packing of the PC head-groups. Considering that there is probably a small orienting potential in the membrane interface, the calculated correlation times should be taken as comparative parameters and not as true numerical values. The changes caused by melatonin on both h_{+1}/h_0 and $\tau_{//}$ are similar, though less intense, to those yielded by the interaction of melanotropic peptides with DMPG vesicles [17]. Those peptides were shown to partially penetrate anionic bilayers.

Although melatonin was shown to cross lipid bilayers [8], the ESR spectra of spin labels placed at the 5th or 12th carbon of the acyl chain of stearic acid (5- and 12-SASL) or phospholipid (5- or 12-PCSL) derivatives do not change in the presence of up to 50 mol% of melatonin (relative to DMPC). The same result was obtained with the cholesterol analog spin label CSL. Therefore, unlike the melanotropins [17,18] and other small peptides, melatonin does not seem to

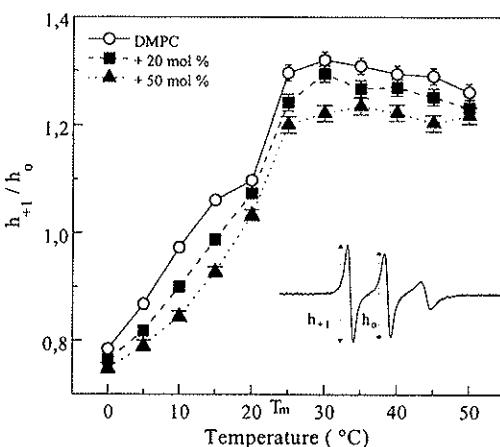


Fig. 1. Effect of melatonin on the ESR spectra of SSL in DMPC, at different temperatures (mol% melatonin relative to lipid).

significantly alter the packing of the bilayer core. The same result was recently found with a fluorescence probe [7]. That could be either due to the small volume of the hormone, as compared to the peptides, and/or to its preferential distribution at the membrane surface. Small aromatic hydrocarbons were also found to penetrate lipid bilayers, without altering the degree of organization of the membrane [19]. It was suggested that the small hydrophobic molecules were dissolved in the central region of the bilayer, close to the acyl terminal methyl group, although the water/lipid interface was not monitored.

3.2. Melatonin fluorescence

Like many fluorophores, the melatonin emission spectrum is highly dependent on the medium dielectric constant. Melatonin fluorescence spectra in solutions containing different proportions in volume of water/ethanol were obtained. The corresponding spectral variations were evaluated in terms of the changes in the area under the curves and position of the maximum of emission, and plotted versus the dielectric constant of the medium (ϵ) (Fig. 3). The values of ϵ for the different mixtures were calculated from the given values for different mixtures in weight of water/ethanol [20], assuming 1.00 and 0.80 g/cm³ for the water and ethanol densities, respectively. Fig. 3 shows that the fluorescence emission of melatonin is highly sensitive to its environment. Keeping that in mind, it is interesting to analyze the spectra of melatonin in the presence of excess DMPC (2.5 mM, where the titration experiment discussed below showed that melatonin was completely bound to the vesicles). The hormone fluorescence emission does not change much, yielding $I_{max}/I_{min} \approx 1.25$ and $\Delta\lambda \approx 3$ nm, where I_{min} and I_{max} are the areas under the melatonin emission spectra in the absence and the presence of DMPC vesicles, respectively. Therefore, based on the data in Fig. 3, melatonin in DMPC bilayers seems to be mainly localized in a region of dielectric constant around 75, hence close to the bilayer interface. The small variations on the melatonin fluorescence anisotropy at 30°C – from 0.002 in buffer to 0.033 in the presence of excess DMPC – also suggest the bilayer/water interface as the hormone localization. It is important to note that the fluorescence spectra of melatonin in DMPC vesicles indicated similar hormone-membrane interactions for the two different states of lipid packing.

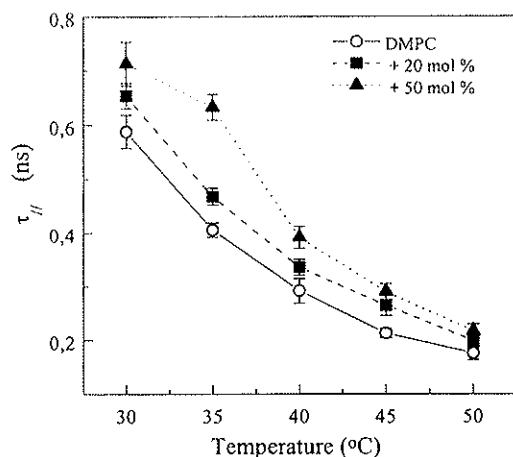


Fig. 2. The melatonin increase of SSL rotation correlation time, in the liquid crystal phase of DMPC.

3.3. Melatonin-lipid membrane partition coefficient

To further understand the binding of melatonin to DMPC vesicles, membrane partition coefficients, K_p , were calculated. K_p is defined as

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

where n_M and n_{H_2O} are the number of moles of melatonin bound to the membrane and in solution, and V_M and V_{H_2O} are the volumes of membrane and solution, respectively. It will be assumed that the total volume $V_t = V_{H_2O}$.

The above equation can be rewritten as a function of the bound and the free molar melatonin concentrations, $[M_b]$ and $[M_f]$, respectively.

$$K_p = \frac{[M_b]}{[M_f]} \frac{V_t}{V_M}$$

Hence, the bound peptide concentration is

$$[M_b] = \frac{K_p [M_t] V_M}{(K_p V_M - V_t)}$$

where $[M_t]$ is the total concentration of melatonin.

The above equation, together with the assumption that melatonin is partitioned between two media, lipid membrane (M_b) and buffer (M_f), where its fluorescence intensity is I_{\max} and I_{\min} , respectively

$$I = \frac{[M_b]}{[M_t]} I_{\max} + \frac{[M_f]}{[M_t]} I_{\min}$$

can be put together to yield an expression for the variation of the melatonin fluorescence I , as a function of the total concentration of lipids, $[L_t]$.

$$\frac{I}{I_{\min}} = \frac{K_p [L_t] M_w / \rho}{(K_p [L_t] M_w / \rho) + 1} \left(\frac{I_{\max}}{I_{\min}} - 1 \right) + 1$$

where M_w and ρ are the lipid molecular weight and density (ρ was assumed to be 1 kg/l). That equation will fit well any set of data where the concentration of bound molecule is much lower than the total concentration of lipid, yielding a constant value for K_p for the range of $[L_t]$ used. That is, when the number of binding sites is not restricted.

The titration data for the melatonin fluorescence in the

presence of different DMPC concentrations, above and below T_m , obtained as described in Section 2, were well fitted with the model discussed above, yielding K_p values of 3100 ± 500 and 4300 ± 800 , for the partition of melatonin in the gel and liquid crystal DMPC phases, respectively. Within the experimental error, the membrane melatonin partition is not a function of the packing lipids. It is interesting to point out that K_p values around 3000 are rather high, as compared to the values obtained, for instance, for the binding of melanotropic peptides to lipid bilayers [21], after the correction for the electrostatic effect ($K_p \approx 3$, assuming $K_p = K_a/0.7$ and $K_a = 1/nK_d$ where K_a , K_d are the association and dissociation constants, respectively, and n is the number of bound lipid molecules per peptide, as defined in [21]). They could also be compared with the partition of melatonin in a chloroform/water system, which yields a K_p around 20 (unpublished results). Values for solute/membrane partition coefficients around 10^3 were found, for example, for the neutral form of the local anesthetic dibucaine, but rather smaller values were obtained for other local anesthetics [22]. Therefore, although it is highly soluble in aqueous medium [9], melatonin strongly associates with lipid vesicles, both in the gel and in the liquid crystal states of the bilayer.

3.4. Membrane fluorescent quenchers

The interaction of melatonin with DMPC bilayers was also monitored by the quenching of its fluorescence emission by spin labels placed at the 5th and 12th carbon of the acyl chain (5- and 12-PCSL). This approach has been extensively used to localize fluorophores in lipid bilayers. It has been found that fluorophores which are supposed to bind near the membrane surface have their fluorescence emission better suppressed by nitroxides localized close to the lipid headgroups (for instance see [21,23]). Surprisingly, Fig. 4 shows that the melatonin fluorescence is better quenched by spin labels deeper in the bilayer (12-PCSL) than by those closer to the interface (5-PCSL). These results could be rationalized in the light of the known vertical fluctuation of acyl chain spin labels [24–26], and the ability of melatonin to cross lipid bilayers [8]. Hence, even considering that melatonin is preferentially localized at the membrane surface, as it is crossing the bilayer, the label at the 12th position, which is on average deeper in the bilayer [17] but can span most of the membrane, could be

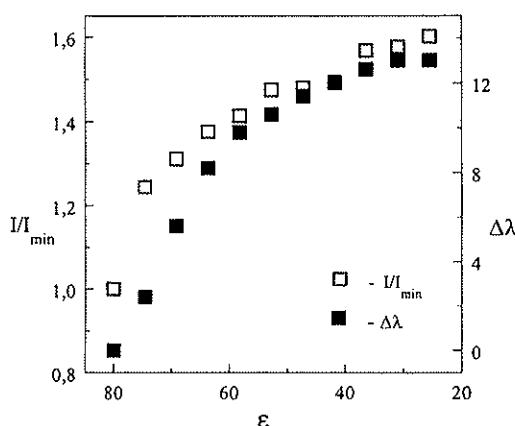


Fig. 3. The dependence of the melatonin fluorescence (area under the emission spectra and peak position) with the medium dielectric constant. I_{\min} is the intensity in pure water.

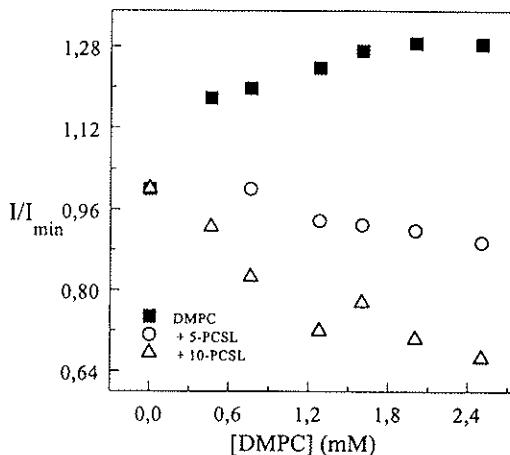


Fig. 4. Quenching of melatonin fluorescence as a function of the DMPC/PCSL (molar ratio 90/10) concentration.

more effective in quenching the hormone fluorescence than the less mobile quencher 5-PCSL.

For the understanding of the average distribution of melatonin near the surface of the bilayer one could make a very simple parallel with the distribution of a particle under a classical harmonic field, centered at the middle of the bilayer ($x=0$). If the particle oscillates between the bilayer surfaces, its probability distribution would be such that the particle is predominantly found at the maximum value of $|x|$, the bilayer surfaces. Actually, melatonin inside the membrane could be subjected to any potential with a minimum at the middle of the bilayer, which would yield a higher molecular density close to the membrane interfaces. The origin of that potential could possibly be attributed to 'hydrophobic' and 'viscous' interactions.

The results presented here, concerning the melatonin/lipid interaction, will certainly be relevant for the discussion of the several melatonin physiological actions at the membrane level.

Acknowledgements: This work was supported by FAPESP, CNPq and FINEP. CNPq fellowships for E.J.X.C., C.S.S., M.H.B. and M.T.L.F. (research) are acknowledged. We are grateful to Dr. A.M.L. Castrucci for introducing us to melatonin and for the biological activity measurements. We would also like to thank Dr. S. Schreier for making the ESR spectrometer available, and Dr. G. Moscati for helpful discussions about dielectric constants.

References

- [1] Morgan, P.J. and Williams, L.M. (1989) *Experientia* 45, 955–965.
- [2] Sugden, D. (1992) *Eur. J. Pharmacol.* 213, 405–408.
- [3] Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. and Reppert, S.M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6133–6137.
- [4] Barrett, P., Conway, S., Jockers, R., Strosberg, A.D., Guardiola-Lemaitre, B., Delagrange, P. and Morgan, P.J. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1356, 299–307.
- [5] Reiter, R.J., Pöeggeler, B., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C. and Guerrero, J.M. (1993) *Neuroendocrinol. Lett.* 15, 103–116.
- [6] Marshall, K.A., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Aruoma, O.I. and Halliwell, B. (1996) *Free Radical Biol. Med.* 21, 307–315.
- [7] García, J.J., Reiter, R.J., Guerrero, J.M., Escames, G., Yu, B.P., Oh, C.S. and Muñoz-Hoyos, A. (1997) *FEBS Lett.* 408, 297–300.
- [8] Costa, E.J.X., Lopes, R.H. and Lamy-Freund, M.T. (1995) *J. Pineal Res.* 19, 123–126.
- [9] Shida, C.S., Castrucci, A.M.L. and Lamy-Freund, M.T. (1994) *J. Pineal Res.* 16, 198–201.
- [10] Ferroni, E.N. and Castrucci, A.M.L. (1987) *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 20, 213–220.
- [11] Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. and Cullis, P.R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 55–65.
- [12] Chen Jr., T.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) *Anal. Chem.* 28, 1756–1758.
- [13] Clement, N.R. and Gould, J.M. (1981) *Biochemistry* 20, 1534–1538.
- [14] Eisinger, J. and Flores, J. (1979) *Anal. Biochem.* 94, 15–21.
- [15] Marsh, D. (1989) in: *Spin Labelling. Theory and Applications* (Berliner, L.J., Ed.) Vol. V, pp. 255–300, Academic Press, New York.
- [16] Bales, B.L. (1989) in: *Spin Labelling. Theory and Applications* (Berliner, L.J., Ed.) Vol. V, pp. 77–126, Academic Press, New York.
- [17] Biaggi, M.H., Riske, K.A. and Lamy-Freund, M.T. (1997) *Biophys. Chem.* (in press).
- [18] Biaggi, M.H., Pinheiro, T.J., Watts, A. and Lamy-Freund, M.T. (1996) *Eur. Biophys. J.* 24, 251–259.
- [19] Sanioto, D.L. and Schreier, S. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 530–537.
- [20] Hartshorn, L., Harris, C.C., Hey, J.A., Jones, T.I. and Milligan, A.G., in *International Critical Tables*.
- [21] Macêdo, Z.S., Furquim, T.A. and Ito, A.S. (1996) *Biophys. Chem.* 59, 193–202.
- [22] Paula, E. and Schreier, S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1240, 25–33.
- [23] Louro, S.R.W., Tabak, M. and Nascimento, O.R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1189, 243–246.
- [24] Godici, P.E. and Landsberger, F.R. (1974) *Biochemistry* 13, 362–368.
- [25] Ellena, J.F., Archer, S.J., Dominey, R.N., Hill, B.D. and Cafiso, D.S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 940, 63–70.
- [26] Yin, J.J., Feix, J.B. and Hyde, J.S. (1988) *Biophys. J.* 53, 525–531.