

Dayane dos Santos Alvares

***Estudo da formação de domínios
em bicamadas lipídicas induzidos
por peptídeos antimicrobianos***

São José do Rio Preto

2011

Dayane dos Santos Alvares

***Estudo da formação de domínios
em bicamadas lipídicas induzidos
por peptídeos antimicrobianos***

Dissertação de mestrado em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, Departamento de Física.

Orientador:

Prof. Dr. João Ruggiero Neto

São José do Rio Preto

2011

Alvares, Dayane dos Santos.

Estudo da formação de domínios em bicamadas lipídicas induzidos por peptídeos antimicrobianos / Dayane dos Santos Alvares - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

69 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Ruggiero Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Peptídeos antimicrobianos. 3. Domínios lipídicos. I. Ruggiero Neto, João. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Dissertação de Mestrado sob o título “ *Estudo da formação de domínios em bicamadas lipídicas induzidos por peptídeos antimicrobianos* ”, defendida por Dayane dos Santos Alvares e aprovada 14 de Outubro de 2011, em São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey
UNESP-São José do Rio Preto

Dra. Tereza Pereira de Souza
USP-São Paulo

*Dedico este trabalho aos meus pais,
pelo esforço, dedicação e compreensão
em todos os momentos desta e de
outras caminhadas.*

Agradecimentos

Não encontrei e jamais encontrarei palavras que descrevam suficientemente o quão grata me sinto por aqueles que colaboraram, ao longo desta etapa da minha vida, para alcançar meus objetivos.

Eu agradeço, especialmente, ao meu orientador Prof. João Ruggiero Neto, por toda a atenção dada e pela confiança que depositou em mim durante esses anos em que trabalhamos juntos. O professor teve participação fundamental nesse trabalho sempre sugerindo pontos interessantes e ótimas perspectivas para o desenvolvimento da pesquisa me dando sempre liberdade para realizar o trabalho. Estou imensamente feliz por estar trabalhando com você. Obrigada professor pela valiosa orientação. Admiro a sua dedicação pela ciência.

Ao Prof. Marcelo, por ter me dado a oportunidade de entrar em contato com a ciência ainda no primeiro ano da graduação me ensinando as primeiras pipetadas. Gostaria de registrar minha admiração pelo empenho que empregou em minha formação. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo e pela amizade.

À Prof^a. Fátima, pela dedicação, paciência, amizade e pelos “puxões de orelha” nas horas certas. Obrigada por me ouvir sempre que precisei e pelos sábios conselhos. Sua dedicação é um exemplo para mim.

À Prof^a Karin do Amaral Riske pela cessão e auxílio na utilização nos equipamentos envolvidos para preparação e observação dos lipossomos gigantes. Obrigada pela grande ajuda e por sempre estar disposta em discutir algum assunto a qualquer hora.

Agradeço aos meus pais, Dionizia e José Roberto, que logo cedo em suas vidas encontraram uma imensa dificuldade para estudar. Mesmo assim lutaram e me ajudaram a chegar até aqui. Não entenderam meus sonhos, mas acreditaram na minha capacidade. Obrigada papai, por sempre pegar no meu pé desde criança para sempre estudar, afinal: “Um homem pode perder o dinheiro, pode perder a casa, pode perder a roupa, mas um homem nunca pode perder o seu conhecimento e com ele pode recuperar tudo que perdeu”. Obrigada mamãe, por estar sempre ao meu lado mesmo estando longe, por me ouvir, apoiar e sempre acreditar em mim. Sem vocês mais está vitória em minha vida não seria possível. Meu espelho são vocês.

Aos técnicos de laboratório Paulinho, Barbosa, Marcelino e Thiago, e a secretária do departamento, Ilva, que sempre foram atenciosos e prestativos.

À Dra. Tereza Pereira de Souza e ao Prof.º Marcelo Andres Fossey por terem aceitado participar da banca de avaliação.

Ao Centro Nacional de Pesquisa Científica (CNPq), à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a (CAPES) pelo apoio financeiro durante minha 'vida' acadêmica.

A Deus por sempre me iluminar e acompanhar meu caminho, colocando as pessoas certas nas horas que mais precisei.

*“A coisa mais bela que podemos
experimental é o mistério.
Essa é a fonte de toda a arte
e ciências verdadeiras”
(Albert Einstein).*

Resumo

Estudos de visualização de GUVs por microscopias de fluorescência e contraste de fase, realizados com três mastoparanos (MP-1, N-MP-1 e MPX), evidenciam que alguns destes peptídeos induzem a formação de regiões densas na superfície das GUVs que foram atribuídas a agregação ou segregação lipídica. Evidências experimentais anteriores mostraram que estes peptídeos apresentam atividade interfacial e suas cargas líquidas +2, +3 e +4 conferem atividade lítica preferencial em vesículas aniônicas, bem como atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas e Gram positivas. A formação de domínios poderia ser um mecanismo lítico alternativo para a atividade interfacial. Segregação lipídica induzida por estes peptídeos foi então avaliada por calorimetria diferencial de varredura (DSC), observando-se o impacto destes peptídeos nas propriedades termotrópicas de misturas de lipídios que são miméticas de bactérias Gram negativas. As misturas binárias utilizadas foram POPE:DOPG (3:1) e DPPE:DPPG (4:1 e 1:4). A transição de fase gel-líquida cristalina da mistura POPE:DOPG em 20mM PIPES (140mM NaCl + 1mM EDTA, pH=7,4) foi centrada em 14 °C com um "ombro" em, aproximadamente, 16 °C indicando miscibilidade incompleta destes lipídios. Na razão molar de lipídio por peptídeo (L/P)=400, os três peptídeos estudados induziram aumento na temperatura de fusão (T_m) de suspensão de vesículas multilamelares. Destes peptídeos MP-1, com carga +2, mostrou a maior variação de T_m . As mudanças em T_m foram observadas ser dependente da relação L/P, sendo maior deslocamento de T_m em L/P=15. O aumento da temperatura de transição de fase indica interação preferencial destes peptídeos com o componente aniônico da mistura que leva à formação de domínios enriquecidos com o outro componente (POPE), que, em estado puro, tem maior T_m . Outros três peptídeos (L1A, L1B e L1A-ac) que também têm ação interfacial, com baixa penetração em bicamadas aniônicas, foram estudados por estas duas técnicas. A menos de um resíduo, suas sequências são as mesmas sendo que dois destes peptídeos apresentam modificações no N-terminal que resultou em aumento de sua atividade lítica em vesículas aniônicas. Estes peptídeos induzem aumento significativo na T_m da mistura

POPE:DOPG mesmo na razão L/P=400 ($\Delta T_m \approx 2^\circ\text{C}$), enquanto na L/P=15, $\Delta T_m \approx 5 - 8^\circ\text{C}$. Os dois peptídeos com modificação no N-terminal (L1B e L1A-ac) induziram maiores mudanças na T_m . A visualização de GUVs de POPC:POPG com pequena fração de NBD-PE mostrou por microscopia de fluorescência a formação de regiões densas que sugerem agregação ou segregação de lipídios.

Abstract

GUVs visualization studies by fluorescence and phase contrast microscopies, carried out with three mastoparan peptides (MP-1, N-MP-1 and MPX) provided evidences that some of these peptides induce dense regions in the GUV's surfaces that were attributed to aggregation or lipid segregation. Previous experimental evidences showed that these peptides display interfacial activity and their net charges +2, +3 and +4 confer preferential lytic activity in anionic vesicles as well as antimicrobial activity against Gram negative and Gram positive bacteria. The domain formation could be an alternative lytic mechanism for the interfacial activity. Lipid segregation induced by these peptides was then evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), by observing the impact of these peptides on the thermotropic properties of lipid mixtures which are mimetics of the Gram negative bacteria. The binary mixtures used were POPE:DOPG (3:1) and DPPE:DPPG (4:1 and 1:4). The gel to liquid crystalline phase transition of the mixture POPE:DOPG in 20 mM PIPES (140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH7.4) was centered in 14 °C with a shoulder in approximately 16 °C indicating incomplete miscibility. At lipid to peptide molar ratio (L/P)=400 the three peptides studied induced increase of the melting temperature T_m of multilamellar vesicle suspensions. From these peptides MP-1, with charge +2, showed the largest variation of T_m . The changes in T_m were observed to be dependent on the L/P ratio, displacing to larger temperature for L/P =15 ratio. The increase in the of the phase transition temperature indicate preferential interaction of these peptides with the anionic component of the mixture leading to the formation of domains enriched with the other component (POPE) which, in pure state, has the largest T_m . Other three peptides (L1A, L1B e L1A-ac) that also have interfacial activity with low penetration in the anionic bilayer were studied by these two techniques. Unless of one residue their sequences are the same and two of these peptides present modifications at the N-terminus the lead to the increase in their lytic activity in anionic vesicles. These peptides induced significant increase in the T_m of POPE:DOPG mixture even at L/P =400 ratio ($\Delta T_m \approx 2^\circ\text{C}$) while at L/P=15, $\Delta T_m \approx 5 - 8^\circ\text{C}$. The two peptides with N-terminus

modification (L1B e L1A-ac) induced greater T_m changes. The visualization of POPC:POPG GUVs with small fraction of NBD-PE showed by fluorescence microscopy the formation of dense regions that suggest aggregation or lipid segregation.

Sumário

Lista de Figuras

Introdução

1	Desenvolvimento Teórico	20
1.1	Membrana Biológica	20
1.1.1	Lipídios e Membrana Lipídica	22
1.1.2	Termodinâmica da Bicamada Lipídica	26
1.1.3	Modelo de Transição de Fase Lipídica	28
1.1.4	Temperatura de Transição	30
1.1.5	Domínios lipídicos	31
2	Materiais e Métodos	32
2.1	Materiais	32
2.2	Métodos	33
2.2.1	Preparação de Vesículas	33
2.2.1.1	Vesículas para Calorimetria (MLVs)	34
2.2.1.2	Vesículas para Microscopia (GUVs)	35
2.2.2	Observação das GUVs	36
2.2.2.1	Princípios Físicos da Microscopia de Fluorescência	37
2.2.3	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	38
3	Resultados e Discussões	40

3.1	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	40
3.1.1	Mistura POPE:DOPG (3:1)	41
3.1.2	Mistura DPPE:DPPG (4:1) e (1:4)	45
3.1.2.1	Impacto do peptídeo na transição de fase da mistura DPPE:DPPG	47
3.2	Estudos preliminares com os peptídeos L1B, L1A e ac-L1A	50
3.2.1	Medidas de DSC	50
3.2.1.1	Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de L1B	50
3.2.1.2	Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de L1A	51
3.2.1.3	Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de ac-L1A	51
3.2.1.4	Mistura DPPE:DPPG (1:4) na presença de L1B	52
3.2.2	Visualização de GUVs	53
4	Considerações Finais	55
	Referências	56

Lista de Figuras

1.1	<i>Ilustração de uma célula animal.</i>	20
1.2	<i>Modelo do Mosaico Fluido.</i>	21
1.3	<i>Estrutura dos principais fosfolipídios das biomembranas.</i>	23
1.4	<i>Geometria molecular dos lipídios</i>	24
1.5	<i>Desenho esquemático de uma micela e uma bicamada</i>	25
1.6	<i>Desenho esquemático de um lipossomo</i>	26
1.7	<i>Transição de fase lipídica gel-fluida</i>	26
1.8	<i>Diferentes fases lipídicas</i>	27
2.1	<i>Estruturas dos fosfolipídios e do marcador utilizados no estudo.</i>	34
2.2	<i>Esquema de preparação de lipossomos</i>	35
2.3	<i>Microscópio invertido Olympus IX71</i>	36
2.4	<i>Princípio da microscopia fluorescência</i>	37
2.5	<i>Desenho esquemático da célula do DSC</i>	38
3.1	<i>Termograma da mistura POPE:DOPG (3:1) puro</i>	42
3.2	<i>Termograma da mistura de POPE:DOPG (3:1) na presença do MPX</i>	43
3.3	<i>Termograma da mistura de POPE:DOPG (3:1) na presença do MPX, N-MP-1 e MP-1</i>	44
3.4	<i>Termograma da mistura POPE:POPG (3:1) puro</i>	45
3.5	<i>Termograma da mistura POPE:POPG (3:1) na ausência e presença de Poli-L-Lisina</i>	46
3.6	<i>Termogramas de MLVs de DPPE e DPPG puros</i>	46
3.7	<i>Termogramas das misturas DPPE:DPPG (4:1) e (1:4)</i>	47

3.8	<i>Termograma da mistura DPPE:DPPG (4:1) na presença de MPX</i>	48
3.9	<i>Termograma da mistura DPPE:DPPG (1:4) na presença de MPX</i>	49
3.10	<i>Termogramas de MLVs de DPPE e DPPG puros e na presença de MPX</i>	49
3.11	<i>Termograma da mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de LIB</i>	50
3.12	<i>Termograma da mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de LIA</i>	51
3.13	<i>Termograma da mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de ac-LIA</i>	52
3.14	<i>Termograma da mistura DPPE:DPPG (1:4) na presença de LIB</i>	52
3.15	<i>Micrografia de fluorescência das GUVs na ausência de peptídeo</i>	53
3.16	<i>Micrografia de fluorescência das GUVs na presença de LIB</i>	53
3.17	<i>Micrografia de fluorescência das GUVs na presença de LIA</i>	54
3.18	<i>Micrografia de fluorescência das GUVs na presença de ac-LIA</i>	54

Introdução

Peptídeos antimicrobianos fazem parte do sistema de defesa imune não adaptativo de inúmeras espécies desde plantas a mamíferos e são utilizados como defesa em infecções (ZASLOFF, 2002). Estes peptídeos têm como alvo os lipídios da membrana celular (POWERS; HANCOCK, 2003) (YEAMAN; YOUNT, 2003) (SATO; FELIX, 2006). Sua atividade está relacionada à desestruturação da membrana levando à lise da célula através de mecanismo que não é ainda completamente compreendido. A atividade dirigida aos lipídios da membrana constitui uma grande vantagem a estes peptídeos, pois por serem catiônicos são seletivos a membranas aniônicas. Esta é uma das principais características da monocamada externa de membranas de microorganismos e apresenta significativa diferença com membranas de células de eucariotos (ZASLOFF, 2002) (YEAMAN; YOUNT, 2003) (EPAND et al., 2006) (GABRIEL et al., 2007). Como consequência, a atividade lítica é independente de receptores na membrana, dificultando que o microorganismo desenvolva mecanismos de resistência, conferindo a estes peptídeos um grande potencial farmacológico para serem utilizados como substitutos de antibióticos convencionais.

A procura por peptídeos que tenham a atividade antimicrobiana potencializada e que não sejam tóxicos a células de mamíferos tem aumentado significativamente em face ao crescimento do número de cepas resistentes aos antibióticos convencionais. O efeito de tais peptídeos nas membranas e a relevância da composição lipídica membranar têm sido tópicos de interesse por mais de uma década (SEVCSIK et al., 2008).

Apesar desta extensa atividade de pesquisa na área, não se conhece um mecanismo de ação lítica comum a todos os peptídeos. Diferentes modelos sobre o mecanismo de ação lítica destes peptídeos foram propostos nestas duas décadas. Estes modelos têm em comum as etapas iniciais que ocorrem na interface água-bicamada: a adsorção do peptídeo na bicamada, dirigida por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, é seguida de mudança conformacional, assumindo em geral a conformação helicoidal, com seu eixo longitudinal paralelo à bicamada e, nesta orientação acumulam na monocamada externa aumentando a tensão elástica da bicamada. Para aliviar este estresse elástico os modelos propõem mecanismos diferentes que podem ser sintetizados a seguir: a) formação de poro transmembranar no qual a face hidrofóbica do peptídeo está em contato com o fase lipídica da bicamada (HUANG, 2000) (HUANG; CHEN; LEE, 2004); b)

formação de poros transientes nos quais a parede ou bainha dos poros é constituída de peptídeos interespaçados pelas cabeças polares dos lipídeos formando um toróide hidrofílico com acentuada curvatura (MATSUZAKI et al., 2004) (HUANG, 2006); c) a extensa acumulação do peptídeo na bicamada pode levar à ruptura desta ou então em atividade tipo detergente devido às características anfipáticas do peptídeo podem resultar na formação de complexos peptídeo-lipídio hidrossolúveis (SHAI, 1999) (BECHINGER; LOHNER, 2006); d) o peptídeo insere na bicamada, cria assimetria de carga, massa ou elástica e transloca para a monocamada interna juntamente com lipídios, resultando em lise sem a formação de poro como proposto alternativamente por (YANDEK et al., 2007) (YANDEK; POKORNY; ALMEIDA, 2009); e) formação de domínios lipídicos com instabilidade na borda do domínio que resultaria em liberação do conteúdo interno da bicamada (EPAND; EPAND, 2009) (EPAND et al., 2010).

Com base nestes modelos de instabilização da bicamada, tem-se procurado, nesta última década, as bases biofísicas da seletividade. A compreensão destas bases é importante para o desenho racional de novas sequências com atividade antimicrobiana exacerbada e que sejam minimamente tóxicas às células de animais superiores. Com este objetivo o trabalho tem se concentrado na utilização de peptídeos modelo, composto de repetições de pequenas sequências. Procura-se correlacionar parâmetros estruturais que caracterizam anfipaticidade, tais como carga líquida, hidrofobicidade média residual, propensão a formar hélice, momento hidrofóbico, ângulo da face polar com atividade lítica em membranas modelo e atividade biológica (DATHE et al., 2002) (MATSUZAKI, 2009).

A interação de peptídeos e membranas modelo tem sido pesquisada em nosso laboratório com o objetivo de explorar mecanismo(s) de atividade lítica e as bases da seletividade destes peptídeos para as atividades lítica e biológica. Estes estudos tem como modelo peptídeos da família dos mastoparanos, extraídos de vespas nativas, que apresentam extensa atividade biológica, especialmente antimicrobiana. Esses peptídeos são bioativos mais abundantes em venenos de vespas. Geralmente apresentam baixo peso molecular (≈ 1400 Da), são catiônicos e ricos em resíduos hidrofóbicos, tendendo a assumir estruturas helicoidais quando em contato com bicamadas lipídicas.

A associação de várias técnicas experimentais no estudo de correlação estrutura e função dos peptídeos, indicaram a importância da carga líquida tanto do peptídeo quanto da bicamada em duas etapas da atividade lítica. Na etapa inicial de ligação do peptídeo à bicamada com a indução da formação de hélice alfa. Na etapa de acumulação do peptídeo na bicamada até alcançar uma concentração crítica (P/L) que leva à lise, resultando no processo cooperativo na curva de dose e resposta, ou à desestabilização e ruptura da membrana. Entretanto, esta

concentração crítica depende fortemente da composição lipídica da bicamada, e portanto, não somente da densidade superficial de cargas, mas de aspectos elásticos tais como módulos de flexão e de compressão de área da curvatura.

Estes estudos sugerem ainda que diferentes mecanismos de ação podem ser observados para o mesmo peptídeo, dependendo da razão entre as concentrações de peptídeo e lipídio (P/L), e que estes processos não são excludentes.

Recentemente foram realizados estudos envolvendo três peptídeos líticos da família dos mastoparanos (MPX, N-MP-1 e MP-1). Estes estudos envolveram experimentos de visualização de vesículas unilamelares gigantes (GUVs), medidas de potencial zeta e dicróísmo circular e foram realizados para compreender a atividade interfacial destes peptídeos em vesículas aniônicas. Os resultados sugeriram que a liberação de conteúdo de vesículas gigantes ocorre de maneira gradual e sugeriram também que estes peptídeos, especialmente os de maior carga líquida MPX e N-MP-1, induzem a formação de regiões densas nas GUVs com forte intensidade de fluorescência sugerindo agregação ou segregação lipídica e a formação de domínios (artigo anexo).

A formação de domínios tem sido enfatizada por Epand e colaboradores ((EPAND et al., 2009a) (EPAND et al., 2008) (EPAND; EPAND, 2009) (EPAND et al., 2010)) como um possível mecanismo alternativo para a atividade antimicrobiana em bactérias Gram negativas que possuem composição mista de lipídios zwitteriônicos e aniônicos. Estes autores sugerem que peptídeos poderiam ligar a um destes componentes e segregar o outro em uma fase rica deste outro componente. Observaram ainda que peptídeos que induzem formação de domínios ligam-se preferencialmente a lipídios aniônicos e possuem, em geral, alta densidade de resíduos básicos. Desta forma, em bactérias Gram positivas, que possuem apenas lipídios aniônicos na monocamada externa, este mecanismo de ação alternativo deveria ser menos eficiente. Entretanto, dos três peptídeos utilizados naquele estudo, apenas o peptídeo com menor carga líquida, MP-1, mostrou em teste biológico ser mais eficiente em bactérias Gram negativas comparado com Gram positivas. Os outros dois peptídeos são mais eficientes em bactéria Gram positiva. Sendo assim, os resultados obtidos do efeito destes peptídeos em vesículas gigantes e a aparente contradição destes com os resultados de atividade antibacteriana, motivaram um estudo por meio de outras técnicas destes peptídeos utilizando a associação de técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e de visualização de GUVs.

Um outro estudo com dois outros peptídeos que foram projetados pelo grupo para terem atividade lítica em vesículas aniônicas também sugeriu a agregação ou segregação lipídica. Estas duas sequências são semelhantes e foram projetadas para terem uma delas o marcador fluo-

cente intrínseco triptofano e a outra, na qual este resíduo foi substituído por valina, foi feita modificação no N-terminal para acrescentar a sonda fluorescente ácido orto amino benzóico (Abz) que possui maior rendimento quântico que o triptofano e deveria possibilitar observar níveis mais altos de adsorção em bicamadas. Os experimentos que sugeriram a agregação ou segregação lipídica foram realizados em monocamadas lipídicas, à área constante, nos quais as alterações na pressão superficial induzidas por peptídeos, injetados na subfase, foram monitorados em função da pressão superficial inicial da monocamada. Estes experimentos mostraram variação bifásica, não usual, de $\Delta\pi$ vs π_0 . Estes resultados também motivaram o início de um estudo por outras técnicas do efeito destes peptídeos associando técnicas de calorimetria de varredura e de visualização de GUVs.

A segregação lipídica e formação de domínios lipídicos induzidos por peptídeos têm sido observados para peptídeos com carga líquida alta, em geral maior que quatro. A principal motivação deste trabalho foi que regiões densas em GUVs e comportamento bifásico em monocamadas de Langmuir foram observados para peptídeos com carga líquida dois (MP-1 e L1B) e três (N-MP-1 e L1A). Desta forma iniciou-se um estudo sistemático, utilizando DSC e microscopia para visualização de GUVs para melhor compreensão da origem da formação de domínios por estes peptídeos.

Neste trabalho foram utilizados sistemas lipídicos binários que mimetizam a constituição de membranas de bactérias Gram negativas, fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilglicerol (PG) e que apresentam transição de fase gel-líquido cristalina bem definida em experimentos de DSC e quando separados apresentam temperatura de transição gel-líquido cristalina bem diferentes.

Em associação aos experimentos de DSC vesículas unilamelares gigantes foram formadas, por eletroformação, com mistura de fosfolipídeos zwitteriônicos e aniônicos, contendo uma pequena fração molar (0,1 %) de lipídio com marcador fluorescente e visualizadas por microscopia de fluorescência para observar a formação de regiões ricas em marcador fluorescente que evidenciam a formação de domínios lipídicos.

Nesta dissertação são apresentados resultados obtidos de visualização de GUVs, potencial zeta e CD para os peptídeos MP-1, N-MP-1 e MPX na forma de artigo publicado na revista Langmuir, e resultados de experimentos de DSC para estes peptídeos. Foram incluídos também resultados obtidos por DSC e visualização de GUVs para os peptídeos L1B, L1A e ac-L1A. O peptídeo ac-L1A é outro peptídeo desenhado pelo grupo que apresenta a mesma sequência que o L1A porém apresenta o N-terminal acetilado. Estes últimos dados estão sendo dispostos em forma de manuscrito para submissão em breve.

1 *Desenvolvimento Teórico*

1.1 Membrana Biológica

Todas as células são circundadas por uma membrana celular (membrana plasmática) que controla seletivamente a troca de material. As células, além da membrana plasmática, contêm sistemas de membranas interno que forma compartimentos especializados (organelas) dentro do citoplasma (como o núcleo e as mitocôndrias). As bases moleculares da estrutura da membrana residem nos seus componentes lipídicos e protéicos; a composição garante uma função específica. A membrana plasmática é o elemento mediador da comunicação entre a célula e o seu meio externo, constituindo uma barreira altamente seletiva, que determina a criação de um compartimento interno com composição química própria, diferente do meio externo. Além disto, possibilita a captação de sinais extracelulares participando dos processos de reconhecimento e comunicação entre as células (Figura 1.1).

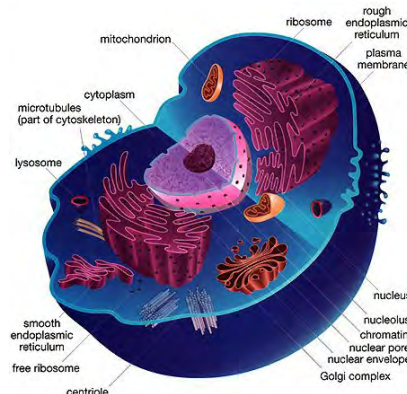


Figura 1.1: *Ilustração de uma célula animal delimitada pela membrana plasmática. O meio interno contém as organelas, como retículo endoplasmático e a mitocôndria, que desempenham diferentes funções. A imagem foi retirada do site www.animalport.com/animal-cells.html*

O modelo de membrana celular aceito atualmente, o modelo do mosaico fluido (Figura 1.2), foi proposto por Singer e Nicholson em 1972 (SINGER; NICHOLSON, 1972). Este modelo consiste de três observações, que são:

- A estrutura da biomembrana em bicamada, com os grupos hidrofílicos de lipídios voltados para a face aquosa e as cadeias acílicas formando um "core" hidrofóbico;
- A inserção de proteínas intrínsecas nesta bicamada, também regida pelas forças intermoleculares (interações eletrostáticas, covalentes e hidrofóbicas, com prevalência das hidrofóbicas), e a adsorção extrínsecas à superfície da membrana principalmente por meio de forças eletrostáticas;
- A bicamada é fluida com livre movimentação dos componentes permitindo uma distribuição aleatória destas moléculas.

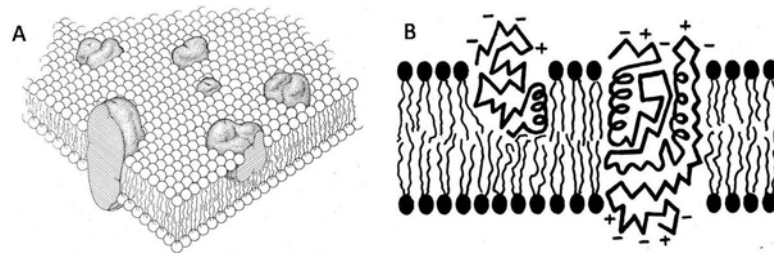


Figura 1.2: *Modelo de Singer e Nicolson (1972). (A) Seção transversal da membrana com proteínas inseridas na bicamada fosfolipídica. (B) As porções iônicas e polares das proteínas, como indicado pelos sinais +/-, estão em contato com a solução aquosa (citoplasma e/ou líquido intersticial) em torno da bicamada lipídica. A região em que as proteínas estão inseridas é apolar (hidrofóbica), portanto, carece de cargas, conforme indicado pela ausência de símbolos +/-.* (cnx.org/content/m15255/latest)

Porém, a este modelo tem-se somado alguns aspectos importantes quanto ao comportamento das biomembranas. Primeiramente, a descoberta do citoesqueleto e sua ligação com proteínas de membrana implicou na restrição de movimento dessas proteínas. A distribuição de proteínas na membrana também não é aleatória, podendo existir vários tipos de especializações de membrana, como junções comunicantes (*gap junction*), junções de oclusão (*tight junction*) e microvilosidades (GLASER, 1992).

A variedade de lipídios e sua organização espacial, que definem as propriedades biofísicas da membrana, têm um importante papel na função celular. Por exemplo, o comprimento e o grau de saturação da cadeia acílica do lipídio determina a espessura e ordenação da região hidrofóbica da membrana; a carga eletrostática dos lipídios aniônicos media interações com regiões catiônicas da membrana associada a proteínas; e interações específicas com lipídios selecionados, tal como polifosfoinositídeos, são importantes para organização espacial das suas proteínas ligadas (JANMEY; KINNUNEN, 2006).

A composição química das duas monocamadas que formam a bicamada lipídica é complexa e muito diferente uma da outra, podendo gerar domínios. Por exemplo, quase todos os lipídios aniônicos em células eucariotas estão na face do citoplasma, em que a maioria dos lipídios com grande quantidade dos grupos da cabeça glicosilados são expostos para o meio extracelular.

A assimetria da bicamada entre membranas eucariótica e procariótica é essencial para a atividade de fatores endógenos antimicrobiais que rompem as membranas bacterianas, mas são inofensivos para células eucarióticas (SATO; FEIX, 2006). A composição química da bicamada afeta suas propriedades mecânicas e, reciprocamente, a aplicação de forças na membrana pode alterar sua composição química.

1.1.1 Lipídios e Membrana Lipídica

Lipídios são substâncias orgânicas insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Eles constituem aproximadamente 50% da massa da maioria das membranas plasmáticas das células animais, o restante são proteínas. A composição lipídica de uma membrana depende do tipo de membrana e varia largamente de uma célula para outra. Na tabela 1.1 são mostradas as composições lipídicas de algumas membranas biológicas (WENDER et al., 2000). Dentre os vários tipos de lipídios existentes, os mais abundantes nas membranas biológicas são os fosfolipídios, que pertencem à classe dos fosfoglicerídeos. Em menor quantidade, são encontrados os esfingolipídios e o colesterol.

	Porcentagem de fosfolipídios total				
	Mitocôndria	Lisossomos	Membrana Plasmática	Membrana Nuclear	Membrana do Golgi
Cardiolipina	18	01	01	04	01
fosfatidiletanolamina	35	14	23	13	20
Fosfatidilcolina	40	40	39	55	50
Fosfatidilenositol	05	05	08	10	12
Ácido Fosfatídico	-	01	01	02	<1
Lisofosfoglicerídeos	01	07	02	03	03
Esfingomielina	01	20	16	03	18
Fosfolipídeos (mg/mg proteína)	0,175	0,156	0,672	0,500	0,825
Colesterol (mg/mg proteína)	0,003	0,038	0,128	0,078	0,078

Tabela 1.1: *Porcentagem total dos principais componentes lipídicos das biomembranas selecionadas (GENNIS, 1989).*

Os fosfolipídios apresentam uma cabeça polar, ou hidrofílica, e duas caudas apolares, ou hidrofóbicas. Dessa forma, pelo fato de apresentarem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, os

lipídios de membrana são moléculas anfipáticas. A cabeça polar é composta pelo glicerol (um triálcool), um fosfato e um álcool, como a colina, a etanolamina, o inositol, o glicerol ou a serina (Figura 1.3). As caudas apolares são compostas pelas cadeias carbônicas dos ácidos graxos. Ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa que possuem de 12 a 24 átomos de carbono, embora os mais abundantes nas biomembranas tenham entre 16 e 18 carbonos. Esses ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados. Normalmente, os fosfolipídios apresentam, pelo menos, uma cadeia insaturada em sua composição. Diferenças na quantidade de insaturações dos ácidos graxos são importantes, pois influenciam a aproximação e movimentação dos fosfolipídios e, conseqüentemente, a fluidez das membranas. Se o grupo da cabeça polar do fosfolipídio tem uma serina, glicerol ou inositol ligado no fosfato, a carga líquida da cabeça polar é -1 em pH fisiológico. Quando colina e etanolamina estão esterificados no fosfato, o fosfolipídio resultante é zwitteriônico com carga líquida zero em pH fisiológico.

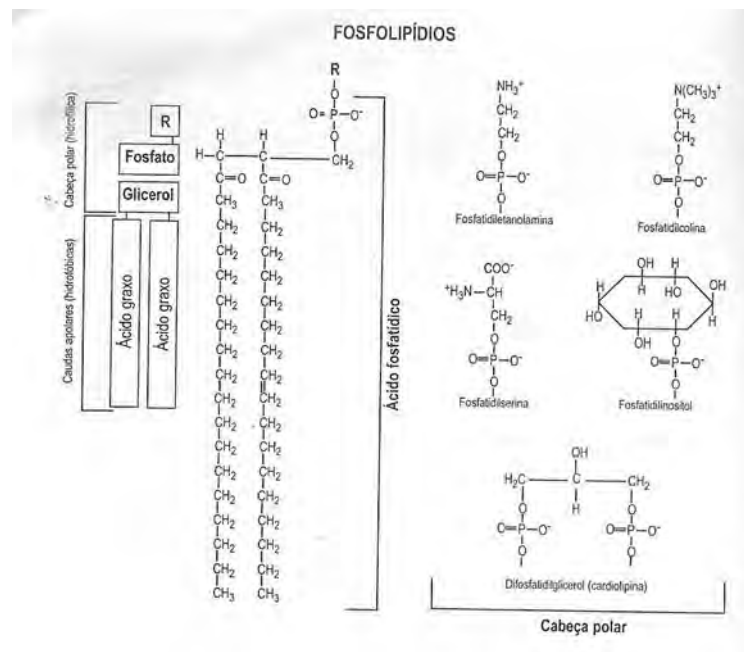


Figura 1.3: Estrutura dos principais fosfolipídios das biomembranas:

Os lipídios anfipáticos, quando são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se em estruturas macromoleculares. Estas estruturas permitem maximizar as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-se da água, e deixam os grupos polares em contato com o solvente, com o qual podem interagir. Tais arranjos moleculares constituem o estado de menor energia livre para esses lipídios em água e resultam da presença de duas regiões com solubilidade diferente na mesma molécula. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Figura 1.4).

Lipídios com uma única cadeia hidrocarbônica, como sabões e detergentes, possuem a

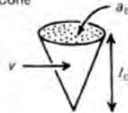


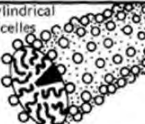

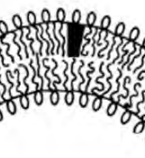

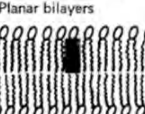

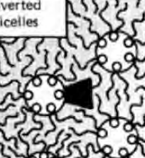
Lipid	Critical packing parameter $v/a_h l_c$	Critical packing shape	Structures formed
Single-chained lipids (surfactants) with large head-group areas: <i>SDS in low salt</i>	$< 1/3$	Cone 	Spherical micelles 
Single-chained lipids with small head-group areas: <i>SDS and CTAB in high salt, nonionic lipids</i>	$1/3-1/2$	Truncated cone 	Cylindrical micelles 
Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: <i>Phosphatidyl choline (lecithin), phosphatidyl serine, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG, dhexadecyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts</i>	$1/2-1$	Truncated cone 	Flexible bilayers, vesicles 
Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains: <i>phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine + Ca²⁺</i>	~ 1	Cylinder 	Planar bilayers 
Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly (<i>cis</i>) unsaturated chains, high <i>T</i> : <i>unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca²⁺, phosphatidic acid + Ca²⁺, cholesterol, MGDG^b</i>	> 1	Inverted truncated cone or wedge 	Inverted micelles 

Figura 1.4: Geometria molecular e estabilidade de fase de moléculas anfipáticas como uma função do parâmetro de empacotamento crítico CP (ISRAELACHVILI, 1992).

forma cônica e afilada e formam, preferencialmente, micelas. Nesta estrutura esférica, as cadeias de hidrocarboneto organizam-se no interior, isolando-se do meio aquoso, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa interagindo com o solvente (Figura 1.5 (A)). A maioria dos fosfolipídios formam, em vez de micelas, uma dupla camada de moléculas, chamada bicamada lipídica. Esta estrutura permite agregação mais estável destas moléculas, que apresentam uma forma cilíndrica (Figura 1.4), devido à presença de duas cadeias acílicas. As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, formando duas monocamadas; as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente, de modo a formar um domínio hidrofóbico no meio da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com o meio aquoso (Figura 1.5 (B)).

Bicamadas lipídicas tendem a se fechar formando vesículas contendo solvente no seu interior. Estas estruturas fechadas são mais estáveis, porque não apresentam caudas hidrofóbicas

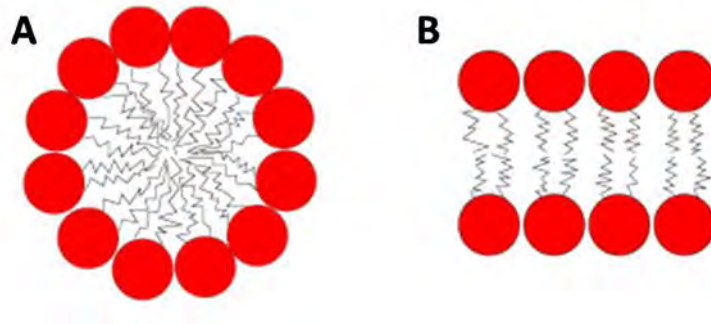


Figura 1.5: *Desenho esquemático de uma micela (A) e uma bicamada (B).*

expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Experimentalmente, demonstrou-se a formação dessas vesículas lipídicas, também chamadas de lipossomos. Lipossomos são, portanto, vesículas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente (Figura 1.6). Eles podem ser formados de moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos.

Esses agregados vesiculares são normalmente classificados de acordo com seu tamanho, lamelaridade (número de bicamadas) e pelo método de formação, conforme descrito a seguir:

- Vesículas Unilamelares pequenas (SUVs): diâmetro entre 20-50nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por sonicação de suspensões lipídicas em meio aquoso,
- Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs): diâmetro entre 50-500nm, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas por extrusão de suspensões aquosas,
- Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs): diâmetro entre 500nm-300 μ M, apresentando uma única bicamada lipídica. Podem ser formadas, especialmente, por hidratação de filme lipídico e por eletroformação,
- Vesículas Multilamelares (MLVs): 200nm-ordem de micrômetros, apresentando duas ou mais lamelas. São formadas, principalmente, por hidratação de filmes lipídicos.

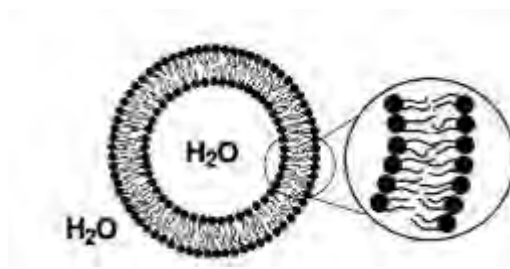


Figura 1.6: *Desenho esquemático de um lipossomo: a bicamada lipídica formada pela agregação dos fosfolipídios separa o interior aquoso da vesícula do meio externo aquoso. (MENGER; KEIPER, 1998)*

1.1.2 Termodinâmica da Bicamada Lipídica

As moléculas lipídicas podem arranjar-se com diferentes tipos e grau de ordem, correspondendo a diferentes fases, que são caracterizadas por um arranjo espacial e liberdade de movimentação de cada lipídio em relação ao seu vizinho. A fase reflete a ordem do sistema e sua alteração pode ser induzida por variação de temperatura. O número e o tipo de estados de fases lipídicas possíveis variam dependendo do lipídio. Há duas fases lipídicas principais: uma fase gel altamente ordenada e uma fase fluida desordenada (Figura 1.7).

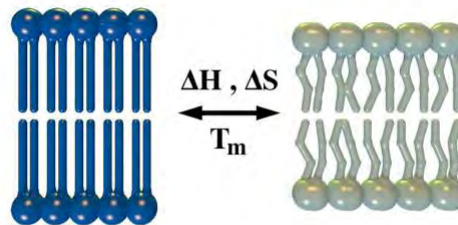


Figura 1.7: *Transição de fase lipídica da fase gel (ordenada) para a líquida (desordenada). Quando os lipídios mudam de fase a entalpia e a entropia aumentam. T_m é a temperatura de transição.*

Se as cadeias de hidrocarbonetos são saturadas, as rotações ao redor de todas as ligações C-C são possíveis. Quando nenhuma das ligações C-C são rotacionadas (denominada configuração totalmente trans) os lipídios têm energia interna minimizada. As cadeias de hidrocarbonetos são paralelas e totalmente estendidas. Essa fase é chamada de fase gel (L_β). A configuração total-trans seria a única no caso ideal ($S=0$); esta configuração teria a mínima entropia, pois $S = k_B \ln(g)$ onde g é o número de estados acessíveis e k_B a constante de Boltzmann, porém na

natureza isso não pode ser aplicado. Quando a temperatura é aumentada o número de estados acessíveis aumenta, aumentando, assim, a entropia, devido à rotação da ligação C-C. As rotações fazem as cadeias de hidrocarbonetos retorcerem obtendo uma maior área e menor espessura no estado fluido (L_α) do que na fase gel quando a cadeia está mais rígida (Figura 1.7).

Há diferentes subclasses de fases gel e líquida que são (Figura 1.8) (CEVC, 1991):

- L_c : fase cristalina ou "nativa".
- L'_β : fase sólida ordenada ou "gel". As cadeias lipídicas são empacotadas altamente ordenadas e inclinadas.
- P_β : fase "ripple". Lipídios estão no estado altamente ordenado mas mostra defeito de linha (ondulação).
- L_α : fase líquida desordenada ou "fluida". Cadeias lipídicas estão desordenadas e distribuídas aleatoriamente na membrana.

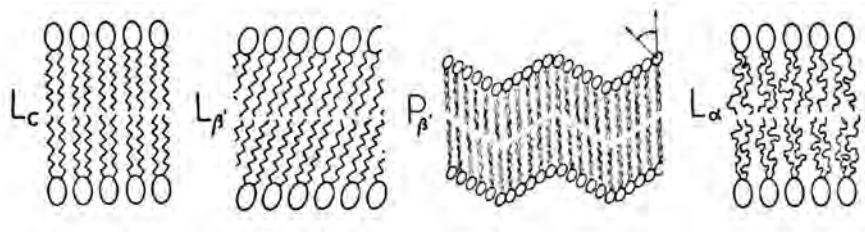


Figura 1.8: *Diferentes fases lipídicas: cristalina (L_c), gel (L'_β), "ripple" (P_β) e líquida (L_α).*

A transição gel-fluido é um processo endotérmico no qual o calor absorvido é relativamente grande. Com a mudança entrópica a membrana aumenta o volume e a bicamada diminui a espessura. Medindo a absorção de calor pelos lipídios em função da temperatura, pode-se verificar se existe transição de fase. A capacidade térmica é definida como a quantidade de calor necessária para elevar a temperatura de um sistema por um dado incremento de temperatura ($C_p = \Delta Q / \Delta T$). Em geral, observa-se um pico bastante pronunciado da capacidade térmica em função da temperatura, que corresponde à transição de fase. Deste modo, medir a variação da capacidade térmica é uma maneira de determinar transições de fase. Fases lipídicas não variam somente a conformação do lipídio, mas também toda a geometria do agregado lipídico (Figura 1.8).

1.1.3 Modelo de Transição de Fase Lipídica

O modelo termodinâmico para a transição de fase na bicamada lipídica geralmente começa com a hipótese inicial de um sistema de dois estados, ou seja, uma molécula ou região da molécula dentro da estrutura pode estar em um estado ou em outro. Considerando a transição térmica do estado gel (A) para o estado líquido (B), existe uma entalpia associada com uma energia adicionada na forma de calor para superar as forças intermoleculares de Van der Waals entre as moléculas lipídicas. Esta entalpia de transição, chamada de entalpia calorimétrica (ΔH_{cal}), é, geralmente, determinada usando técnicas calorimétricas.

A fração da bicamada na fase líquida-cristalina, Θ , pode ser descrita termodinamicamente com uma constante de equilíbrio entre os dois estados.

gel \rightleftharpoons líquido-cristalino

$$K = \frac{[A]}{[B]} \quad (1.1)$$

$$\Theta = \frac{[A]}{[B] + [A]} \quad (1.2)$$

$$\Theta = \frac{K}{1 + K} \Rightarrow K = \frac{\Theta}{1 - \Theta} \quad (1.3)$$

onde as concentrações [A] e [B], dos estados gel e líquido-cristalino, respectivamente, foram normalizadas em um determinado estado padrão.

A dependência de K com a temperatura é descrita pela equação de van't Hoff, definindo uma entalpia aparente, ΔH_{vH} (BLUME, 1991):

$$K(T) = K(T_m) \exp \left[\frac{-\Delta H_{vH}}{R(1/T - 1/T_m)} \right] \quad (1.4)$$

onde R é a constante dos gases, T é a temperatura, T_m a temperatura no ponto médio da transição onde $\Theta=0,5$ e $K(T=T_m)=1$.

Em um experimento de calorimetria diferencial de varredura (DSC) a capacidade térmica diferencial, c_{dif} , é medida em função da temperatura. c_{dif} é relacionada à entalpia de transição total, Δh_{cal} , e ao Θ dependente da temperatura pela equação:

$$c_{dif} = \Delta h_{cal} \left(\frac{d\Theta}{dT} \right) \quad (1.5)$$

$$\frac{d\Theta}{dT} = \left\{ \frac{\exp [(-\Delta H_{vH}/R) (1/T - 1/T_m)] \Delta H_{vH}/RT^2}{(1 + \exp [(-\Delta H_{vH}/R) (1/T - 1/T_m)])^2} \right\} \quad (1.6)$$

Calculando $\frac{d\Theta}{dT}$ das equações (1.3) e (1.4) e substituindo na equação (1.5), tem-se:

$$c_{dif} = \Delta h_{cal} \left\{ \frac{\exp [(-\Delta H_{vH}/R) (1/T - 1/T_m)] \Delta H_{vH}/RT^2}{(1 + \exp [(-\Delta H_{vH}/R) (1/T - 1/T_m)])^2} \right\} \quad (1.7)$$

O valor de Δh_{cal} é determinado pela curva experimental de DSC pela integração abaixo do pico em um intervalo de temperatura que vai de uma temperatura T_{on} onde o desvio da linha de base começa até a T_{off} onde o sinal retorna a linha de base:

$$\int_{T_{on}}^{T_{off}} c_{dif} dT = \Delta h_{cal} \quad (1.8)$$

Δh_{cal} pode ser convertido em entalpia de transição molar, ΔH_{cal} , conhecendo a quantidade do material analisado.

A cooperatividade da transição gel-líquida cristalina descreve a extensão, como uma função da temperatura, para que a transição ocorra na bicamada. A cooperatividade implica que as moléculas de lipídio não sofrem uma transição de fase independentemente, mas, sim, de uma maneira correlacionada.

Uma transição cooperativa significa que a constante de equilíbrio entre os dois estados tem dependência muito forte com a temperatura assim como a entalpia aparente. A relação entre as entalpias de van't Hoff e calorimétrica é denominado tamanho da unidade cooperativa (u.c.), ou seja, é uma medida do grau de cooperatividade entre as moléculas lipídica. (CEVC, 1991) (STURTEVANT, 1987)

$$\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}} = u.c. \quad (1.9)$$

ΔH_{vH} reflete a entalpia associada com a transição de toda a unidade cooperativa. ΔH_{cal} é a entalpia associada às forças intermoleculares entre as moléculas lipídicas.

Para determinar u.c. ΔH_{vH} deve ser conhecido. Isto é calculado substituindo T por T_m na equação (1.6), onde $\Theta=0,5$. Assim tem-se:

$$\left(\frac{d\Theta}{dT}\right)_{T_m} = \frac{\Delta H_{vH}}{4RT_m^2} \quad (1.10)$$

$$\Delta H_{vH} = 4RT_m^2 \left(\frac{d\Theta}{dT}\right)_{T_m} = \frac{4RT_m^2 C_{max}}{\Delta H_{cal}} \quad (1.11)$$

Então ΔH_{vH} pode ser calculado quando c_{dif} assume seu valor máximo em T_m , onde C_{max} é expressado em unidades molar.

A cooperatividade também pode ser expressada em função da largura da temperatura na meia altura, $\Delta T_{1/2}$, ou como a diferença entre as temperaturas do começo ou limite inferior da transição de fase, T_s , e a completa ou limite superior, T_l , ou $\Delta T_{1/2}=T_l-T_s$. A partir de valores de T_m e $\Delta T_{1/2}$ determinados para uma transição de fase particular a entalpia de van't Hoff, ΔH_{vH} pode ser, aproximadamente, determinada pela relação ((MCELHANEY, 1982)):

$$\Delta H_{vH} \cong \frac{4RT_m^2}{\Delta T_{1/2}} \quad (1.12)$$

1.1.4 Temperatura de Transição

A temperatura de transição de fase, usualmente denotada por T_m , é a temperatura na qual a capacidade térmica atinge o máximo. Para uma curva simétrica T_m representa a temperatura em que a transição gel-líquido cristalina está completa pela metade, ou seja, 50% dos lipídios estão na primeira fase e 50% estão na segunda fase. Então a probabilidade de estar nas duas fases é a mesma. Se a curva for assimétrica, que é característica de certos fosfolipídeos puros e muitas membranas biológicas ((MCELHANEY, 1982)), T_m não representa o ponto médio da transição de fase, e $T_{1/2}$ é então determinado. Na transição de primeira ordem a mudança de energia livre do sistema é zero; o que permite determinar T_m em função da variação da entropia e da entalpia na transição. De acordo com a equação de Gibbs, tem-se:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \xrightarrow{T=T_m} T_m = \Delta H_m / \Delta S \quad (1.13)$$

1.1.5 Domínios lipídicos

Ao longo das duas últimas décadas tornou-se evidente que a organização lateral da bicamada lipídica é preferencialmente estruturada em termos de domínios lipídicos. Estes domínios têm comprimento variando de nanômetros até a ordem de micrômetros. Resultados de estudos teóricos e experimentais de membranas demonstraram claramente que a formação de domínios lipídicos e estruturas lipídicas em pequenas escalas, em certos contextos chamados de "rafts", desempenham um importante papel como unidades de regulação para um grande número de funções biológicas que ocorrem na membrana ou estão associados a ela (SIMONS; IKONEN, 1997) (BROWN; LONDON, 1998). Estruturas lipídicas em grande escala podem ser estabilizadas por separação de fase termodinamicamente estática, pelo acoplamento de proteínas de membrana ao citoesqueleto, ou por regiões da membrana localmente curvadas (SACKMANN, 1994) (KUSUMI; SAKO, 1996). Formação de domínios de pequena escala é possível de ser controlado pela natureza das interações lipídio-lipídio (NIELSEN A. VISHNYAKOV; MOURITSEN, 2000). Tem sido demonstrado que a heterogeneidade da membrana e a formação de micro-domínios são importantes para a atividade de enzimas e proteínas associadas à membrana. Membranas nativas são altamente complexas com grande heterogeneidade na composição lipídica. Misturas binárias e ternárias de lipídios são modelos altamente simplificados de membranas nativas que têm sido utilizados com sucesso na compreensão da segregação de componentes lipídicos e da coexistência de domínios lipídicos. Separação lateral de fase vem sendo demonstrada em sistema de misturas líquido-líquido e líquido-gel (JANMEY; WEITZ, 2004), e o colesterol deve desempenhar um papel nas separações de fase (DEVAUX; AL, 2006). Alguns pesquisadores sugerem que a causa da separação lateral de fase dos lipídios é uma alteração física na estrutura da membrana, como uma mudança no raio de curvatura (BALASUBRAMANIAN; SCHROIT, 2003).

2 *Materiais e Métodos*

2.1 *Materiais*

Os lipídeos usados nos diferentes experimentos foram 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (*POPC*), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (*POPG*), dipalmitoil-sn-fosfatidiletanolamina (*DPPE*), dipalmitoil-sn-fosfatidilglicerol (*DPPG*), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-fosfatidiletanolamina (*POPE*), dioleoil-sn-fosfatidilglicerol (*DOPG*) adquiridos da Avanti Polar lipidis, Inc. O lipídeo com marcador fluorescente utilizado foi o 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (*NBD – PE*), também fornecido pela Avanti. As soluções estoques de lipídeos em diferente razões molares foram preparadas em clorofórmio/metanol (2:1/v:v). Todos os lipídios e marcadores foram utilizados sem purificação adicional. As concentrações de fosfolipídeos foram determinadas por pesagem usando uma balança analítica.

Peptídeos Mastoparano X (MPX), Polybia-MP-1 (MP-1) e N2-Polybia-MP-1 (N-MP-1) foram sintetizados pelo grupo do Prof. M. Palma da UNESP de Rio Claro. Os peptídeos L1B, L1A e ac-L1A foram sintetizados pelo Prof. Dr. Luis Juliano Neto. A tabela 2.1 mostra as características desses peptídeos.

		N_{aa}	Q
MPX	<i>INWKGIAAMAKKLL – NH₂</i>	14	+4
N-MP-1	<i>INWKKLLDAAKGIL – NH₂</i>	14	+3
MP-1	<i>IDWKKLLDAAKGIL – NH₂</i>	14	+2
L1B	<i>AbzIDGLKAIWKKVADLLKNT – NH₂</i>	18	+2
L1A	<i>IDGLKAIWKKVADLLKNT – NH₂</i>	18	+3
ac-L1A	<i>AcIDGLKAIWKKVADLLKNT – NH₂</i>	18	+2

Tabela 2.1: *Propriedades estruturais dos peptídeos: carga líquida (Q) incluindo C-terminal amidado e número de resíduos de aminoácidos (N_{aa}).*

As soluções estoques de peptídeos foram preparadas com água bi-destilada e mantidas refrigeradas; a concentração final foi checada espectroscopicamente em 280nm e 314nm, consi-

derando as absorvidades molares do triptofano e do Abz como sendo $5580 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ((ITO et al., 1998)), respectivamente.

As soluções estoques e tampão foram preparados analiticamente, com reagentes de grau analítico (Sigma).

Foi utilizado tampão PIPES 20 mM (1 mM EDTA, 140 mM NaCl) , pH 7,4. O pH foi ajustado com adição de HCl e/ou NaOH.

Soluções de glicose e sacarose foram preparadas com reagentes com alto grau de pureza e a osmolaridade foi medida com um osmômetro (Osmette A 5002, Precision Systems, Inc., USA).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação de Vesículas

Os sistemas modelos lipídicos estudados neste trabalho foram preparados com lipídeos que variam o tamanho da cadeia e o grau de saturação. As especificações dos lipídeos e do marcador pode ser encontrado nas tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente.

Fosfolipídeo	Tamanho da cadeia	Temperatura de transição	Peso molecular
DPPE	16 : 0/16 : 0	63 °C	691,959 g/mol
POPE	16 : 0/18 : 1	25 °C	717,996 g/mol
POPC	16 : 0/18 : 1	-2 °C	760,076 g/mol
DPPG	16 : 0/16 : 0	41 °C	744,952 g/mol
DOPG	18 : 1/18 : 1	-18 °C	797,026 g/mol
POPG	16 : 0/18 : 1	-2 °C	770,989 g/mol

Tabela 2.2: Especificação dos fosfolipídeos utilizados.

Marcador	Tamanho da cadeia	Abs. máxima	Emissão máxima	Peso molecular
NBD-PE	18:1	535 nm	460 nm	924,155 g/mol

Tabela 2.3: Especificação do marcador fluorescente usado, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)

A figura 2.1 apresenta as estruturas dos fosfolipídeos e do marcador fluorescente utilizados neste trabalho.

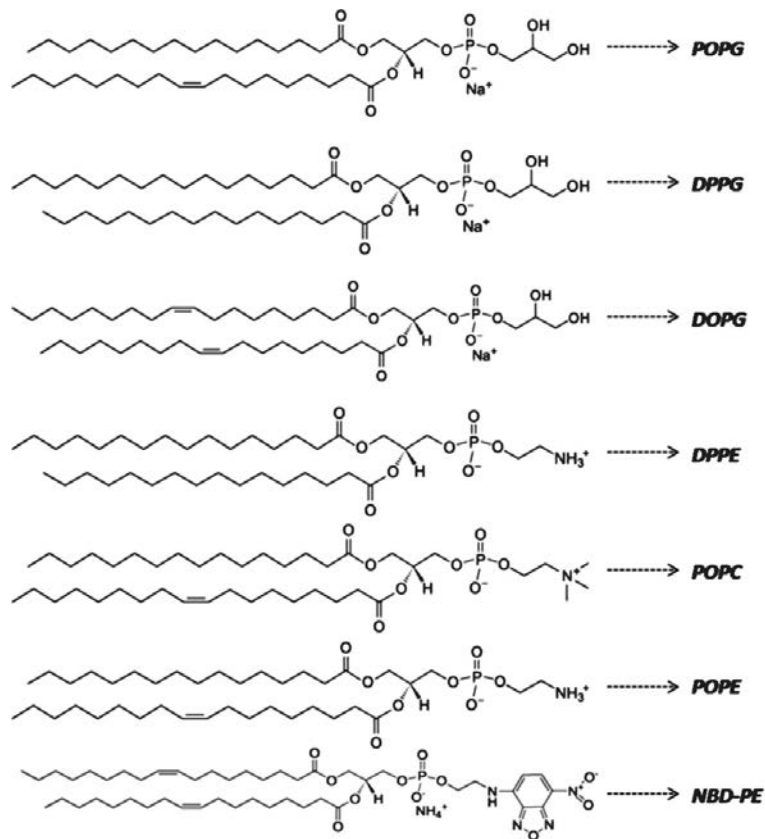


Figura 2.1: Estruturas dos fosfolipídeos e do marcador utilizados neste trabalho.

2.2.1.1 Vesículas para Calorimetria (MLVs)

Inicialmente deposita-se a mistura de fosfolipídios diluída em clorofórmio/metanol (2:1/v:v), numa determinada concentração, em tubos de vidro com fundo arredondado. O solvente é então evaporado sob o fluxo de nitrogênio (N_2) sob agitação suave e à temperatura aproximadamente $10\text{ }^\circ\text{C}$ acima da temperatura de transição da mistura lipídica; formando um filme fino nas paredes do fundo do tubo. O excesso de solvente orgânico é retirado a vácuo durante, no mínimo, 3 horas. Solução tampão PIPES (20 mM PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-ácido etanosulfônico)], 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, pH 7,4) é adicionado ao filme lipídico na temperatura acima da transição de fase gel-líquida cristalina da mistura fosfolipídica em estudo, e a suspensão é submetida à agitação em vórtex em ciclos de 2 minutos para deslocar as bicamadas que haviam sido empilhadas sobre as paredes do tubo, levando à reorganização dos lipídios em vesículas multilamelares (MLVs). A concentração lipídica das amostras foi de 2-3 mg/ml (EPAND et al., 2009a). Em outra situação, amostras contendo o peptídeo (lipídeo/peptídeo na razão molar de 400:1 e/ou 15:1) foram preparadas por adição da solução tamponante contendo peptídeo na concentração específica, na temperatura acima da temperatura de transição.

Depois de preparadas, as amostras são deixadas em repouso para equilibrar à temperatura ambiente e estão prontas para serem usadas.

A figura 2.2 ilustra a preparação das vesículas.

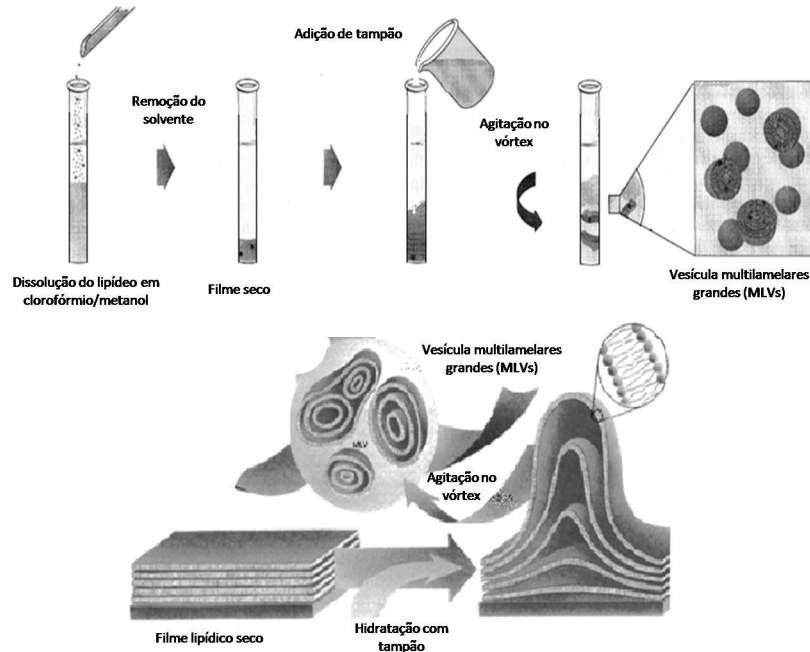


Figura 2.2: Esquema de preparação de lipossomos.

2.2.1.2 Vesículas para Microscopia (GUVs)

Vesículas unilamelares gigantes (GUVs) feitas das misturas de fosfolipídeos específicos foram preparadas utilizando o método de eletroformação. Este método foi primeiramente descrito por Angelova (ANGELOVA; DIMITROV, 1986), sendo um método relativamente de rápido preparo e confiável. Resumidamente, 20 μl de uma solução lipídica em clorofórmio/metanol (2:1/v:v) a 2 mg/ml foi espalhada na superfície de duas placas condutoras (revestida com óxido de estanho, índio ITO) e foram deixadas no vácuo por algumas horas para remover o excesso de solvente orgânico. As placas revestidas de fosfolipídeo foram separadas por um separador de teflon com 2 mm de espessura para formar uma câmara que foi preenchida com uma solução de sacarose 0,2 M. As placas condutoras, foram então, conectadas com um gerador de função (Minipa, MFG-4202), e uma corrente alternada de 1 V com uma frequência de 10 Hz foi aplicada por aproximadamente 1 h. Antes da observação, a solução de vesícula foi diluída mais ou menos 7 vezes em uma solução de glicose 0,2 M para criar uma assimetria de densidade e índice de refração entre o meio interno e externo da vesícula. As vesículas foram estabilizadas pela gravidade no fundo da câmara de observação, tendo um melhor contraste quando observa-

das com microscopia de contraste de fase. Nas vesículas observadas por meio da microscopia de fluorescência foram adicionadas sondas fluorescentes na solução estoque dos fosfolipídeos (menos de 1% em mol). As imagens de fluorescência podem evidenciar defeitos ou detalhes das vesículas não observadas por meio de microscopia de contraste de fase, (DIMOVA et al., 2006).

2.2.2 Observação das GUVs

GUVs preparadas por eletroformação foram observadas usando um microscópio invertido Olympus IX71, Tokyo, Japan. A fonte de luz é uma lâmpada de tungstênio, para microscopia de campo claro e contraste de fase, e uma fonte com lâmpada de mercúrio, para microscopia de fluorescência. O microscópio possui lentes objetivas planas semi-apocromáticas com poder de aumento de 10x, 20x, 40x, 40x para microscopia de contraste de fase e 100x de imersão a óleo. Para a prática de microscopia de fluorescência são utilizados filtros de excitação azul (330-385 nm), verde (460-490 nm) e vermelho (510-550 nm). As imagens são capturadas por uma câmera CCD acoplada ao microscópio e conectada a um computador. O microscópio está ilustrado na figura 2.3 .



Figura 2.3: *Microscópio invertido Olympus IX71.*

Dois diferentes métodos experimentais foram usados. No primeiro, uma solução de glicose contendo peptídeo a uma determinada concentração foi injetada com uma microseringa na suspensão lipídica. A concentração de peptídeo na solução de glicose é tal que, na câmara

de observação, a concentração de peptídeo seja $10 \mu\text{M}$. No outro método, o peptídeo foi adicionado à solução de fosfolípídeo na câmara de crescimento para que fossem incorporados ao filme lipídico; desse modo o peptídeo tem acesso às monocamadas interna e externa durante a formação das GUVs.

O marcador usado, NBD-PE, é um cromóforo fluorescente que absorve energia na região de 560 nm como especificado na tabela 4. Quando esta sonda liga-se covalentemente a diferentes fosfolípídios, em diferentes posições da cadeia de ácido graxo ou até mesmo na cabeça polar, garante diferentes localizações (em relação à profundidade) em uma bicamada lipídica, constituindo assim um bom aceitador.

2.2.2.1 Princípios Físicos da Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência segue o seguinte fenômeno: O átomo fica excitado quando absorve energia $h\nu$, sendo h a constante de Planck e ν denotando a frequência; o elétron, após absorver esta energia, transita do seu estado fundamental (energia E_0) para um nível energético superior (energia E_n); ao retornar ao seu estado inicial o elétron emite um fóton com energia $h\nu = E_n - E_0$.

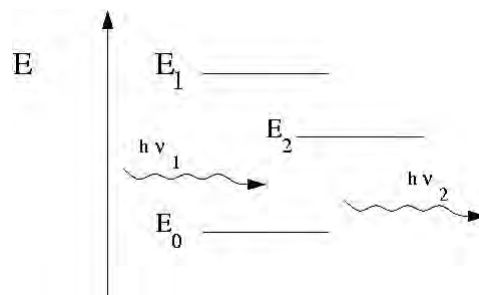


Figura 2.4: *Princípio da microscopia de fluorescência: Um átomo sai do seu estado de energia E_0 para um estado de energia superior. Quando este decai para o nível de menor energia ele emite um fóton. O decaimento segue quase que instantaneamente após a excitação.*

Desta forma, o papel do microscópio de fluorescência consiste em permitir que a luz de excitação irradie a amostra e depois separe a luz emitida mais fraca para formar a imagem. Assim, primeiro, a luz, originária da fonte de luz colocada num extremo do microscópio, encontra-se frente a um filtro de excitação que apenas vai deixar passar a radiação com o comprimento de onda desejado, sendo este coincidente com o material fluorescente. A radiação depois passa pelo espelho dicromático, que faz com que rode 45° colidindo então com os átomos da amostra, o que leva a que os elétrons sejam excitados para um nível energético superior. Quando estes átomos perdem a energia de excitação, retomam o nível energético de repouso e emitem luz

(fótons). Para se tornar visível, a luz emitida torna a passar pelo espelho dicromático sendo depois separada da luz de excitação (absorção) mais brilhante num filtro de barreira. Aqui, o fato de a luz emitida ter energia mais baixa e um maior comprimento de onda é usado para permitir a separação. As áreas fluorescentes são então exibidas e podem ser observadas visualmente ou detectadas pela câmera CCD.

2.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Medidas foram feitas usando calorímetro diferencial de varredura (Nano DSC, Model CDC 6300, USA).

Neste experimento as células calorimétricas, com volume de 300 μl foram pressurizadas em aproximadamente 3 atm para evitar bolhas no aquecimento, e perda do solvente por evaporação. As varreduras de aquecimento e resfriamento foram registradas numa mesma taxa de 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ com uma espera de 10 min para equilíbrio. A concentração total de lipídios das MLVs nas amostras em estudos foram mantidas entre 2-3 mg/ml. Os termogramas, curvas de potência em função da temperatura, foram obtidas com Origin, versão 7.0 e analisadas pelo programa DSCRun. As entalpias calorimétricas foram calculadas por integração da área abaixo do pico de transição e as entalpias de van't Hoff através da equação (1.11).

O desenho esquemático do interior do calorímetro é dado pela figura 2.5.

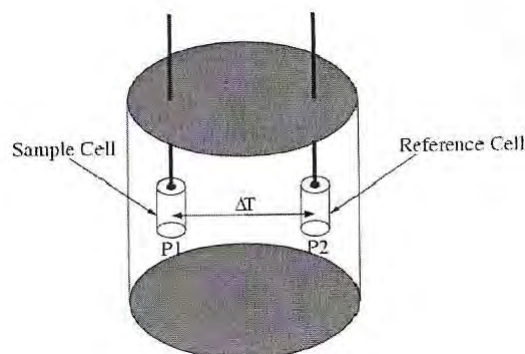


Figura 2.5: *Desenho esquemático da célula do calorímetro diferencial de varredura (DSC).*

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica utilizada para o estudo de transições termicamente induzidas e, particularmente, transições conformacionais de macromoléculas biológicas (EPAND, 2007). Neste trabalho DSC é utilizado para monitorar e caracterizar as mudanças no estado físico em bicamadas lipídicas e para caracterizar as perturbações nesses agregados causadas pelas interações com peptídeos.

O princípio do DSC é simples. Duas células são isoladas adiabaticamente. Uma célula contém a amostra enquanto a outra contém a solução de referência. No nosso caso a referência é, usualmente, a solução tampão e a amostra é a solução de vesículas. Durante a varredura a temperatura é regulada em uma taxa de varredura constante até que a diferença de temperatura entre as duas células seja zero (JORDO, 2007). Quando um processo, iniciado termicamente, ocorre na célula da amostra, o sistema de controle responde aumentando ou reduzindo o fornecimento de calor para o célula de amostra de modo que sua temperatura seja igual à da célula de referência. Os dados de saída do calorímetro é o correspondente excesso de energia, apresentado como uma função da temperatura.

O equipamento utilizado registra o excesso de energia (ΔP), o tempo (t) e a temperatura (T). A diferença das potências não é igual a zero ($\Delta P = P_{amostra} - P_{referência} \neq 0$). Em seguida o excesso de calor (ΔQ) necessário para mudar a temperatura e a diferença da capacidade térmica, ΔC_p , (a pressão constante) entre a amostra e a referência são calculados. A diferença de calor, ΔQ é proporcional à diferença da potência ΔP . Assim:

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P dt \cong \Delta P \Delta t \quad (2.1)$$

ΔQ é, por sua vez, proporcional ao excesso de capacidade térmica, ΔC_p , pela seguinte relação termodinâmica:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta Q}{\delta T} \right)_p \approx \frac{\Delta Q}{\Delta T} \approx \frac{\Delta P \Delta t}{\Delta T} \approx \frac{\Delta P}{\Delta T / \Delta t} \quad (2.2)$$

onde $\Delta T / \Delta t$ é a taxa de varredura.

Se o evento térmico que ocorre é endotérmico, então, mais calor é necessário e há uma inflexão para cima da curva de DSC. Se o processo é exotérmico a inflexão é para baixo (MCELHANEY, 1982).

A mudança de entalpia, ΔH pode ser obtida pela integração da curva de C_p , desde que:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta H}{\delta T} \right)_p \quad (2.3)$$

seja um processo reversível. A mudança da entalpia pode ser usada para calcular o módulo de flexão da membrana na transição de fase principal.

3 *Resultados e Discussões*

3.1 **Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

Peptídeos antimicrobianos têm uma grande vantagem por terem como alvo a fase lipídica da membrana, podendo ser utilizados na primeira linha de defesa em infecções por inúmeras espécies desde plantas a mamíferos. As interações eletrostáticas desempenham papel importante na seletividade destes peptídeos, pois a camada externa da membrana de microorganismos possui lipídios aniônicos enquanto que a de eucariotos é rica em lipídios zwitteriônicos (neutros). A interação preferencial destes peptídeos com membranas fosfolipídicas aniônicas é típica para alguns peptídeos e, em alguns casos, a interação destes com bicamadas aniônicas resulta na segregação da carga ou separação lipídica lateral induzindo, portanto, a formação de domínios. Para exercer suas funções, a membrana celular segrega lateralmente seus constituintes, e existe a evidência da presença de domínio lipídicos na membrana das bactérias com características funcionais (EPAND, 2007). Nesta primeira parte do trabalho, focamos em três peptídeos mastoparanos, MP-1 extraído da *Polybia paulista*, seu análogo sintético N-MP-1 onde o resíduo ácido aspártico da posição 2 foi substituído pela asparagina, e MPX da *V. xanthoptera*. Estes peptídeos têm 2, 1 e nenhum resíduo de Asp, respectivamente (tabela 2.1). Em trabalhos anteriores foi mostrado por ensaios de vazamento que estes peptídeos têm atividades lítica e antimicrobiana (LEITE et al., 2010), mas o mecanismo de ação não é bem compreendido.

Fosfatidiletanolamina (PE) é o principal lipídio zwitteriônico enquanto cardiolipina (CL) e fosfatidilglicerol (PG) são os principais lipídeos aniônicos em bactérias Gram negativas. O conteúdo destes lipídios varia amplamente nestas bactérias como mostrado na tabela 3.1. Estudos já demonstraram que CL pode formar domínios segregados em membranas bacterianas assim como PG. DSC foi utilizado para investigar a influência dos peptídeos nas propriedades da transição de fase de sistemas miméticos de biomembranas, a partir do qual a natureza da interação peptídeo-lipídio pode ser avaliada (MCELHANEY, 1982). Esta técnica apresenta duas vantagens para o estudo de separação de fase, pois não há necessidade de uso de sondas espectroscópicas e pode detectar a presença de domínios pequenos demais para ser visualizados

com métodos de microscopia. DSC tem sido usado para obter evidências para a promoção da separação lateral de fase, entretanto, misturas com os três principais componentes lipídicos, PE, PG e CL, que estão presentes em algumas bactérias Gram-negativas, não são convenientes para estudos com DSC, pois, em geral, exibem transição de fase mais complexa com termograma com vários componentes (EPAND, 2007). Em face a esta complexidade é mais vantajoso utilizar um sistema binário de lipídios, que seja miscível e que dê origem a uma transição de fase gel-líquido cristalina bem definida. Se a solução de peptídeo induzir a separação lateral de fase, por ligação preferencial a um dos componentes da mistura, haverá a formação de domínio rico do outro componente lipídico, resultando em transição de fase mais cooperativa a uma temperatura mais próxima àquela do lipídeo puro.

Espécies de bactérias	Porcentagem de fosfolipídios total		
	CL	PG	PE
	Bactéria Gram-negativa		
<i>E.coli</i>	05	15	80
<i>Enterobacter cloacae</i>	03	21	74
<i>Yersinia kristensenni</i>	20	20	60
<i>Proteus mirabilis</i>	05	10	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	06	05	82
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	21	60
	Bactéria Gram-positiva		
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	58	00
<i>Streptococcus</i>	50	50	00
<i>Bacillus cereus</i>	17	40	43
<i>Bacillus polymyxa</i>	08	03	60

Tabela 3.1: Composição lipídica de várias espécies de bactérias (??).

3.1.1 Mistura POPE:DOPG (3:1)

A mistura previamente escolhida foi POPE:DOPG (3:1). Esta composição lipídica mimetiza a composição da membrana citoplasmática da *E. coli.*, que tem sido relatado ser PE:PG (85:15). Esta mistura apresenta uma única transição de fase ampla centrada em 15 °C (EPAND et al., 2008) (EPAND et al., 2009b), intermediária entre cada um dos componentes lipídicos individuais, como visto na figura 3.1. Contudo, um outro componente está presente e pode ser observado pelo "ombro" próximo a 16 °C, indicando miscibilidade incompleta desses dois lipídeos. A temperatura de transição de fase gel para líquido cristalina dos lipídeos individuais que compõem esta mistura são 25 °C para POPE e -2 °C para DOPG.

A transição do POPE:DOPG (3:1, mol:mol) é reproduzível no aquecimento e no resfriamento, exibindo um pequeno deslocamento para temperaturas mais baixas no resfriamento

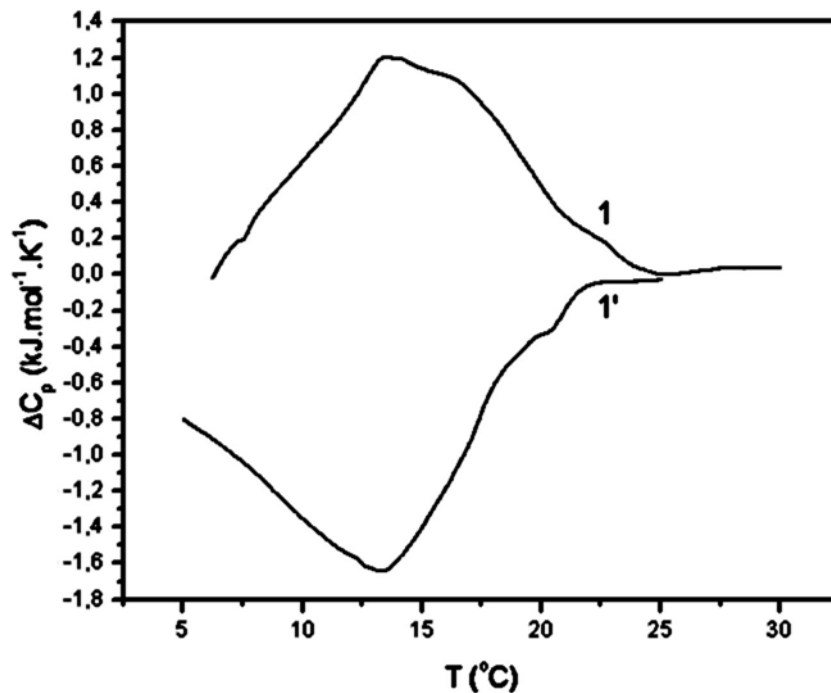


Figura 3.1: Termograma da mistura de POPE:DOPG (3:1) pura. A concentração da amostra foi de 2,5 mg/ml e a taxa de varredura de temperatura de 0,5 °C/min. As marcas 1 e 1' referem-se a varredura de aquecimento e resfriamento, respectivamente.

como mostrado no termograma da figura 3.1. Histerese entre aquecimento e resfriamento é comum em DSC e ocorre por causa do efeito cinético da transição bem como fatores instrumentais.

A adição do peptídeo MPX na hidratação do filme lipídico da mistura de POPE:DOPG resulta em uma mudança significativa no termograma (curva calorimétrica) na varredura de aquecimento, como mostrado na figura 3.2. O termograma indica aumento de 6 °C na temperatura de transição em relação ao lipídio puro, para a razão L:P = 15 e deslocamento de 1,2°C para a razão L:P=400, enquanto que a entalpia da transição decresce na presença do peptídeo, como resumido na tabela 3.2. As entalpias de van't Hoff, determinadas para a mistura lipídica pura e na presença de peptídeos, indicam que em L:P=15 a cooperatividade da transição é aproximadamente igual à da mistura lipídica pura, entretando na razão L:P=400 a transição é menos cooperativa pois ΔH_{vH} decresce de 102 kcal/mol para 75 kcal/mol.

A associação preferencial do peptídeo MPX com o lipídeo carregado negativamente segrega esses lipídeos da mistura e deixa o segundo componente lipídico na forma mais pura, resultando

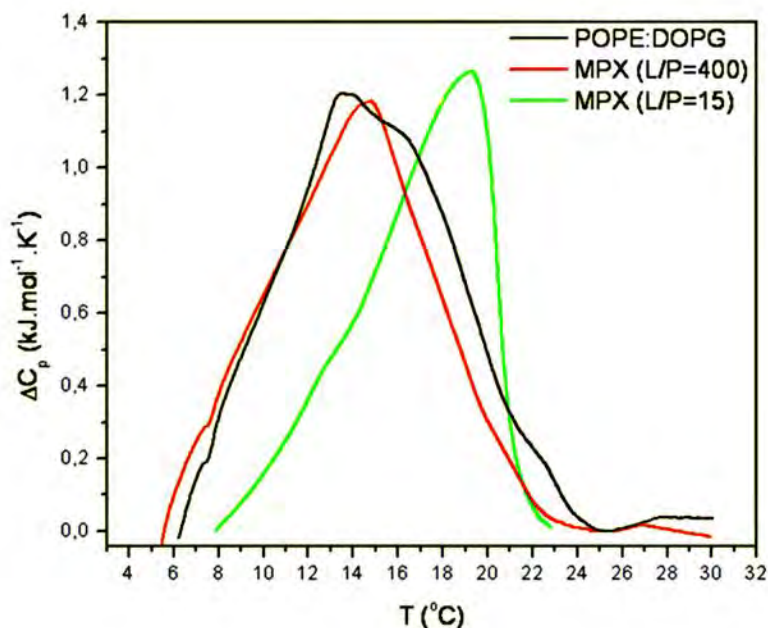


Figura 3.2: Termograma da mistura lipídica POPE:DOPG (3:1) na ausência e presença do MPX. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min. As cores indicam: (preto) ausência do peptídeo, (vermelho) presença do MPX na razão de 400 e (verde) MPX na razão 15.

em temperatura de transição de fase mais próxima do lipídeo zwitteriônico puro. Dentre os três peptídeos estudados, MPX, N-MP-1 e MP-1, o MP-1 maior efeito no comportamento de transição de fase do lipídeo em alta razão L:P=400 (Figura 3.3). Existe uma componente maior na faixa de 17-20 °C indicativo de uma segregação lipídica devido à ligação dos peptídeos no fosfolipídio aniônico.

A ligação dos peptídeos ao DOPG causa uma mudança da temperatura de transição da mistura para temperaturas mais altas como um resultado da formação de domínios de POPE. Estas mudanças observadas nestes experimentos são devido à aglomeração de lipídeos aniônicos como mostrado nas imagens de microscopia de fluorescência (artigo em anexo). Como visto nas curvas de aquecimento, os peptídeos induzem a formação de uma componente com maior temperatura de transição. Isto é consistente com a ligação destes peptídeos ao DOPG e aglomerando esses lipídeos aniônicos resultando em um domínio rico em POPE. Os peptídeos MPX e N-MP-1 têm muito pouco efeito nas propriedades de transição de fase da mistura de POPE:DOPG (3:1) para uma razão de lipídeo/peptídeo alta.

A razão de lipídeo:peptídeo de 400, em que a mistura lipídeo/peptídeo formou uma sus-

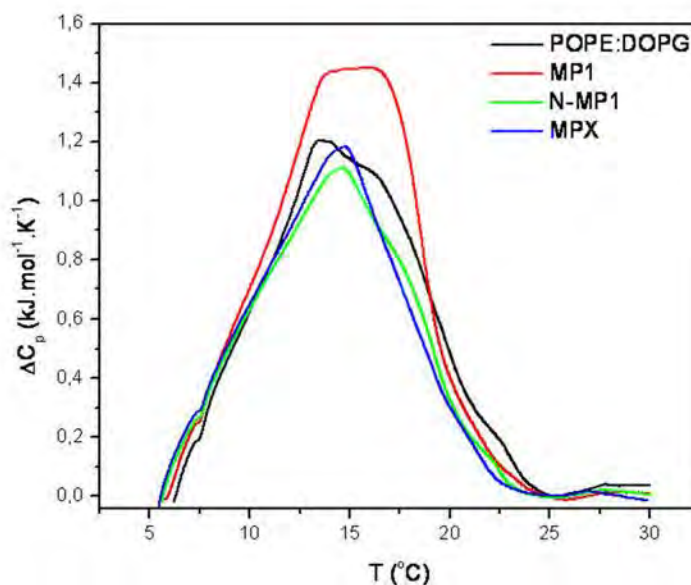


Figura 3.3: Termograma da mistura de POPE:DOPG (3:1) na ausência e presença do MPX, N-MP-1 e MP-1. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min. As curvas indicam: (preto) vesícula na ausência do peptídeo, (vermelho) presença de MP1, (verde) presença de N-MP1 e (azul) MPX, a razão na adição de todos os peptídeos é de L:P=400.

pensão homogêna, foi escolhida pois está em um intervalo de valores no qual a cooperatividade da atividade lítica do peptídeo em vesículas POPC:POPG (80:20) ainda não teve início. A ruptura da membrana tem sido mostrada ocorrer em baixa razão lipídeo:peptídeo (LEITE et al., 2010).

O intervalo de variação de temperatura usada para essa mistura nestes experimentos evita a desnaturação dos peptídeos, e ao mesmo tempo, o sistema se encontra no estado líquido-cristalino, correspondendo à fase em que se encontram as membranas das bactérias.

As entalpias calorimétrica e de van't Hoff e a temperatura de transição principal do POPE:DOPG (3:1) na ausência e presença dos três peptídeos (MPX, N-MP-1 e MP-1) são mostrados na tabela 3.2. As transições de fase têm entalpia calorimétrica numa faixa de 2-4 kcal/mol, indicativo de uma transição com cooperatividade moderada (MCELHANEY, 1982).

Quando o lipídeo aniônico é POPG em sistema similar com dois ou três componentes, a transição é bem definida, mas a temperatura de transição da mistura torna-se próximo ao do POPE puro. Isto dificulta a utilização desta mistura como mostrado na figura 3.4.

A segregação lipídica na mistura POPE:POPG foi também observada utilizando polímeros

	Aquecimento		
	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)
POPE:DOPG (3:1)	14,4	2,69	140
+ MPX (L:P=15)	19,2	2,18	99
+ MPX (L:P=400)	14,8	2,49	76
+ N-MP-1 (L:P=1400)	14,6	2,46	71
+ MP-1 (L:P=400)	16,0	3,21	71

Tabela 3.2: *Parâmetros termodinâmicos da mistura lipídica na presença e ausência dos peptídeos: T_m , temperatura da transição principal; ΔH_{cal} , entalpia calorimétrica e ΔH_{vH} , entalpia de van't Hoff.*

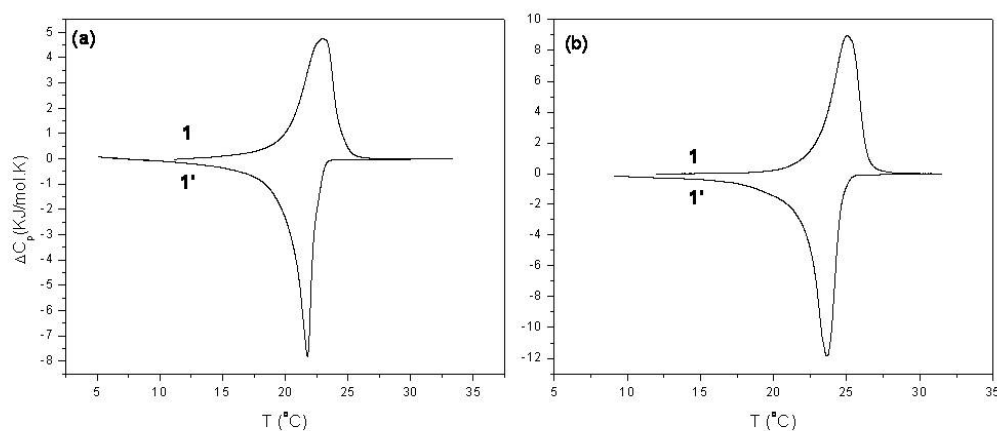


Figura 3.4: *Termogramas: (a) mistura de POPE:POPG (3:1) sem peptídeo e (b) POPE puro. A concentração da amostra foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As marcas 1 e 1' referem-se a varredura de aquecimento e resfriamento, respectivamente.*

catiônicos como poli-L-lisina (PLL). A figura 3.5 mostra o termograma da mistura de POPE:POPG (3:1) na ausência e na presença de PLL em uma razão de L:P de 450. Por apresentar alta densidade de carga, as razões lipídeo:peptídeo em que este fenômeno ocorre são muito maiores do que aquelas com peptídeos pequenos. Lisina (K) é o mais comum resíduo carregado encontrado em peptídeos antimicrobianos. Tem sido mostrado que PLL também apresenta atividade lítica e antimicrobiana (CONTE et al., 2007) e esta atividade pode estar relacionada à formação de domínios.

3.1.2 Mistura DPPE:DPPG (4:1) e (1:4)

Estudos também foram realizados com duas preparações de lipossomos compostos das misturas lipídicas DPPE:DPPG nas proporções de (4:1) e (1:4), no intuito de analisar em qual fosfolipídeo o peptídeo MPX se ligaria, zwitteriônico ou aniônico, induzindo a formação de domínio.

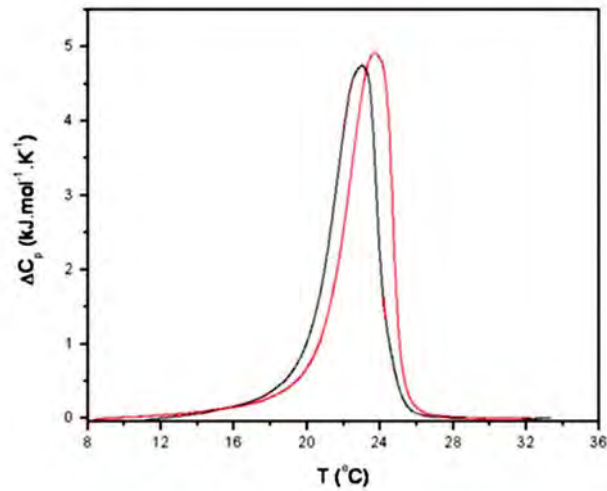


Figura 3.5: Termograma da mistura lipídica POPE:POPG (3:1) na ausência e presença de Poli-L-Lisina (PLL). A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min. As curvas (preta) e (vermelha) referem-se a varredura de aquecimento na ausência do peptídeo e na presença de PLL, respectivamente.

DPPE tem uma transição de fase estreita e centrada em 63,7 °C, enquanto que em DPPG essa temperatura é 40,2 °C (LOHNER et al., 1997). Em experimentos realizados neste estudo foi observado um transição simétrica e centrada em 63 °C para o DPPE indicativo de uma transição altamente cooperativa (figura 3.6 A). A respectiva transição observada para DPPG, centrada em 42,3 °C, (figura 3.6 B).

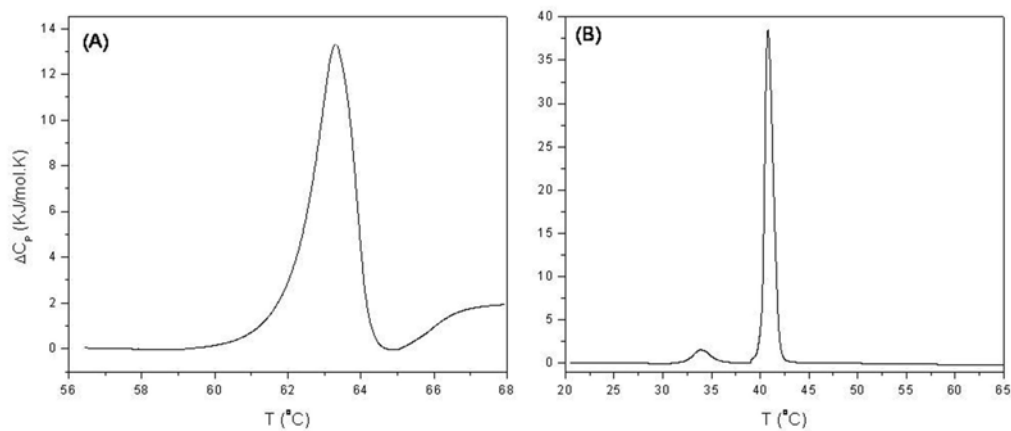


Figura 3.6: Termogramas de MLVs de DPPE e DPPG puros: DPPE (A) e DPPG (B).

A mistura DPPE:DPPG (4:1) pode ser considerada representativa da matrix fosfolipídica da

membrana plasmática da *E. Coli*. Vesículas multilameres contendo DPPE e DPPG na proporção de 4:1 exibiram uma transição principal altamente cooperativa centrada em 61,3 °C similar aos lipossomos de DPPE puro (figura 3.7 (A)), e em bom acordo com (LOHNER et al., 1997). Para a mistura (1:4), entretanto, foi observada transição de fase menos cooperativa com um máximo de capacidade térmica em 48 °C, aproximadamente. Este termograma revela a presença de um ombro, provavelmente em 46°C, sugerindo que a miscibilidade não é completa neste sistema (figura 3.7 (B)). Blume (GARIBEL; BLUME, 1999) mostrou que o diagrama de fase deste sistema apresenta uma região de imiscibilidade nas proporções de DPPE:DPPG de 2:8, 3:7 e 4:6.

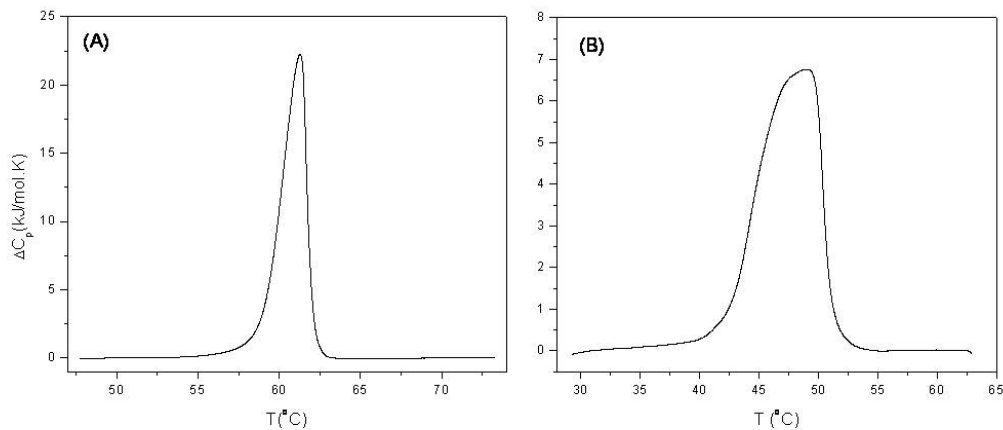


Figura 3.7: Termogramas das misturas lipídicas de DPPE:DPPG na ausência do peptídeo MPX, nas proporções de lipídios zwitteriônico:aniônico de: (A) (4:1) e (B) (1:4). A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

3.1.2.1 Impacto do peptídeo na transição de fase da mistura DPPE:DPPG

A adição do MPX na hidratação do filme lipídico resultou em uma mudança significativa nas características de transição de fase de ambas misturas lipídicas como mostrado nas figuras 3.8 e 3.9. Na mistura DPPE:DPPG (4:1) a razão lipídeo:peptídeo utilizada foi 15 e na mistura DPPE:DPPG (1:4) a razão foi 400. Na condição DPPE:DPPG (4:1) e razão L/P 15, o pico máximo não foi deslocado, ou seja, a transição principal não foi alterada. A existência do "ombro" ao redor dos 58 °C sugere imiscibilidade induzida pelo peptídeo. A cooperatividade dessa transição, aparentemente, foi pouco afetada por este peptídeo.

Na composição de DPPE:DPPG (1:4) e razão L/P 400, o termograma evidencia a presença de dois picos menos intensos e menos cooperativos do que da mistura pura. Os picos mais

acentuados, centrados em 42,5 e 47,5 °C, e um pequeno ombro ao redor de 50 °C, sugerem a segregação incompleta dos lipídios. Na curva de aquecimento o pico em 42,5 °C é mais pronunciado sugerindo que neste sistema o peptídeo tem preferência pelo lipídio zwitteriônico.

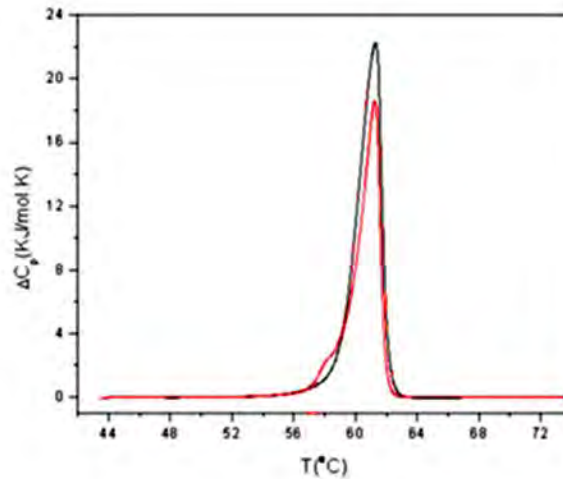


Figura 3.8: Termograma da mistura lipídica de DPPE:DPPG (4:1): (preto) na ausência e (vermelho) na presença do peptídeo MPX, na L:P = 15. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

A separação de fase é bem mais pronunciada na mistura de DPPE:DPPG (1:4). Esse peptídeo nesta composição lipídica induz a formação de domínios rico em DPPG, ligando-se ao lipídeo zwitteriônico figura 3.9.

Em adição à transição do lipídeo, deveria aparecer picos da desnaturação do peptídeo, mas a transição da desnaturação térmica deste não é detectada pelo DSC abaixo dos 70 °C. Esta desnaturação térmica não é observada pelo DSC pois a largura da transição é muito grande e/ou sua entalpia é pequena para dar origem a um pico observável no DSC nas concentrações de peptídeos utilizadas. (LOHNER et al., 1997)

Termogramas de MLVs de DPPE e DPPG puros também foram obtidos na presença do peptídeo (figura 3.10).

A presença do peptídeo causou uma pequena mudança na pré-transição do DPPG, e um pequeno aumento na temperatura de transição principal (figura 3.10 (B)). A cooperatividade da transição, praticamente, não foi alterada. Essas pequenas mudanças são características da ligação superficial do peptídeo na bicamada lipídica sem penetração na região hidrofóbica (MCELHANEY, 1982).

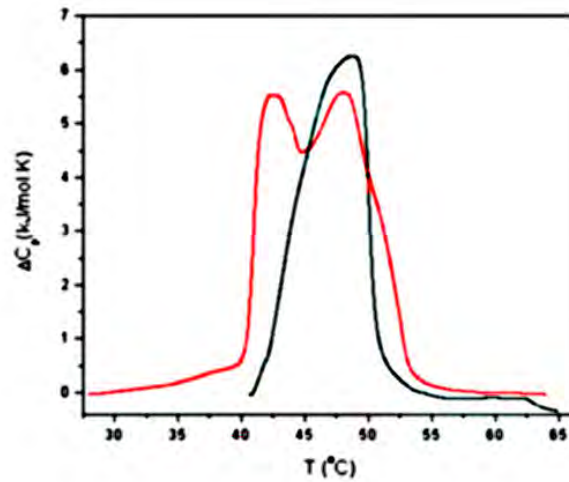


Figura 3.9: Termograma da mistura lipídica de DPPE:DPPG (1:4): (preto) na ausência e (vermelho) na presença de peptídeo, na L:P = 400. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

O termograma de vesículas de DPPE obtido na presença de MPX (figura 3.10 (A)) indicou um aumento de 0,5 °C na temperatura de transição e provocou uma aumento da intensidade do pico de transição, consequentemente, um aumento na entalpia. Essa mudança de entalpia, pode ser indicativo de ligação do peptídeo na bicamada sem formar domínios. O aumento da temperatura de transição também pode ser um indicativo para uma estabilização preferencial da fase gel quando MPX está presente.

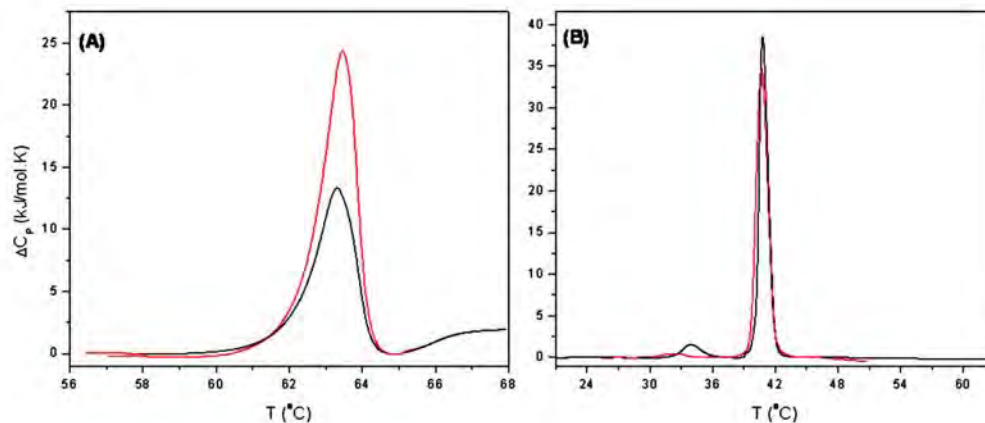


Figura 3.10: Termograma de MLVs de DPPE e DPPG puros: (preto) na ausência e (vermelho) na presença de MPX, na L:P = 400. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min. (A) DPPE e (B) DPPG.

3.2 Estudos preliminares com os peptídeos L1B, L1A e ac-L1A

Medidas de DSC foram realizadas para a composição lipídica POPE:DOPG (3:1) na presença e ausência dos peptídeos L1B, L1A e ac-L1, nas razões molares L:P=15 e L:P=400 e para a mistura DPPE:DPPG (1:4) na presença e ausência do peptídeo L1B na razão L:P=400.

3.2.1 Medidas de DSC

3.2.1.1 Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de L1B

O termograma ilustrado na figura 3.11, mostra que a presença do peptídeo L1B causa um aumento na temperatura de transição de fase gel para líquido cristalina comparado com vesículas lipídicas pura. Na razão L:P = 15 a temperatura teve um deslocamento de 8 °C e na razão L:P=400 a variação observada foi de 4°C. Esse deslocamento da temperatura é um indicativo da formação de domínios. Interpretamos os efeitos do peptídeo através do DSC dessas misturas lipídicas como sendo o resultado da interação desse peptídeo com DOPG. Uma região da membrana ficará pobre de DOPG permitindo a formação de domínios ricos em POPE, e assim, separando o lipídio aniônico do POPE. Resultando, assim, na mudança da transição de fase do componente ligado ao peptídeo.

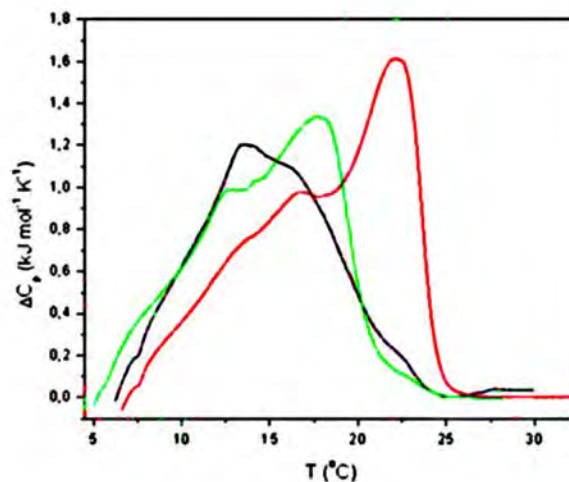


Figura 3.11: Termograma da mistura lipídica de POPE:DOPG (3:1): (preto) na ausência e (vermelho) e (verde) na presença de peptídeo L1B, nas razões L:P= 15 e L:P = 400, respectivamente. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

3.2.1.2 Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de L1A

A forma do pico de transição e a temperatura de transição de fase foram afetadas com a adição de L1A como ilustrado na figura 3.12. O aumento da concentração do peptídeo implicou no aumento de T_m . Na razão L:P=15 a temperatura de transição aumentou, aproximadamente, 7 °C. Este peptídeo promoveu o deslocamento da transição para temperaturas maiores. Isto indica que o peptídeo liga-se preferencialmente ao lipídio aniônico, DOPG.

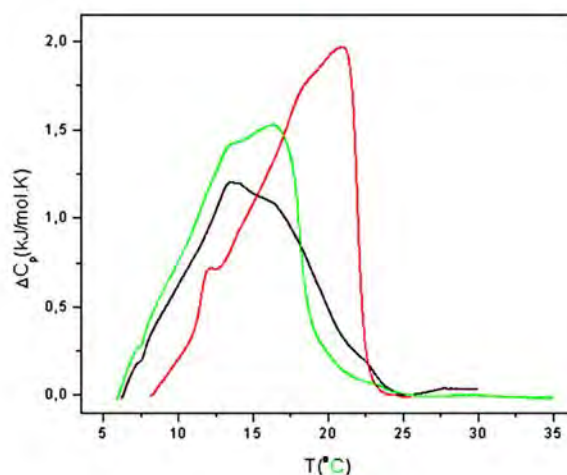


Figura 3.12: Termograma da mistura lipídica de POPE:DOPG (3:1): (preto) na ausência e (vermelho) e (verde) na presença de peptídeo L1A, nas razões L:P= 15 e L:P = 400. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

3.2.1.3 Mistura POPE:DOPG (3:1) na presença de ac-L1A

A adição de ac-L1A na razão L:P=400 foi observado apenas uma diminuição na intensidade da transição sem alteração significativa na temperatura de transição. Na razão L:P=15, ac-L1A promoveu a separação lateral de fase, causando um notável deslocamento da transição de um componente para temperaturas maiores (figura 3.13). Dois picos bem pronunciados foram observados em $T=12,5$ °C e $T=22,6$ °C. A intensidade do pico centrado em $T=22,6$ °C é bem maior do que o outro. Na segunda varredura a intensidade do pico de maior temperatura aumentou e a do pico de menor temperatura diminuiu. O fato da temperatura deslocar para temperaturas próxima da temperatura de transição gel-líquida cristalina do componente zwitteriônico indica a formação de domínios ricos de POPE, sugerindo ligação preferencial do peptídeo ao lipídio aniônico. O efeito causado por este peptídeo tem uma cooperatividade maior comparado com L1B e L1A.

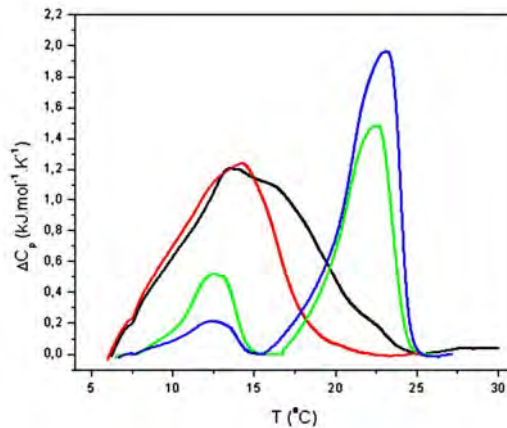


Figura 3.13: Termograma da mistura lipídica de POPE:DOPG (3:1) na ausência e na presença de peptídeo ac-L1A, nas razões L:P= 15 e L:P = 400. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min. As curvas indicam: (preto) vesículas puras, (vermelho) presença de ac-L1A na razão L:P=400, (verde) 1^o varredura na presença de ac-L1A na razão L:P=15 e (azul) 2^o varredura na razão L:P=15.

3.2.1.4 Mistura DPPE:DPPG (1:4) na presença de L1B

Na mistura lipídica DPPE:DPPG (1:4) o efeito do peptídeo L1B nas propriedades de transição de fase desta mistura lipídica sugere que o peptídeo liga-se ao componente lipídico zwitteriônico, deixando uma região da membrana pobre de DPPE e deslocando a temperatura de transição mais próxima do DPPG puro (figura 3.14).

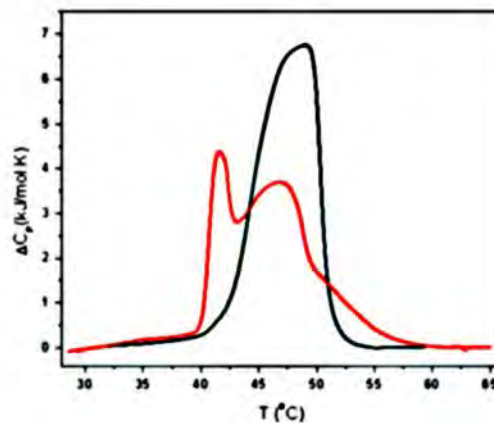


Figura 3.14: Termograma da mistura lipídica de DPPE:DPPG (1:4): (preto) na ausência e (vermelho) na presença de peptídeo L1B, na L:P = 400. A concentração da mistura foi de 2,5 mg/ml e o taxa de varredura de 0,5 °C/min.

3.2.2 Visualização de GUVs

Em experimentos de microscopia de contraste de fase e fluorescência de GUVs de POPC:POPG (3:1) com 0,5 % em mol de NBD-PE mostram a presença de 'manchas' escuras, o que sugere também a segregação dos lipídeos causada pelos três peptídeos. (figuras 3.16, 3.17 e 3.18).

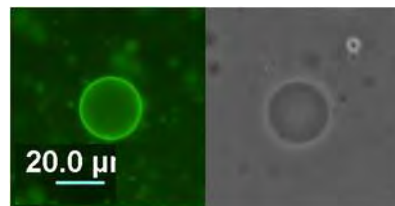


Figura 3.15: *Micrografia de fluorescência das GUVs feitas de POPC:POPG (3:1) com 0,5 mol% NBD-PE.*

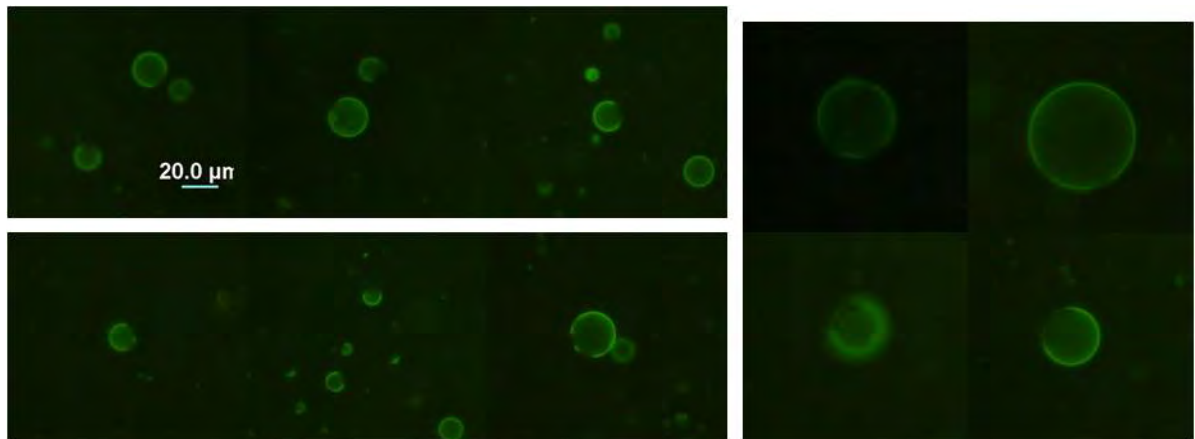


Figura 3.16: *Micrografia de fluorescência das GUVs feitas de POPC:POPG (3:1) com 0,5 mol% NBD-PE na presença do peptídeo LIB.*

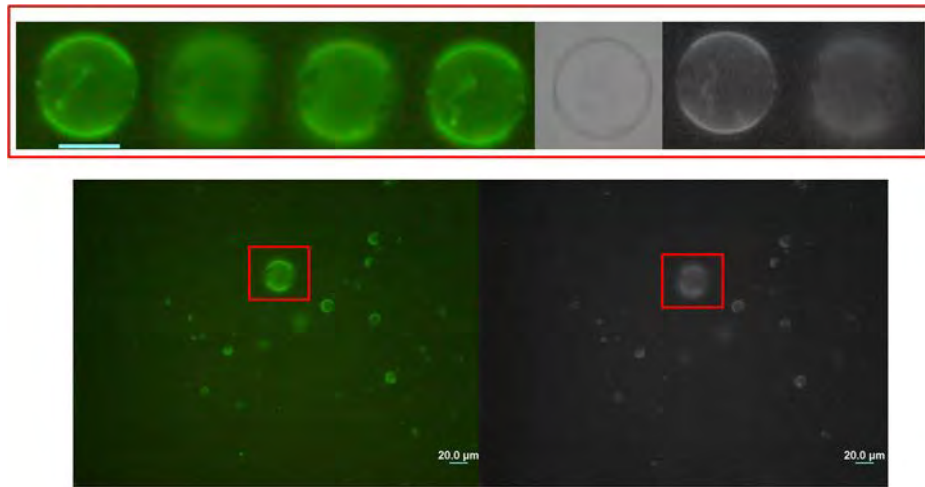


Figura 3.17: Micrografia de fluorescência das GUVs feitas de POPC:POPG (3:1) com 0,5 mol% NBD-PE na presença do peptídeo LIA.

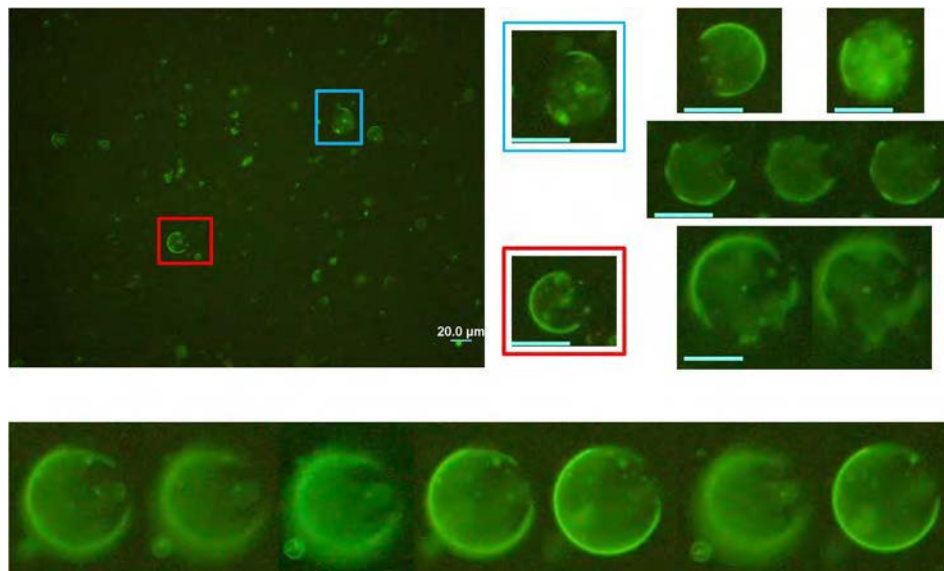


Figura 3.18: Micrografia de fluorescência das GUVs feitas de POPC:POPG (3:1) com 0,5 mol% NBD-PE na presença do peptídeo ac-LIA.

4 *Considerações Finais*

Do trabalho em anexo, concluímos que os peptídeos MPX, N-MP-1 e MP-1 assumem conformação helicoidal na presença de vesículas unilamelares pequenas (SUVs); as curvas de potencial zeta confirmam que o peptídeo acumula na superfície de membranas unilamelares grandes (LUVs) e as micrografias mostraram que os três peptídeos aumentaram a permeabilidade da bicamada induzindo a formação de poros ou defeitos perdendo o contraste gradualmente; em seguida, regiões densas foram formadas, originando agrupamentos induzidos por estes peptídeos. Os resultados de DSC para estes peptídeos e usando mistura lipídica POPE:DOPG (3:1) indicaram que eles têm capacidade de agrupar lipídios aniônicos. Esta conclusão foi ainda reforçada pela observação direta usando microscopia de fluorescência e contraste de fase. A segregação dos componentes POPE e DOPG, pode ter sido induzida pela formação de pontes de hidrogênio entre os peptídeos com grupos ácidos e básicos e as cabeças polares dos fosfolipídeos. Nós também mostramos que os outros peptídeos, L1B, L1A e ac-L1A, são também capazes de induzir a separação lateral de fase nesta mesma mistura lipídica, provavelmente, por agrupamento da carga que pode estar relacionada com sua atividade lítica em vesículas aniônicas. Os termogramas obtidos das misturas lipídicas binárias de DPPE:DPPG nas razões (1:4) com adição de MPX e L1B e (4:1) na presença de MPX mostraram que estes peptídeos ligam-se, preferencialmente, ao componente lipídico zwitteriônico, formando domínios rico de DPPE. O fato dos peptídeos ligarem ao componente lipídico aniônico em uma composição e ao componente zwitteriônico em outra, pode estar relacionado à estrutura dos fosfolipídios como insaturações na cadeia e, conseqüentemente, temperatura de transição. E ainda, a fase lipídica preferencial do peptídeo. Análises futuras serão feitas para um melhor entendimento deste mecanismo.

Referências

- ANGELOVA, M. I.; DIMITROV, D. S. Liposome electroformation. *Chem. Soc.*, n. 81, p. 303–311, 1986.
- BALASUBRAMANIAN, K.; SCHROIT, A. J. Aminophospholipidasymmetry: A matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.*, n. 65, p. 701734, 2003.
- BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1758, p. 1529–1539, 2006.
- BLUME, A. Biological calorimetry: membranes. *Thermochimica Acta*, n. 193, p. 299–347, 1991.
- BROWN, D.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell, Developmental Biology*, n. 14, p. 11136, 1998.
- CEVC, G. Isothermal lipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids*, n. 57, p. 293, 1991.
- CONTE, M. et al. Antimicrobial activity of various cationic molecules on foodborne pathogens. *Nat. Rev. Microbial*, n. 23, p. 1679–1683, 2007.
- DATHE, M. et al. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochimica Biophys Acta*, n. 1558, p. 171–186, 2002.
- DEVAUX, P. F.; AL et. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem. Phys. Lipids*, n. 141, p. 119132, 2006.
- DIMOVA, R. et al. A practical guide to giant vesicles. probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J. Phys.: Condens. Matter*, n. 18, p. 1151–1176, 2006.
- EPAND, R. F. et al. Probing the 'charge cluster mechanism' in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, n. 49, p. 4076–4084, 2010.
- EPAND, R. F. et al. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobialpeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1758, p. 1343–1350, 2006.
- EPAND, R. F. et al. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin ll-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. 53, p. 3705–3714, 2009.
- EPAND, R. F. et al. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin ll-37. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. 130, p. 3705–3714, 2009.

- EPAND, R. M. Detecting the presence of membrane domains using dsc. *Biophys. Chem.*, n. 126, p. 197–200, 2007.
- EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1788, p. 289–294, 2009.
- EPAND, R. M. et al. Bacterial membranes as predictors of antimicrobial potency. *J. Am. Chem. Soc.*, n. 130, p. 14346–14352, 2008.
- GABRIEL, G. J. et al. Infectious disease: Connecting innate immunity to biocidal polymers. *Matt. Sci. Eng.*, n. R57, p. 28–64, 2007.
- GARIBEL, P.; BLUME, A. Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of ph and acyl chain length. *Boiphys. J.*, n. 28, p. 629–638, 1999.
- GENNIS, R. B. Biomembranes: molecular structure and function. *Springer Verlag*, New York 1989.
- GLASER, M. Characterization and formation of lipid domains in vesicles and erythrocyte membranes. *Comments Mol. Cel. Biophys.*, n. 8, p. 37–51, 1992.
- HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, n. 39, p. 8347–8352, 2000.
- HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: The origin of cooperativity. *Biochimica Biophys Acta*, n. 1758, p. 1292–1302, 2006.
- HUANG, H. W.; CHEN, F. Y.; LEE, M. T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.*, n. 92, p. 198–304, 2004.
- ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. 2. ed. London: Academic Press, 1992.
- ITO, A. S. et al. Fluorescent properties of amino acids labeled with *ortho*-aminobenzoic acid. *Biospectroscopy*, n. 4, p. 395–402, 1998.
- JANMEY, P. A.; KINNUNEN, P. K. J. Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Science Direct*, 2006.
- JANMEY, P. A.; WEITZ, D. A. Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. *Trends Biochem. Sci.*, n. 29, p. 364370, 2004.
- JORDO, M. D. *The Temperatura Dependence of the Elasticity of Giant Lipid Vesicles: An Optical Tweezers, Calorimetry and Confocal Microscopy Study*. [S.l.]: Master Thesis, Department of Applied Physics, 2007.
- KUSUMI, A.; SAKO, Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current Opinion in Structural Biology*, n. 8, p. 56674, Aug 1996.
- LEITE, N. B. et al. The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and cd spectroscopy. *Amino Acids*, February 2010.

- LOHNER, K. et al. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, hnp-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems. *Biochemistry*, n. 36, p. 1525–1531, 1997.
- MATSUZAKI, K. Control of the cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica Biophys Acta*, n. 1788, p. 1687–1692, 2009.
- MATSUZAKI, K. et al. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan x translocation. *Biochemistry*, n. 35, p. 8450–8456, 2004.
- MCELHANEY, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem. and Phys. of Lipids*, n. 30, p. 229–259, 1982.
- MENGER, F. M.; KEIPER, J. S. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Current Opinion in Chemical Biology*, n. 2, p. 726–732, 1998.
- NIELSEN A. VISHNYAKOV, K. J. T. B. L. K.; MOURITSEN, O. G. Nanometre-scale structure of fluid lipid membranes. *Journal of Physics Condensed Matter*, n. 12, p. A309A314, 2000.
- POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, n. 24, p. 1681–1691, 2003.
- SACKMANN, E. The seventh datta lecture. membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*, n. 346, p. 3–16, Jun 1994.
- SATO, H.; FEIX, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, n. 45, p. 9997–10007, 2006.
- SATO, H.; FELIX, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanism of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1758, p. 1245–1256, 2006.
- SEVCSIK, E. et al. Interaction of ll-37 with model membrane systems of different complexity: Influence of the lipid matrix. *Biophysical Society*, n. 94, p. 4688–4699, 2008.
- SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1462, p. 55–70, 1999.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, n. 387, p. 569572, 1997.
- SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Sci.*, n. 175, p. 720–731, 1972.
- STURTEVANT, J. M. Biochemical applications of differential scanning calorimetry. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, n. 38, p. 463, 1987.
- WENDER, P. A. et al. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, n. 97, p. 13003–13008, 2000.

- YANDEK, L. E.; POKORNY, A.; ALMEIDA, P. F. F. Wasp mastoparans follow the same mechanism as the cell-penetrating peptide transportan 10. *Biochemistry*, n. 48, p. 7342–7351, 2009.
- YANDEK, L. E. et al. Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.*, n. 92, p. 2434–2444, 2007.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, n. 55, p. 27–55, 2003.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, n. 415, p. 389–395, 2002.

New Insight into the Mechanism of Action of Wasp Mastoparan Peptides: Lytic Activity and Clustering Observed with Giant Vesicles

Marcia P. dos Santos Cabrera,^{*,†,‡} Dayane S. Alvares,[†] Natalia B. Leite,[†] Bibiana Monson de Souza,[‡] Mario S. Palma,[‡] Karin A. Riske,[§] and João Ruggiero Neto[†]

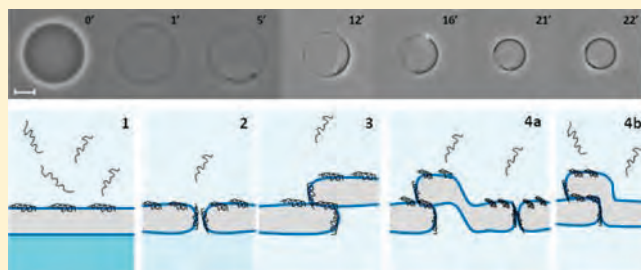
[†]UNESP – São Paulo State University, IBILCE, Department of Physics, R. Cristóvão Colombo, 2265 CEP 15054-000, São José do Rio Preto SP, Brazil

[‡]UNESP – São Paulo State University, Center of Studies of Social Insects, Institute of Biosciences, Av. 24-A, 1515 CEP 13506-900, Rio Claro SP, Brazil

[§]UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica, R. Pedro de Toledo, 669 9º andar CEP 04039-32, São Paulo SP, Brazil

S Supporting Information

ABSTRACT: Antimicrobial peptides of the mastoparans family exert their bactericidal activity by binding to lipid membranes, inducing pores or defects and leaking the internal contents of vesicles and cells. However, this does not seem to be the only mechanism at play, and they might be important in the search for improved peptides with lower undesirable side effects. This work deals with three mastoparan peptides, Polybia-MP-1 (MP-1), N2-Polybia-MP-1 (N-MP-1), and Mastoparan X (MPX), which exhibit high sequence homology. They all have three lysine residues and amidated C termini, but because of the presence of two, one, and no aspartic acid residues, respectively, they have +2, +3, and +4 net charges at physiological pH. Here we focus on the effects of these mastoparan peptides on anionic model membranes made of palmitoleoylphosphatidylcholine (POPC) and palmitoleoylphosphatidylglycerol (POPG) at 1:1 and 3:1 molar ratios in the presence and in the absence of saline buffer. Zeta potential experiments were carried out to measure the extent of the peptides' binding and accumulation at the vesicle surface, and CD spectra were acquired to quantify the helical structuring of the peptides upon binding. Giant unilamellar vesicles were observed under phase contrast and fluorescence microscopy. We found that the three peptides induced the leakage of GUVs at a gradual rate with many characteristics of the graded mode. This process was faster in the absence of saline buffer. Additionally, we observed that the peptides induced the formation of dense regions of phospholipids and peptides on the GUV surface. This phenomenon was easily observable for the more charged peptides (MPX > N-MP-1 > MP-1) and in the absence of added salt. Our data suggest that these mastoparans accumulate on the bilayer surface and induce a transient interruption to its barrier properties, leaking the vesicle contents. Next, the bilayer recovers its continuity, but this happens in an inhomogeneous way, forming a kind of ply with peptides sandwiched between two juxtaposed membranes. Eventually, a peptide–lipid aggregate forming a lump is formed at high peptide-to-lipid ratios.



INTRODUCTION

Among wasp venom constituents, antimicrobial peptides have been systematically found, many of them belonging to the class of mastoparans named after their characteristic mast cell degranulation activity. They are tetradecapeptides with cationic character, amidated C termini, and variable hydrophobicity but are generally hydro soluble and assume amphipathic helical structures when interacting with lipid bilayers or in anisotropic environments.^{1–6} Because one of their main targets seems to be the phospholipid matrix of the membranes, studies have initially focused on peptides' conformational changes, insertion, and lytic activity in model bilayers as a means to understand the mechanism of action of mastoparans. Preferential interaction with anionic phospholipid membranes is typical of many of them,^{7–10} and this behavior observed with other antimicrobial peptides

resulted, in some cases, in charge segregation or lateral lipid separation into coexisting domains.¹¹ To exert its functions, the cell membrane laterally segregates constituents, and there is evidence of the presence of lipid domains in bacterial membranes with functional character.¹² Thus, interfering with the pattern of lipids or other constituents' distributions on the cell membrane will lead to defects that challenge its barrier properties and compromise processes dependent on its structure that would be a means to develop new drug agents that are less prone to the development of resistance mechanisms.

Received: March 22, 2011

Revised: July 26, 2011

Published: July 28, 2011

Polybia-MP-1	Ile-Asp-Trp-Lys-Lys-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH ₂
N2-Polybia-MP-1	Ile-Asn-Trp-Lys-Lys-Leu-Leu-Asp-Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu-NH ₂
Mastoparan X	Ile-Asn-Trp-Lys-Gly-Ile-Ala-Ala-Met-Ala-Lys-Lys-Leu-Leu-NH ₂

Figure 1. Sequences of peptides studied, showing polar and charged residues in gray.

Several models for the mechanism of action of antimicrobial peptides have been proposed that do not necessarily exclude each other and have been revised and discussed.^{11–14} Initially, two opposing models were proposed, the barrel stave¹⁵ and the toroidal pore,^{16,17} that were opposed in the sense that the former suggests that the bilayer continuity is interrupted by peptides' assembly in the structure of the pore and the latter suggesting that lipids and inserted peptides together constitute the pores. Both models were recently determined as not being static structures.^{18–21} In parallel, other models such as the carpet model^{22,23} and the detergent-like model²⁴ were presented, with the latter being considered to be a generalization described by phase diagrams in which the others appear as particular situations.¹¹ More recently, the interfacial model was proposed as a physicochemical basis for both the carpet and the detergent-like models²⁵ in which peptides with imperfect segregation of polar and nonpolar residues induce pores or defects by disturbing the packing of the hydrocarbon core of the bilayer because of their ability to partition into its interfacial region.¹³ Other important aspects of the mechanism of the lytic activity were gradually revealed, for instance, those related to the concentration dependence,^{7,26,27} pore lifetime,²⁸ membrane thinning effects,²⁹ and graded or all-or-none content release.¹⁴ At the same time, other aspects of the problem have been revealed: (a) the translocation of TAT peptides involving strong electrostatic interactions of the positively charged residues and the phosphate groups on both sides of the lipid bilayer forming a transient pore;²¹ (b) the charge cluster mechanism by which a high local density of positive charges of the peptides induces the segregation of anionic lipids that could cluster out of the zwitterionic, forming defects.³⁰ In this sense, the molecular shape of peptides acting as wedge-like structures and intercalating in the membrane interface would create voids and impose curvature strain.^{11,31} Nevertheless, more than one mechanism of action has been demonstrated to occur for several peptides, depending on environmental conditions.^{17,32,33}

Recently, Leite et al.,³⁴ searching for charge effects, showed that Asp residues and the hydrophobic/hydrophilic balance in peptides modulate the lytic activity and the biological properties of some mastoparans peptides. In the present study, we focused on the mechanism of action of three mastoparans peptides, Polybia-MP-1 (MP-1) extracted from *Polybia paulista*, its synthetic analogue N2-Polybia-MP-1 (N-MP-1) where the aspartic acid residue at position 2 was substituted by asparagine, and mastoparans X from *V. xanthoptera* (MPX), respectively presenting two, one, and no Asp residues (Figure 1), to investigate charge effects. These peptides have already been shown to form pores or defects on phospholipid bilayers with the leakage of fluorescent probes.^{7,9,34} MPX is an example of a short-chain peptide whose chain length does not span the bilayer thickness to which the toroidal-type pore model has been attributed,¹⁶ on

the basis of fluorescence spectroscopy determinations of lipid flip-flop coupled with pore formation; lately, the graded kinetic mode of its leakage activity has been demonstrated.^{14,35} The onset of the lytic process of the three peptides requires their accumulation at the membrane surface in a highly cooperative processes.^{7,9,34} The electrostatic balance of multicharged peptide accumulation demands the approximation of anionic lipids, which will be sorted from the otherwise homogeneous distribution; this effect might lead to lipid clustering and has already been shown to play a role in the action of antimicrobial peptides.³⁰

The antimicrobial activity of cationic peptides is attributed to their interactions with membrane phospholipids,^{12,30} and prokaryotic membranes have different contents of anionic phospholipids ranging from around 15 to almost 100%.³⁶ To study the effects of the electrostatic interactions at play in the lytic activity of mastoparans, a model system was chosen in which variations of the ionic strength of the environment (absence of salts or the physiological salt level), of the net charges of peptides (+2, +3, and +4), and of the anionic character of vesicles were investigated. As representatives of prokaryotic membranes, anionic phospholipid vesicles made of 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphorac-(1-glycerol)] (POPG) at 1:1 and 3:1 molar ratios were prepared. Actually, we found evidence that some kind of clustering or aggregation of lipids occurs to different extents under the influence of the net charge and the presence of acidic residues in the peptide chain. With zeta potential experiments, peptide accumulation on the vesicle surface was confirmed, and we visualized through phase-contrast optical microscopy, with and without the help of a fluorescent probe, the formation of inhomogeneous regions of lipids caused by the binding of peptides, which suggests that the aggregation of lipids is influenced by the peptides' net charge.

■ MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) supplied phospholipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphorac-(1-glycerol)] (POPG), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (NBD-PE), used as supplied. Lipid stock solutions of POPC and POPG in a 1:1 molar ratio (possibly containing 0.5 mol % of anionic fluorescent probe NBD-PE) were prepared in chloroform. These solutions were used in the formation of films in round-bottomed test tubes to obtain small, large, and giant (spontaneous) unilamellar vesicles (SUVs, LUVs, and GUVs, respectively) at a concentration of around 10 mg/mL or directly spread (2 mg/mL concentration) on the surfaces of two conductive glass slides (coated with fluorine tin oxide) for giant unilamellar vesicle preparation by electroformation. In all cases, lipidic films were evaporated under nitrogen flux and further dried under vacuum for 3 h to remove solvent

traces. The buffers used were Tris/H₃BO₃ 5 mM, 1 mM Na₂EDTA, and 150 mM NaF at pH 7.5 for circular dichroism (CD) experiments and Tris/HCl 10 mM, 1 mM Na₂EDTA, and 150 mM NaCl at pH 7.5 for zeta potential measurements and for observation of GUVs. Other chemicals were high-quality analytical or spectroscopic grade.

Peptide Synthesis, Purification, and Mass Spectrometry Analyses. Peptides were synthesized, as described by Souza et al.,³⁷ by stepwise manual solid-phase synthesis using the N-9 fluorophenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. The crude product was purified by reverse-phase HPLC, and the homogeneity and sequence were accessed by analytical HPLC and mass spectrometry (ESI-MS). Samples were analyzed on a triple quadrupole mass spectrometer, model QUATTRO II, equipped with a standard electrospray (ESI) probe (Micromass, Altrincham), adjusted to ca. 250 μ L/min. The source temperature was maintained at 80 °C, and the needle voltage was maintained at 3.6 kV by applying a drying gas flow (nitrogen) of 200 L/h and a nebulizer gas flow of 20 L/h. The mass spectrometer was calibrated with intact horse heart myoglobin and its typical cone-voltage-induced fragments. The molecular mass was determined by ESI-MS by adjusting the mass spectrometer to give a peak width at half-height of 1 mass unit, and the cone sample to skimmer lens voltage, controlling the ion transfer to mass analyzer, was set to 38 V. About 50 pmol (10 μ L) of each sample was injected into electrospray transport solvent. The ESI spectra were obtained in multichannel acquisition mode; the mass spectrometer data acquisition and treatment system was equipped with MassLynx (Micromass) software for handling spectra.

Around 100 μ M peptide stock solutions were prepared in quartz bidistilled water and kept under refrigeration; the final concentration was checked spectrophotometrically at 280 nm, using the tryptophan molar absorptivity of 5580 M⁻¹ cm⁻¹.

Vesicle Preparation. SUVs and LUVs, respectively, for CD and zeta potential experiments were prepared by the hydration of phospholipid films with fresh, doubly distilled water or Tris buffer with added salt at room temperature to give around a 10 mM lipid concentration. To prepare SUVs, hydration was followed by 50 min of sonication with a tip sonicator, centrifugation to remove Ti debris, and then 11 extrusions through 50 nm pore size polycarbonate membranes (Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman), using an Avanti mini-extruder. To obtain LUVs, after the hydration of the lipid film, the suspension was extruded 6 times through 400 nm polycarbonate membranes and then 11 times through 100 nm membranes in the same apparatus. SUVs and LUVs that had been refrigerated and protected from light were used the same day of preparation. The vesicle size was confirmed by dynamic light scattering (DLS) with a Nano Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), with an SUV average diameter of 80 nm and an LUV average diameter of 125 to 130 nm.

Circular Dichroism Measurements. To evaluate conformational changes in the peptides induced by the presence of vesicles made of POPC/POPG 1:1, in the presence and absence of salts, SUVs were prepared in water or in saline buffer. CD spectra were obtained at 20 μ M peptide concentration in water, in Tris/H₃BO₃ buffer, and in the presence of both types of SUVs at several increasing concentrations until saturation at around 300 μ M phospholipid occurred. Buffer, peptide, and lipid concentrations have been chosen to minimize the noise-to-signal ratio and light scattering. CD spectra were recorded from 260 to 205 or to 190 nm with a Jasco-710 spectropolarimeter (Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan), which was routinely calibrated at 209 nm using D-pantolactone solution.³⁸ Spectra have been acquired at 25 °C using a 0.5 cm path length cell and averaged over eight scans at a scan speed of 20 nm/min and a bandwidth of 1.0 nm, using a 0.5 s response and 0.1 nm resolution. Following baseline correction, the observed ellipticity, θ (mdeg), was converted to the mean residue ellipticity [Θ] (deg cm²/dmol) using the relationship [Θ] = 100 θ /(lc), where l is the path length in centimeters, c is the peptide

milimolar concentration, and n is the number of peptide bonds. Assuming a two-state model, the observed mean residue ellipticity at 222 nm ($\Theta^{\text{obs}}_{222}$) was converted to the α -helix fraction (f_H) using the method proposed by Rohl and Baldwin³⁹ and previously described.⁴⁰

Dynamic Light Scattering (DLS) for Size Evaluation and the Determination of the Zeta Potential (ζ). The binding of the peptides to LUVs was assessed through isotherms of the zeta potential. With a Nano Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), which uses wide-angle (90°) laser Doppler velocimetry to measure the electrophoretic mobility, we found the zeta potential to be $\zeta = \eta\mu/\epsilon$, where η is the viscosity of the solvent, μ is the electrophoretic mobility, and ϵ is its dielectric constant. This equation, the Smoluchowski approximation, is valid in saline buffer ($\kappa a \gg 1$). In water, where $\kappa a \ll 1$, this equation is multiplied by 1.5, which corresponds to the Huckel approximation. Aliquots of water or a buffer-based vesicle suspension to achieve a 30 μ M final concentration were added to the appropriate amount of peptide stock solution in water or in Tris/HCl buffer at pH 7.5 in a polystyrene tube. To minimize measurements fluctuations, each peptide-vesicle suspension was equilibrated for 30 min at 25 °C before measurement and then transferred to special disposable cuvettes (DTS1060 cells), which are equipped with golden electrodes (Malvern Instruments). Aliquots of the vesicle suspension in the absence and presence of peptides at a concentration near that of the potential reversal were also transferred to disposable cuvettes for size measurements.

GUV Preparation. Two different procedures were required, electroformation and spontaneous formation, because in the former the presence of a high ionic strength hinders the formation of GUVs whereas in the latter GUVs can be grown under physiological salt conditions.

GUV Preparation by Electroformation (Ionic Strength, $I = 0$). The conductive sides of two slides covered with the phospholipid film were placed facing each other and separated by a Teflon frame 2 mm thick, forming a chamber. The hydration of the film was done by filling this chamber with 0.2 M sucrose solution. On the glass slides, an alternating current of 1 V at a 10 Hz frequency was applied for 1 h.⁴¹ The vesicle suspension was formed and transferred to a polystyrene tube, which was refrigerated and used the same day.

GUV Preparation by Spontaneous Formation ($I = 150$ mM NaCl). A phospholipid film prepared in a test tube was prehydrated for 20 min at 45 °C with N₂-saturated water. The tube was sealed and kept at 37 °C for at least 12 h; then 3 mL of Tris/HCl buffer containing 0.2 M sucrose was added, and the tube was resealed and left at 37 °C for another 12 h period. GUVs appearing as a cloud suspended in the solution were harvested into a polystyrene tube and refrigerated.⁴²

Observation of GUVs (from Both Preparation Methods). An aliquot of the vesicle solution was diluted 7-fold into a 0.2 M glucose solution, introduced in a 150 μ L observation chamber that was constructed from a common microscope slide, a coverslip, and a 2-mm-thick Teflon spacer, and left to settle down before observation. The differences in density and refractive index between sucrose inside and glucose outside the vesicles provided a better contrast for observation under the phase contrast microscope (Zeiss Axiovert 200, Jena, Germany and Olympus IX71, Tokyo, Japan, both equipped with CCD cameras) and stabilized GUVs by gravity. To avoid osmotic pressure effects, the osmolarities of the sucrose and glucose solutions were checked with an osmometer (Osmette A 5002, Precision Systems, Inc., USA) and carefully matched. Peptide solutions (MP-1, N-MP-1, and MPX) prepared in 0.2 M glucose were added to the observation chamber in two different ways: (a) with the help of a glass micropipet of about 15 μ m diameter prepared using a PC-10 vertical puller from Narishige (Tokyo, Japan) and (b) with a conventional micropipet in which case the peptide final concentration was 10 μ M, unless otherwise stated. Vesicles were observed under 63 \times or 40 \times phase contrast objectives or in fluorescence mode (U-LH100 Hg lamp and 460–490 nm excitation filter).

Effects of Different Peptide Concentrations on GUVs. A constant aliquot of a POPC/POPG 3:1 GUV suspension was added, without stirring, to complete the volume of the observation chamber, which already contained different concentrations of peptide solutions in 0.2 M glucose. Images started to be recorded immediately, and representative vesicles were focused and followed.

RESULTS

Circular Dichroism (CD). The secondary structure of the peptides in this study was previously evaluated in the presence of vesicles prepared in buffer that contained near physiological concentrations of salts.^{7,34,43} To test the role played by ionic strength, two different aqueous media were used: pure water and Tris buffer containing 150 mM NaF. To evaluate the secondary structure of the peptides and their binding to anionic bilayers, spectra of all of the peptides were acquired in the absence and presence of POPC/POPG 1:1 SUVs prepared in both aqueous media. CD spectra of the peptides in water or in buffer were shown to be characteristic of a disordered conformation (Figure 2). The presence of anionic vesicles was found to induce

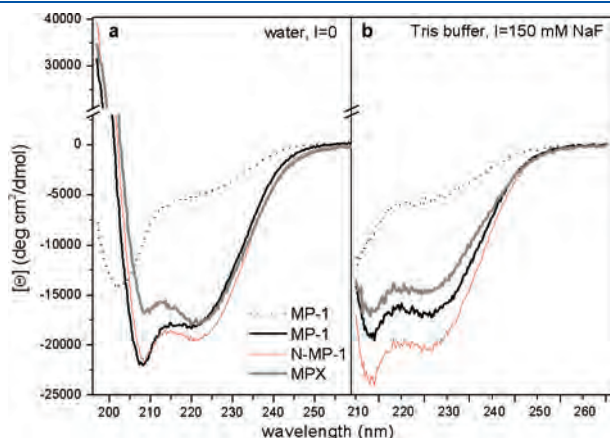


Figure 2. CD spectra of 20 μM peptides at 25 $^{\circ}\text{C}$ in the absence (\cdots) and presence ($—$) of POPC/POPG 1:1 SUVs (a) in water (MP-1 as an example, \cdots) and the three peptides in water-based SUVs at 300 μM and (b) in Tris–saline buffer (MP-1 as an example, \cdots) and Tris–saline-buffer-based SUVs at 300 μM . Spectra obtained at lower SUV concentrations are not shown. No smoothing has been applied.

a helical conformation in all peptides and this has been confirmed for vesicles made of POPC/POPG 1:1 prepared in either a water- or Tris buffer-based solution. Moreover, the peptides' molar ellipticity at 222 nm ($[\Theta_{222}]$) increases with phospholipid concentration until 300 μM (Table 1a). The main differences due to the presence of the saline buffer are (1) MPX spectra are indicative of aggregation in water ($[\Theta_{222}] > [\Theta_{208}]$) but not in buffer⁴⁴ whereas spectra of peptides with acidic residues suggest that they are in the monomeric form ($[\Theta_{222}] < [\Theta_{208}]$) and (2) a significant decrease in the helical content of MPX. These observations reveal that the presence of saline buffer promotes the electrostatic shielding of interactions among basic residues in MPX with negatively charged phospholipids, lowering its helical content. However, Asp residues in MP-1' and in N-MP-1 may be involved in stabilizing the helical conformation by intrachain hydrogen bonds with Lys residues.³⁴

Zeta Potential (ζ). Zeta potential measurements were carried out to evaluate the accumulation of peptides on the vesicle surfaces. The zeta potential values of LUVs, obtained at $I = 0$ or $I = 150$ mM NaCl, were determined in the absence and in the presence of the peptides at several concentrations. These data show that the binding and accumulation of peptides at the POPC/POPG 1:1 vesicle surface is strongly influenced by the presence of saline Tris buffer (Figure 3). Values of the zeta potential for these vesicles, in the absence of peptides, at $I = 0$ was -105 ± 7 mV, and in Tris buffer containing 150 mM NaCl, where the Debye screening length is ~ 7 Å, it was -32 ± 2 mV. This difference is due to the electrostatic screening and to the approximations used to calculate the zeta potential in water and saline buffer, where $\kappa a = 0$ and 82, respectively, for vesicles in the absence of peptides. In buffer, at the potential reversal, κa is ~ 360 and 1400 for N-MP1 and MPX, respectively. If the counterion concentration in water due to the phosphates in the outer leaflet is considered, then κa is ~ 0.6 . In water, zeta potential curves of the three peptides are approximately parallel to each other in descending order of the peptides' net charge (Figure 3a). The peptide concentration at which the potential reversal occurred also follows their respective descending net charge order, which was not the case in the presence of salts (Table 1b). The use of the potential reversal to compare the peptides' affinities to the vesicles has some drawbacks because near the charge reversal the experimental error is greater than the respective values of the zeta potential or the electrophoretic mobility. Notwithstanding this drawback, the discrepancy in the order of the peptides to achieve charge reversal, as observed in

Table 1. Influence of the Presence of Salt at the Physiological Level on the Conformational Parameters^a and on the Potential Reversal and Vesicles Size Variation Due to the Presence of Peptides near the Potential Reversal Concentration ($[\text{pep}]_{\zeta=0}$)^b

	(a) molar ellipticity and α -helix fraction in the presence of POPC/POPG 1:1 vesicles						(b) $[\text{pep}]_{\zeta=0}$							
	water			buffer			μM		LUV size as a function of peptide concentration (nm)					
	$[\Theta_{222}]_w$	$[\Theta_{222}]_{wv}$	f_H	$[\Theta_{222}]_b$	$[\Theta_{222}]_{bv}$	f_H	H ₂ O	buffer	$[\text{pep}] = 0$	$[\text{pep}]_{\zeta=0}$	$[\text{pep}] = 0$	$[\text{pep}]_{\zeta=0}$		
MP-1	-5545	-17 850	0.58	-5047	-16 809	0.55	MP-1	10.3	24.0	131	486	126	n.d.	
NMP1	-5207	-19 350	0.63	-3712	-20 115	0.66	NMP1	7.2	7.7	130	620	127	224	
MPX	-3229	-17 640	0.58	-2504	-14 448	0.47	MPX	5.0	9.0	130	787	127	862	

^a Molar ellipticity at 222 nm in water, ($[\Theta_{222}]_w$), molar ellipticity at 222 nm in the presence of POPC/POPG 1:1 vesicles, ($[\Theta_{222}]_{wv}$), α -helix fraction in the presence the vesicles (f_H), molar ellipticity at 222 nm in buffer, ($[\Theta_{222}]_b$), and molar ellipticity at 222 nm in the presence of vesicles ($[\Theta_{222}]_{bv}$). Peptides in water or in buffer media present spectral characteristic of a random coil, and their f_H values were not calculated. ^b Peptide concentration at potential reversal ($[\text{pep}]_{\zeta=0}$). nd = not determined. (See the text.)

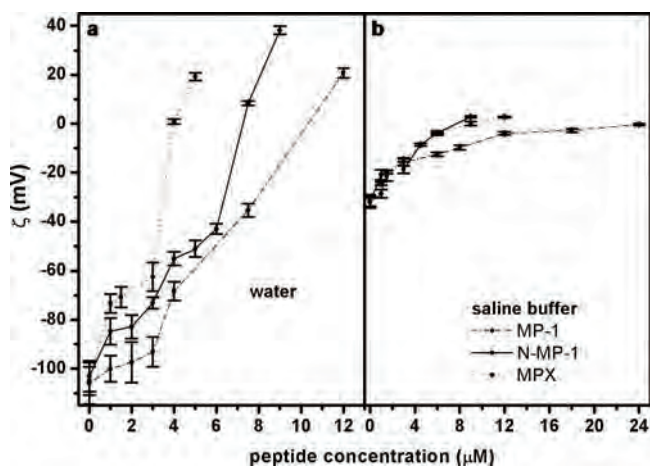


Figure 3. Zeta potential measurements of 30 μM POPC/POPG 1:1 LUVs in (a) water-based and (b) Tris-saline-buffer-based solutions obtained at increasing peptide concentrations. The measurements were made after 30 min of contact at 25 $^{\circ}\text{C}$. The zeta potential of LUVs in the absence of peptides (ζ_0) was -105 ± 7 mV in water and -32 ± 2 mV in saline buffer.

buffer, cannot uniquely be accounted for by the experimental error in the zeta potential near vesicle neutralization. An increase in the particle size was observed, which could be due to vesicle aggregation that makes the comparison between peptides difficult, especially because of the great increase in the vesicle size induced by MPX, whereas for N-MP1 only a modest increase was observed. Nevertheless, in water, the effects of the peptides on the vesicle sizes follow their net charge order.

The zeta potential curves obtained for POPC/POPG 1:1 vesicles prepared in water show that the accumulation process for the three peptides holds some similarity: there is a gradual potential increase of up to 4.0 μM peptide followed by a steep increase in the potential at higher peptide concentrations, leading to a potential reversal. However, in Tris saline buffer, the curves show that a gradual accumulation of peptides at the membrane surface and a potential reversal, though to a much lesser extent than in water, are achieved only with MPX and N-MP1. Interestingly, N-MP1 was the least affected by the presence of saline buffer (Table 1b). We also observed that at the concentration at which the potential reversal occurs the vesicle size increased considerably (Table 1b). For N-MP1 and MPX in water, we observed that the size distribution histograms changed from one peak, in the absence of peptides, to two peaks. The size values shown in Table 1, in these cases, are averaged values. In the particular case of MP-1, in saline buffer, the concentration for potential reversal was hardly achieved, and under this condition, the LUV suspension did not present the necessary count rate to allow its size measurement. The observed LUVs' size increase could be attributed, in part, to the adsorption of the peptides and also to the vesicles' fusion, hemifusion, or aggregation, although with other peptides these modifications were observed at a lower peptide to lipid ratio (P/L).^{45,46} Wimley¹³ has also pointed out the occurrence of artifacts at high P/L ratios, as is the case in this experiment.

Observation of POPC/POPG 1:1 GUVs. The interaction of MP-1, N-MP-1, and MPX with giant unilamellar vesicles containing anionic lipids was followed with phase contrast and fluorescence microscopy. The lytic mechanism of the peptides was

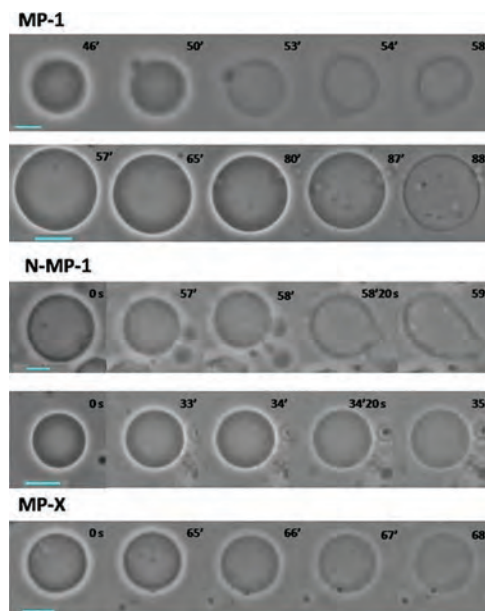


Figure 4. Phase contrast snapshots of GUVs (obtained by spontaneous formation) made from a POPC/POPG 1:1 molar ratio in the presence of saline buffer ($I = 150$ mM NaCl) at room temperature. The vesicles initially contained a sugar asymmetry (0.2 M sucrose inside and 0.2 M glucose outside), which enhances the optical contrast of the GUVs. Each time sequence shows the lytic effects caused by MP-1, N-MP1, and MPX on the GUVs. The peptide was introduced into the observation chamber with a conventional micropipet, so the final peptide concentration would be 10 μM at the end. The time indicated on the top of each snapshot indicates the start of the injection process. The scale bars correspond to 20 μm .

investigated in water and at physiological ionic strength. The GUVs initially contained a high optical contrast because of the sucrose/glucose refractive index asymmetry across the bilayer. The addition of all peptides induced the loss of optical contrast of most of the GUVs, with the preservation of the overall vesicular structure, and occasionally some vesicles burst (Supporting Information). The increased bilayer permeability suggests the opening of pores/defects in the bilayer. This overall trend was observed for at least 25 GUVs for each condition. Some examples are shown in Figures 4 (high ionic strength) and 5 (water).

At high ionic strength, when the electrostatic interaction is attenuated, the contrast loss happens after at least 30 min but more frequently around 60 min, as shown in Figure 4. However, Figure 5 shows that the contrast loss in water is accomplished within seconds to a few minutes. Under both conditions, the gradual loss of optical contrast parallels some volume shrinkage (Figure 4, MP-1 and Figure 5, N-MP-1 and MPX), but only with MP-1 and N-MP-1 were morphological changes due to change in the volume-to-area ratio observed. At high ionic strength, the bilayer structure is preserved, even after long contact times (above 60 min) with the three peptides.

After the contrast loss, the peptides induced the formation of dense regions on the membrane surface, indicating a local accumulation of lipids. The formation of these dense regions was more abundant the higher the net charge of the peptide. The last snapshots of Figure 5 (MPX) show the formation of such regions at the expenses of the normal bilayer and that the vesicle size decreases as the dense region spreads over the surface of the vesicle. This suggests that these dense regions could originate

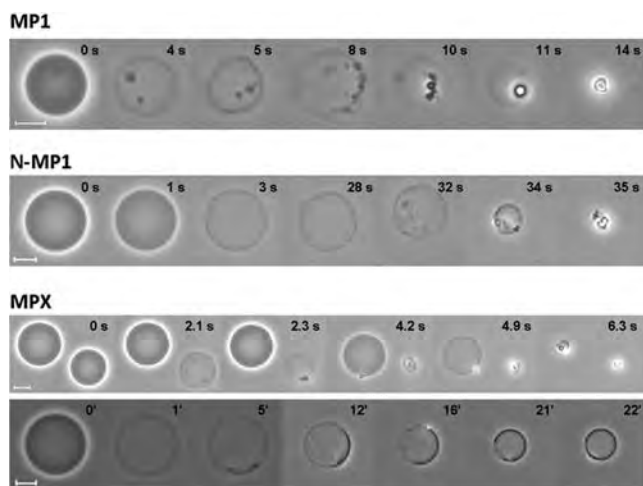


Figure 5. Phase contrast snapshots of GUVs (grown by electroformation) made from a POPC/POPG 1:1 molar ratio in water ($I = 0$) at room temperature. The vesicles initially contained a sugar asymmetry (0.2 M sucrose inside and 0.2 M glucose outside), which enhances the optical contrast of the GUVs. Each time sequence shows the lytic effects caused by MP-1, N-MP1, and MPX on the GUVs. A solution of peptide ($50 \mu\text{M}$) was injected close ($\sim 50 \mu\text{m}$ away from the right-hand side) to the GUVs with the help of a glass micropipet and a micromanipulator, except for the last sequence, which was obtained as described in Figure 4. The time indicated on top of each snapshot indicates the start of the injection process. The scale bars correspond to $10 \mu\text{m}$.

from membrane folding/wrinkling mediated by the peptides. At the end of the process, an undefined peptide–lipid aggregate is left. Interestingly, the CD spectra of MPX in the absence of saline buffer is compatible with some kind of peptide aggregation that is not seen in the presence of buffer. Apparently, the screening of the repulsive electrostatic interactions among peptide monomers provided by the saline buffer avoided this aggregation, whereas the opposite should be expected. Also, it could be speculated that the formation of these dense regions could happen after a very long incubation time.

To understand the nature of the enhanced contrast regions and their possible implication in the lytic mechanism of the peptides, experiments with fluorescence microscopy were carried out. An anionic bilayer probe, NBD-PE, was included in the phospholipid mixture. It was then observed, for the three peptides, that the dense regions were also highly fluorescent (Figure 6). This could indicate that the dense regions are enriched in anionic lipids, although it is not possible to test this hypothesis at the moment. In that case, it would be reasonable to assume an accumulation of cationic peptides on the fluorescent regions. The increasing amount, size, and fastness of cluster formation seem to be related to the peptides' increasing net charge.

Observation of POPC/POPG 3:1 GUVs. To evaluate the effect of different anionic lipid content in the GUVs, two other compositions were prepared, POPC/POPG 3:1 and 1:3. In the latter case, vesicles showed a significant number of defects and “edgy” shapes, which did not allow us to conduct a comprehensive set of experiments (data not shown). The results obtained with POPC/POPG 3:1 GUVs were very similar to those presented above with POPC/POPG 1:1, namely, an increase in membrane permeability with the preservation of the overall vesicle structure and the later formation of domainlike regions

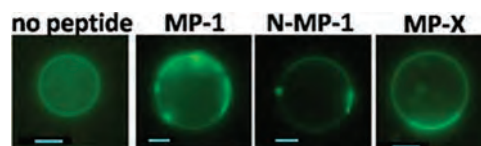


Figure 6. Fluorescence microscopy images of GUVs (grown by electroformation) made from a POPC/POPG 1:1 molar ratio with 0.5 mol % NBD-PE in water at room temperature. The first snapshot shows one vesicle in the absence of peptide, as an example of the fluorescent probe distribution. The others were obtained after the addition of the peptides as described in Figure 4. Size differences should not be considered in this case. The fading of fluorescent images is due to probe photobleaching. The scale bars correspond to $10 \mu\text{m}$.

at the expenses of vesicle size. Vesicle bursting was seen occasionally, more often at higher peptide concentrations. In this set of experiments with POPC/POPG 3:1, the peptide concentration was systematically varied. Representative examples of GUVs after incubation with the three peptides (0.1 – $1.0 \mu\text{M}$) are illustrated in Figure 7a. The addition of $0.1 \mu\text{M}$ MP-1 and $0.25 \mu\text{M}$ MPX had no effect on the GUVs, as can be seen in the first snapshots of Figure 7a. In the case of N-MP1, although most vesicles were preserved after incubation for 15 min with $0.1 \mu\text{M}$ N-MP1, some GUVs became permeable and lost their optical contrast after ~ 10 min (first line of Figure 7b). At higher concentrations of peptides, all GUVs lost their optical contrast eventually, with kinetics that was dependent on the concentration of peptide (Figure 7b). A comparison of the minimum peptide concentration inducing almost immediate contrast loss shows that peptide N-MP1 had the highest activity ($0.5 \mu\text{M}$), followed by MP1 ($1 \mu\text{M}$) and MPX ($2.5 \mu\text{M}$). After contrast loss, many GUVs showed a decrease in volume, as seen by the appearance of floppy vesicles, until dense domainlike structures appeared on the vesicle surface. (See the sequence shown for $0.25 \mu\text{M}$ N-MP1 in Figure 7b.) Again, these structures were often seen in GUVs in the presence of N-MP1 and MPX and were rarely induced by MP1.

DISCUSSION

The peptides in the present study have homologous sequences but different net charges (Figure 1). They assume similar helical conformations in the presence of POPC/POPG 1:1 vesicles but show disordered structures either in water or in saline buffer (Figure 2). MPX was shown in NMR studies^{47,48} to form amphipathic helices in membranelike environments, and MP-1 and N-MP-1 are presumed to assume amphipathic conformations from molecular dynamics simulations in trifluoroethanol/water mixtures.^{7,49}

Additional similarities include the accumulation of peptides at the membrane surface as shown in the zeta potential curves, which indicate that cationic peptides neutralize the vesicle charge without presenting considerable differences among them, except for the concentration at which the potential reversal occurs (Table 1b).

Our observations with optical microscopy indicate that the three peptides increase the bilayer permeability, inducing pores or defects (either transient or stable) in membranes of different anionic content, as denoted by the different rates of phase contrast decrease. Furthermore, denser regions form later at the expense of the normal bilayer, forming a cluster that is probably made of lipids and peptides. We propose that a gradual

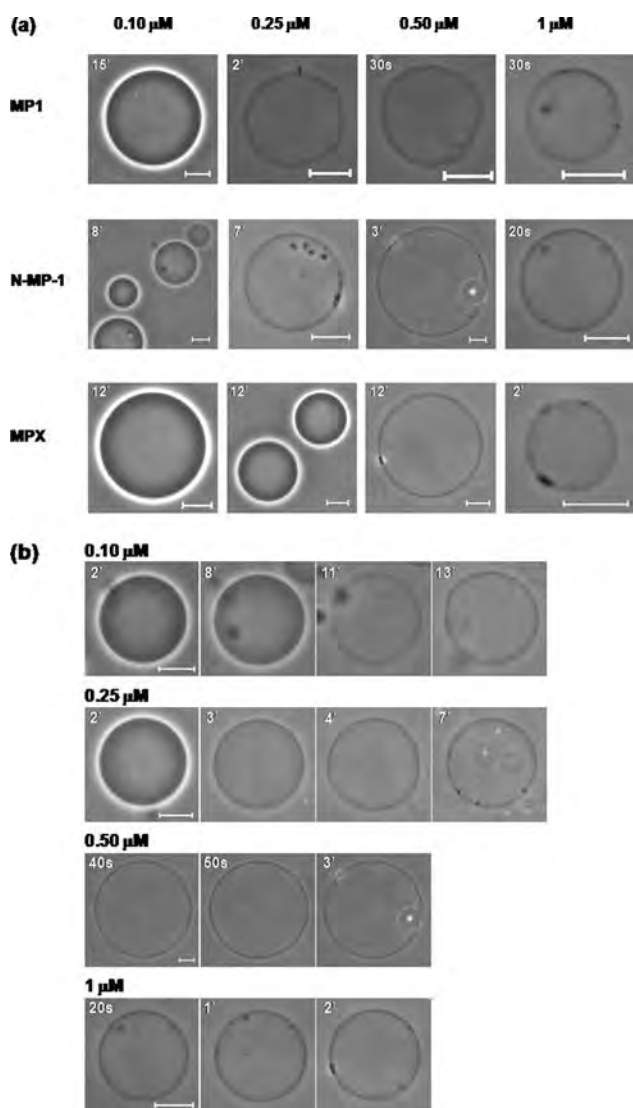


Figure 7. Phase contrast snapshots of GUVs (grown by electroformation) made from a POPC/POPG 3:1 molar ratio in water ($I = 0$) at room temperature. The vesicles initially contained a sugar asymmetry (0.2 M sucrose inside and 0.2 M glucose outside), which enhances the optical contrast of the GUVs. A fixed aliquot of a GUV suspension was added to the bottom of the observation chamber that already contained the peptide solution (0.1–1.0 μM). The time indicated at the top of each snapshot indicates the contact time of vesicles with the peptide solution. (a) Each snapshot shows the lytic effects caused on the GUVs by different incubation times at different concentrations of MP-1, N-MP-1, and MPX. (b) Time sequence of the GUVs illustrating the kinetics of the interaction of N-MP-1 at increasing concentrations. Although some GUVs lost their contrast in the presence of 0.1 μM N-MP-1, as shown in the first line, most GUVs remained intact even after 15 min of incubation (not shown). The scale bars correspond to 10 μm .

mechanism of leakage is predominately characteristic of MP-1, N-MP-1, and MPX in opposition to the quick sudden burst of vesicles, as found with the peptide gomesin.⁵⁰ In the presence of saline buffer, our results are in good agreement with Almeida and Pokorný's;¹⁴ they found, through a quantitative analysis of peptide binding and dye release, that MPX and mastoparans are involved in the graded mechanism.

In this work, the peptide/lipid ratio ranged from as low as 0.06 in the CD experiments to 1.0 in GUV observations, with most of the zeta potential determinations in between. Considering the significant bilayer restructuring observed with GUVs at all peptide/lipid ratios, we suggest that the aggregation signs shown by the CD spectra of MPX in SUVs and the LUV size increase found in the DLS experiments could reflect the same formation of domains: the larger curvature strength in SUVs and LUVs would not allow the formation of a membrane ply as observed in GUVs, but the requirement of peptide charge neutralization at the vesicle surface would induce the contact with nearby vesicles, holding peptide molecules sandwiched between them.

The mechanism of gradual leakage from GUVs seems to be characteristic of the three peptides, which are well correlated to their short chain length, shorter than the bilayer thickness, and the formation of predominantly transient pores or defects in the lipid bilayer. After this step, peptides cause somewhat different changes in GUVs, which can be observed depending on the peptide concentration reaching the vesicle surface: MPX forms abundant and easily observable clusters, whereas there are less with N-MP-1 and only a few with MP-1. These clusters were easily observed with the help of the fluorescent probe and could indicate the formation of regions where anionic phospholipids might be segregated (Figure 6) because of the preferential binding of these cationic peptides to anionic bilayers as demonstrated in experiments of dye leakage and circular dichroism.^{34,7} Eventually, most GUVs disrupt and only an aggregate of lipids and peptides are left.

Several mechanisms of antimicrobial peptide action have been described that aim at comprehensible guidance with respect to the development of more efficient therapeutic agents. Most of the proposed models do not exclude each other and can be viewed as complementary or even having a greater importance for some peptide families than for others. Clusters of lipid II induced by the peptide nisin have been demonstrated and considered to be an alternative mechanism of bactericidal activity.³² Zhao et al. also showed the formation of macroscopic aggregates on the GUV surface and interior induced by the presence of temporins, a peptide with 13 residues in the sequence.⁵¹ The charge cluster mechanism, as named by Epan and co-workers,^{12,30} may be considered to be a contributing mechanism, and there are indications of its presence in the interaction of mastoparans peptides with model POPC/POPG 1:1 and 3:1 membranes. The visualization of clusters or regions where the bilayer could form a kind of ply occurs after considerable lytic activity has taken place. The observation of GUVs either in the presence or absence of saline buffer showed clusters in the interaction with the three mastoparans, although the distribution and the apparent size of these clusters are different according to the peptides' net charge. Thus, we could summarize the mechanism of interaction of MP-1, N-MP-1, and MPX with anionic lipid bilayers with the help of a cartoon (Figure 8). Initially random coil peptides in solution bind to anionic vesicles and assume helical structures, acting cooperatively^{7,9,34,51} (step 1). Then, pores or defects are formed, through which sucrose and glucose can permeate (step 2). Later on, clusters of phospholipids that could be enriched in anionics⁵¹ (Figure 6) and peptides are formed. These clusters seem to originate from membrane plies, with peptides sandwiched between juxtaposed membranes (step 3). The formation of these membrane plies mediated by the peptides would explain the decrease in vesicle size observed in a late stage (step 4). Eventually, a peptide–lipid

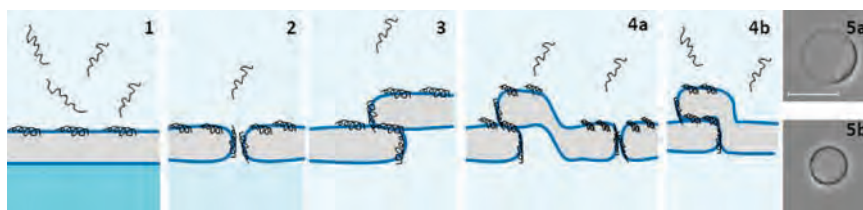


Figure 8. Mechanism of the lytic activity and domain formation. (1) Random coil peptides in solution bind to the vesicle surface, assume a helical conformation, and increase the bilayer surface tension. (2) After reaching a threshold concentration, peptides increase the bilayer permeability, inducing pores or defects as denoted by the gradual contrast loss, thus releasing the excess surface tension. (3) Because of the positive charges of bound peptides, anionic lipids are attracted and the membrane mends, as a consequence of pore/defect closing or nonclosing (4a, 4b) in different possible untidy ways, (4a) when bending over itself, forming something like a ply, or (4b) because of excess bound peptides, pulling the nearby membrane surface. The continuous process of peptide binding, breaking, and recovering the membrane at several locations on the same vesicle (5a) increases the bilayer thickness at the expense of (5b) reducing the vesicle size.

aggregate forming a lump is the only structure left at high peptide-to-lipid ratios. With this profile, we assume that the three mastoparan peptides act through equivalent mechanisms in anionic vesicles, whose steps clearly depend on the peptide concentration.

CONCLUSIONS

In this work, we studied the interaction of three homologous mastoparan peptides of different net charge with anionic membranes composed of POPC/POPG. Conformational changes induced by the presence of anionic vesicles were evaluated by circular dichroism on SUVs, the binding and accumulation of peptides on the vesicle surfaces by zeta potential measurements, and lytic activity by the optical microscopy of giant unilamellar vesicles. To test the role of ionic strength in the interaction of these cationic peptides with anionic membranes, experiments were carried out either in water or in the presence of saline buffer at physiological concentration.

Peptides MP-1, N-MP-1, and MPX assume similar helical conformations in the presence of SUVs while showing disordered structures either in water or in saline buffer, as determined in CD experiments. Zeta potential curves confirmed that the peptides accumulate at the membrane surfaces of large unilamellar vesicles and neutralize their charge without presenting considerable differences among them, except for the concentration at which the potential reversal occurs.

The experiments with GUVs, in either the presence or absence of saline buffer, showed that the three peptides increase the bilayer permeability, inducing pores or defects, mostly transient, in anionic membranes, as denoted by the different rates of phase contrast decrease through a predominant mechanism of gradual leakage. Later, denser regions form at the expense of the normal bilayer, originating a cluster, probably made of peptides and lipids, enriched with the anionic component. This phenomenon was easier to observe for the more charged peptides (MPX > N-MP-1 > MP-1) in the absence of added salt under the phase contrast condition but also with the help of a fluorescent probe. Taken together, our results suggest that the three mastoparan peptides act through equivalent mechanisms in anionic vesicles.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Interaction of mastoparan peptide MPX with a GUV made from a POPC/POPG 1:1 molar ratio. The sequence shows an example of a vesicle bursting as observed when the peptide was injected with the help of a

micropipet placed close to the vesicle. This procedure may favor sudden vesicle bursting, which is not typical of the peptides in this study. A macropore was also observed. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: cabrera.marcia@gmail.com. Tel: 55-17-32212200 ext 2709. Fax: 55-17-32212247.

ACKNOWLEDGMENT

M.P.d.S.C. acknowledges financial support from the Council for Scientific and Technological Development-CNPq (proc. 477507/2008-5) and FAPESP (proc. 2010/11823-0). D.S.A. and N.B.L. have CAPES fellowships. M.S.P. and J.R.N. acknowledge financial support from FAPESP (proc. 06/57122-7, M.S.P. and J.R.N.) and (proc. 07/03657-0, J.R.N.). M.S.P. and J.R.N. are researchers for the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq). K.A.R. is grateful to the Department of Applied Physics at the University of São Paulo for technical support.

REFERENCES

- (1) Murata, K.; Shinada, T.; Ohfune, Y.; Hisada, M.; Yasuda, A.; Naoki, H.; Nakajima, T. *Amino Acids* **2009**, *37*, 389–394.
- (2) De Souza, B. M.; da Silva, A. V.; Resende, V. M.; Arcuri, H. A.; Dos Santos Cabrera, M. P.; Ruggiero Neto, J.; Palma, M. S. *Peptides* **2009**, *30*, 1387–1395.
- (3) Konno, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Kawai, N.; Miwa, A.; Yasuhara, T.; Morimoto, Y.; Nakata, Y. *Toxicol* **2000**, *38*, 1505–1515.
- (4) Nakajima, T.; Uzu, S.; Wakamatsu, K.; Saito, K.; Miyazawa, T.; Yasuhara, T.; Tsukamoto, Y.; Fujino, M. *Biopolymers* **1986**, *25*, 115–121.
- (5) Hirai, Y.; Kuwada, M.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1979**, *27*, 1945–1946(a).
- (6) Hirai, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T.; Fujino, M.; Kitada, C. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1979**, *27*, 1942–1944(b).
- (7) Dos Santos Cabrera, M. P.; Costa, S. T.; De Souza, B. M.; Palma, M. S.; Ruggiero, J. R.; Ruggiero Neto, J. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 879–891.
- (8) Dos Santos Cabrera, M. P.; De Souza, B. M.; Fontana, R.; Konno, K.; Palma, M. S.; de Azevedo, W. F., Jr; Ruggiero Neto, J. *J. Pept. Res.* **2004**, *64*, 95–103.
- (9) Park, N. G.; Yamato, Y.; Lee, S.; Sugihara, G. *Biopolymers* **1995**, *36*, 793–801.
- (10) Schwarz, G.; Reiter, R. *Biophys. Chem.* **2001**, *90*, 269–277.

- (11) Bechinger, B.; Lohner, K. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1529–1539.
- (12) Eband, R. M.; Eband, R. F. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 289–294.
- (13) Wimley, W. C. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 905–917.
- (14) Almeida, P. F.; Pokorny, A. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8083–8093.
- (15) Sansom, M. S. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 105–124.
- (16) Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1996**, *35*, 11361–11368.
- (17) Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1475–1485.
- (18) Quian, S.; Wang, W.; Yang, L.; Huang, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17379–17383.
- (19) Marsh, D. *Biochemistry* **2009**, *48*, 729–737.
- (20) Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12156–12161.
- (21) Herce, H.; Garcia, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 20805–20810.
- (22) Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12416–12423.
- (23) Hong, J.; Oren, Z.; Shai, Y. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16963–16973.
- (24) Bechinger, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 157–183.
- (25) Rathinakumar, R.; Walkenhorst, W. F.; Wimley, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7609–7617.
- (26) Tamba, Y.; Yamazaki, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4846–4852.
- (27) Lee, M. -T.; Hung, W. C.; Chen, F. -Y.; Huang, H. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 5087–5092.
- (28) Matsuzaki, K.; Murase, O.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12553–12559.
- (29) Chen, F. -Y.; Lee, M. T.; Huang, H. W. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3751–3758.
- (30) Eband, R. F.; Maloy, W. L.; Ramamoorthy, A.; Eband, R. M. *Biochemistry* **2010**, *49*, 4076–4084.
- (31) Bechinger, B. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 349–355.
- (32) Hasper, H. E.; Kramer, N. E.; Smith, J. L.; Hillman, J. D.; Zachariah, C.; Kuipers, O. P.; De Kruijff, B.; Breukink, E. *Science* **2006**, *313*, 1636–1637.
- (33) Ladokhin, A. S.; White, S. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1514*, 253–260.
- (34) Leite, N. B.; da Costa, L. C.; Alvares, D. S.; Dos Santos Cabrera, M. P.; De Souza, B. M.; Palma, M. S.; Ruggiero Neto, J. *Amino Acids* **2011**, *40*, 91–100.
- (35) Yandek, L. E.; Pokorny, A.; Almeida, P. F. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7342–7351.
- (36) Gabriel, G. J.; Som, A.; Ahmad E. Madkour, A. E.; Eren, T.; Tew, G. N. *Mater. Sci. Eng., R* **2007**, *57*, 28–64.
- (37) De Souza, B. M.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Marques, M. R.; Cesar, L. M.; Almeida, R. N.; Pagnocca, F. C.; Konno, K.; Palma, M. S. *Peptides* **2005**, *26*, 2157–2164.
- (38) Tuzimura, K.; Meguro, H.; Konno, T. *Anal. Biochem.* **1975**, *67*, 226–232.
- (39) Rohl, C. A.; Baldwin, R. L. *Methods Enzymol.* **1998**, *295*, 1–26.
- (40) Konno, K.; Hisada, M.; Fontana, R.; Lorenzi, C. C. B.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Miwa, A.; Kawai, N.; Nakata, Y.; Yasuhara, T.; Ruggiero Neto, J.; Azevedo, W. F., Jr.; Palma, M. S.; Nakajima, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1550*, 70–80.
- (41) Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
- (42) Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H.; Kinoshita, K., Jr. *Biophys. J.* **1996**, *71*, 3242–3250.
- (43) Schwarz, G.; Blochmann, U. *FEBS Lett.* **1993**, *318*, 172–176.
- (44) Blondelle, S. E.; Forood, B.; Houghten, R. A.; Perez-Paya, E. *Biopolymers* **1997**, *42*, 489–498.
- (45) Cummings, J. E.; Vanderlick, T. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1796–1804.
- (46) Sood, R.; Domanov, Y.; Pietiainen, M.; Kontinen, V. P.; Kinnunen, P. K. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 983–96.
- (47) Wakamatsu, K.; Okada, A.; Miyazawa, T.; Ohya, M.; Higashijima, T. *Biochemistry* **1992**, *3*, 5654–5660.
- (48) Hori, Y.; Demura, M.; Iwadate, M.; Ulrich, A. S.; Niidome, T.; Aoyagi, H.; Asakura, T. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 302–309.
- (49) De Souza, B. M.; Dos Santos Cabrera, M. P.; Ruggiero Neto, J.; Palma, M. S. *Amino Acids* **2011**, *40*, 77–90.
- (50) Domingues, T. M.; Riske, K. A.; Miranda, A. *Langmuir* **2010**, *26*, 11077–11084.
- (51) Zhao, H.; Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Simmaco, M.; Kinnunen, P. K. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4425–4436.

NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper was published on the Web on August 5, 2011. The Zeta Potential heading in the Results section, Figure 2, and an author affiliation were updated. The corrected version was reposted on August 11, 2011.