

# Estudi de la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model

Víctor Buzón Redorta

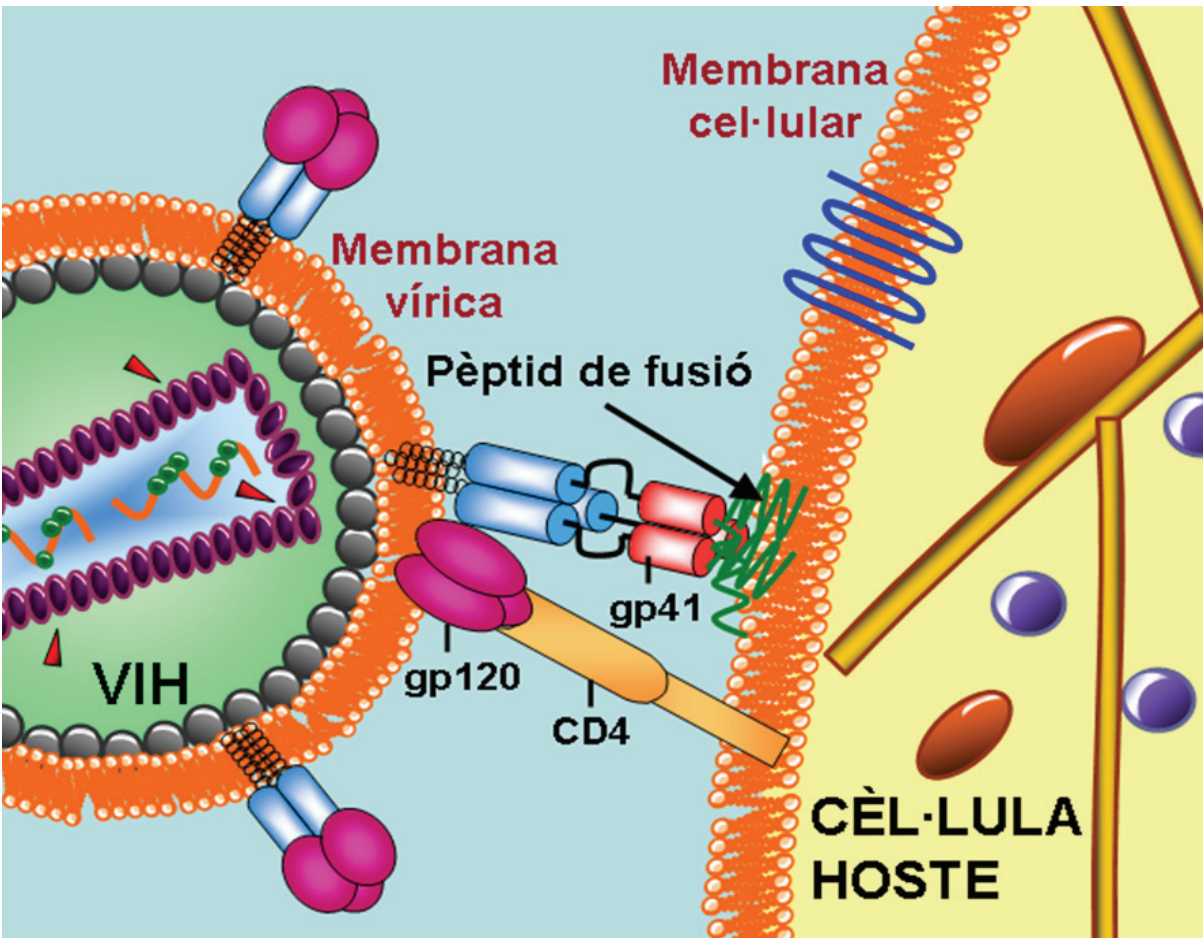
# Estudi de la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model

Víctor Buzón Redorta

Memòria de la Tesi presentada per optar al Grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biofísica i Centre d'Estudis en Biofísica (CEB) del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Doctor Josep Cladera Cerdà.

Vist-i-plau del director  
Josep Cladera Cerdà



**“Si busques quelcom diferent, no facis sempre el mateix”**

Albert Einstein

# Índex

<b>I. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
<b>I. 1. <u>COMPOSICIÓ I ESTRUCTURA DELS VIRIONS MADURS DEL VIH</u> .....</b>	<b>3</b>
<b>I. 2. <u>ORGANITZACIÓ DEL GENOMA VIRAL</u> .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 3. <u>CICLE VITAL DEL VIH</u> .....</b>	<b>8</b>
I. 3. 1. <u>FASE PRIMERENCA</u> .....	8
I. 3. 1. i) Reconeixement i Unió del VIH .....	8
I. 3. 1. ii) Fusió de Membranes .....	8
I. 3. 1. iii) Desensamblatge de la Càpsida .....	9
I. 3. 1. iv) Transcripció Inversa.....	9
I. 3. 1. v) Integració del Genoma Viral .....	10
I. 3. 2. <u>FASE TARDANA</u> .....	11
I. 3. 2. i) Expressió de les Proteïnes Virals .....	11
I. 3. 2. ii) Ensamblatge dels Virions .....	11
I. 3. 2. iii) Alliberament dels Virions al Medi Extracel·lular .....	11
I. 3. 2. iv) Maduració dels Virions .....	12
<b>I. 4. <u>ENTRADA DEL VIH A LA CÈL·LULA HOSTE</u> .....</b>	<b>14</b>
I. 4. 1. <u>LES PROTEÏNES DE L'ENVOLTA VIRAL DEL VIH</u> .....	14
I. 4. 1. i) La Proteïna gp120 del VIH .....	15
I. 4. 1. ii) La Proteïna gp41 del VIH .....	16
I. 4. 2. <u>EL MECANISME DE LA FUSIÓ DE MEMBRANES</u> .....	18
I. 4. 2. i) Canvis Conformationals de les Proteïnes de l'Envolta Viral .....	19
I. 4. 2. ii) Estudis Estructurals i Funcionals de les Proteïnes de l'Envolta Viral .....	20
I. 4. 2. iii) Pèptids Inhibidors Derivats de la Proteïna gp41 .....	23
I. 4. 2. iv) L'Intermediari de la Fusió de Membranes.....	24
I. 4. 2. v) Un Mecanisme de Fusió de Membranes Comú.....	25
I. 4. 2. vi) Altres Proteïnes de Fusió de Membranes.....	27
I. 4. 2. vi. a) Proteïnes de Fusió d'Altres Virus amb Envolta.....	27
I. 4. 2. vi. b) Proteïnes de Fusió de Vesícules Sinàptiques .....	27

<b>I. 5. <u>EL PÈPTID DE FUSIÓ DEL VIH</u></b> .....	<b>29</b>
I. 5. 1. <u>ESTUDIS PREVIS DEL PÈPTID DE FUSIÓ DEL LA PROTEÍNA GP41 DEL VIH</u> .....	30
I. 5. 1. i) Estructura Secundària i Orientació del Pèptid de Fusió .....	32
I. 5. 1. ii) Influència del Colesterol i de la Composició Lipídica de les Membranes Model .....	35
I. 5. 1. iii) Influència del Potencial Dipolar de Membrana .....	37
<b>II. OBJECTIUS</b> .....	<b>39</b>
<b>III. MÈTODES EXPERIMENTALS</b> .....	<b>41</b>
<b>III. 1. <u>MATERIALS UTILITZATS</u></b> .....	<b>41</b>
<b>III. 2. <u>PÈPTIDS DE FUSIÓ</u></b> .....	<b>42</b>
<b>III. 3. <u>PREPARACIÓ DE LIPOSOMES UNILAMEL·LARS GROSSOS (LUVs)</u></b> .....	<b>43</b>
III. 3. 1. <u>PREPARACIÓ DE LUVs</u> .....	43
III. 3. 2. <u>DETERMINACIÓ DE LA MIDA DELS LUVs</u> .....	44
<b>III. 4. <u>ESPECTROSCÒPIA DE FLUORESCÈNCIA</u></b> .....	<b>46</b>
III. 4. 1. <u>FONAMENTS TEÒRICS</u> .....	46
III. 4. 2. <u>SENSORS FLUORESCENTS DE POTENCIALS ELECTROSTÀTICS ASSOCIATS A MEMBRANES BIOLÒGIQUES</u> .....	47
III. 4. 2. i) El Potencial Electrostàtic de Superfície .....	49
III. 4. 2. i. a La Sonda FPE.....	51
III. 4. 2. i. b Marcatge dels LUVs amb FPE.....	53
III. 4. 2. i. c Condicions Experimentals de les Mesures d'Unió a Membranes .....	54
III. 4. 2. ii) El Potencial Dipolar de Membrana .....	55
III. 4. 2. ii. a La Sonda Di-8-ANEPPS .....	56
III. 4. 2. ii. b Marcatge dels LUVs amb Di-8-ANEPPS .....	57
III. 4. 2. ii. c Condicions Experimentals de les Mesures del Potencial Dipolar de Membrana .....	58
III. 4. 3. <u>EXPERIMENTS DE FUSIÓ DE MEMBRANES</u> .....	58
III. 4. 3. i) Fonaments Teòrics .....	58
III. 4. 3. ii) Marcatge dels LUVs amb NBD-PE/Rh-PE .....	61
III. 4. 3. iii) Condicions Experimentals de les Mesures de la Fusió de Membranes .....	62

---

III. 4. 4. <u>EXPERIMENTS DE PERMEABILITAT DE MEMBRANA</u> .....	63
III. 4. 4. i) Mesura de Permeabilitat de Membrana amb ANTS/DPX.....	63
III. 4. 4. i. a Fonaments Teòrics .....	63
III. 4. 4. i. b Encapsulació d'ANTS/DPX en LUVs .....	64
III. 4. 4. i. c Condicions Experimentals de les Mesures de Permeabilitat de Membrana .....	64
III. 4. 4. ii) Mesura de Permeabilitat de Membrana amb CF .....	65
III. 4. 4. ii. a Fonaments Teòrics .....	65
III. 4. 4. ii. b Encapsulació de Carboxifluoresceïna en LUVs .....	66
III. 4. 4. ii. c Condicions Experimentals de les Mesures de Permeabilitat de Membrana .....	66
III. 4. 5. <u>EXPERIMENTS DE FORMACIÓ DE FIBRES AMILOIDES</u> .....	67
III. 4. 5. i) Fonaments Teòrics .....	67
III. 4. 5. ii) Condicions Experimentals de les Mesures de Formació de Fibres .....	67
<b>III. 5. <u>ESPECTROSCÒPIA D'INFRAROIG AMB TRANSFORMADA DE FOURIER</u>.....</b>	<b>68</b>
III. 5. 1. <u>FONAMENTS TEÒRICS</u> .....	68
III. 5. 1. i) Les Vibracions Moleculares i la Radiació Infraroja .....	68
III. 5. 1. ii) Informació Sobre la Conformació de les Biomolècules .....	70
III. 5. 1. iii) Els Espectres d'IR .....	71
III. 5. 1. iv) L'Interferòmetre de Michelson i l'Obtenció dels Espectres d'IR.....	72
III. 5. 2. <u>ADQUISICIÓ DELS ESPECTRES D'IR DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ EN DMSO</u> .....	74
III. 5. 3. <u>MESURES DE FTIR RESOLTES EN EL TEMPS</u> .....	74
III. 5. 3. i) Tria del Tampó.....	74
III. 5. 3. ii) Adquisició dels Espectres FTIR dels Pèptids de Fusió Resolts en el Temps.. ..	75
III. 5. 3. iii) Tractament dels Espectres de FTIR .....	76
<b>III. 6. <u>AJUST MATEMÀTIC DELS EXPERIMENTS CINÈTICS</u> .....</b>	<b>77</b>
<b>III. 7. <u>EXPERIMENTS DE DISPERSIÓ DE LA LLUM</u>.....</b>	<b>77</b>
III. 7. 1. <u>FONAMENTS TEÒRICS</u> .....	77
III. 7. 2. <u>CONDICIONS EXPERIMENTALS</u> .....	77
<b>III. 8. <u>EXPERIMENTS DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ</u>.....</b>	<b>78</b>
III. 8. 1. <u>FONAMENTS TEÒRICS</u> .....	78
III. 8. 2. <u>CONDICIONS EXPERIMENTALS</u> .....	79

<b>IV. RESULTATS</b> .....	<b>81</b>
<b>IV. 1. INTERACCIÓ DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ DE LA PROTEÏNA GP41 DEL VIH AMB MEMBRANES MODEL: UNIÓ A MEMBRANES, BARREJA DE LÍPIDS I ESTUDI ESTRUCTURAL RESOLT EN EL TEMPS</b> .....	<b>81</b>
IV. 1. 1. <u>ESTAT D'AGREGACIÓ I ESTRUCTURA SECUNDÀRIA DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ EN DMSO</u> .....	81
IV. 1. 2. <u>UNIÓ DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ A MEMBRANES MODEL</u> .....	83
IV. 1. 2. i) <u>Inserció de la Sonda FPE a Membranes Model</u> .....	83
IV. 1. 2. ii) <u>Control de la Resposta de la FPE a Variacions del Potencial Electrostàtic de Superfície</u> .....	84
IV. 1. 2. iii) <u>Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model</u> .....	86
IV. 1. 3. <u>BARREJA DE LÍPIDS INDUÏDA PELS PÈPTIDS DE FUSIÓ</u> .....	89
IV. 1. 4. <u>CANVIS ESTRUCTURALS DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ DEGUTS A LA INTERACCIÓ AMB LES MEMBRANES MODEL</u> .....	91
IV. 1. 5. <u>EFFECTE DE LA VARIACIÓ DE LA RELACIÓ MOLAR LÍPID/PÈPTID EN LES CONSTANTS CINÈTIQUES DERIVADES DELS ESTUDIS DE FTIR</u> .....	95
IV. 1. 6. <u>COMPARACIÓ DELS PROCESSOS D'UNIÓ A MEMBRANES, BARREJA DE LÍPIDS I FORMACIÓ D'ESTRUCTURA <math>\beta</math></u> .....	96
IV. 1. 7. <u>FUSIÓ DE MEMBRANES, AGREGACIÓ DE LIPOSOMES I ALLIBERAMENT DE CONTINGUTS INDUÏTS PELS PÈPTIDS DE FUSIÓ</u> .....	98
IV. 1. 8. <u>EFFECTE DE LA UNIÓ DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ EN L'ESTAT D'HIDRATACIÓ DEL GRUP ÈSTER DEL CAP POLAR DELS FOSFOLÍPIDS</u> .....	99
<b>IV. 2. INFLUÈNCIA DEL SEGMENT 24-33 DEL PÈPTID DE FUSIÓ DE LA PROTEÏNA GP41 DEL VIH EN LA INTERACCIÓ AMB MEMBRANES MODEL</b> .....	<b>102</b>
IV. 2. 1. <u>UNIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ FP33 A MEMBRANES MODEL</u> .....	102
IV. 2. 2. <u>CANVIS ESTRUCTURALS DEL FP33 DEGUTS A LA INTERACCIÓ AMB LES MEMBRANES MODEL</u> .....	104
IV. 2. 3. <u>BARREJA DE LÍPIDS INDUÏDA PEL FP33</u> .....	107
IV. 2. 4. <u>FUSIÓ DE MEMBRANES, AGREGACIÓ DE LIPOSOMES I ALLIBERAMENT DE CONTINGUTS INDUÏTS PEL FP33</u> .....	109
IV. 2. 5. <u>COMPARACIÓ DELS PROCESSOS D'UNIÓ, BARREJA DE LÍPIDS I FORMACIÓ D'ESTRUCTURA <math>\beta</math></u> .....	110
IV. 2. 6. <u>MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ DEL FP33</u> .....	112
IV. 2. 7. <u>NATURALESIA NO FIBRIL·LAR DELS AGREGATS DEL FP33</u> .....	114



**IV. 3. EFECTE DEL COLESTEROL EN LA INTERACCIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ DE LA PROTEÏNA GP41 DEL VIH AMB MEMBRANES MODEL: IMPORTÀNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA**

.....	<b>115</b>
IV. 3. 1. <u>MODULACIÓ DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA DELS LUVS PEL COLESTEROL I EL 6-CETOCOESTANOL</u> .....	115
IV. 3. 2. <u>EFECTE DEL COLESTEROL I DEL 6-CETOCOESTANOL EN LA UNIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ A LES MEMBRANES MODEL</u> .....	119
IV. 3. 3. <u>EFECTE DEL COLESTEROL I DEL 6-CETOCOESTANOL EN LA BARREJA DE LÍPIDS INDUÏDA PEL PÈPTID DE FUSIÓ</u> .....	123
IV. 3. 4. <u>EFECTE DEL COLESTEROL I DEL 6-CETOCOESTANOL EN LA CONFORMACIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ AL INTERACCIONAR AMB LES MEMBRANES MODEL</u> .....	126
IV. 3. 5. <u>EFECTE DEL COLESTEROL I DEL 6-CETOCOESTANOL EN EL GRAU D'HIDRATACIÓ DE LES MEMBRANES MODEL</u> .....	128

**V. DISCUSSIÓ.....131**

**V. 1. FUSIÓ DE MEMBRANES INDUÏDA PEL PÈPTID DE FUSIÓ DE LA PROTEÏNA GP41 DEL VIH .....**

.....	<b>131</b>
V. 1. 1. <u>ESTAT D'AGREGACIÓ I ESTRUCTURA SECUNDÀRIA DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ EN DMSO</u> .....	131
V. 1. 2. <u>UNIÓ DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ A MEMBRANES MODEL</u> .....	133
V. 1. 2. i) <u>Cinètiques d'Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model</u> .....	134
V. 1. 2. ii) <u>Corbes d'Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model</u> .....	134
V. 1. 3. <u>BARREJA DE LÍPIDS INDUÏDA PEL PÈPTID DE FUSIÓ</u> .....	136
V. 1. 4. <u>CANVIS ESTRUCTURALS DELS PÈPTIDS DE FUSIÓ DEGUTS A LA INTERACCIÓ AMB LES MEMBRANES MODEL</u> .....	137
V. 1. 5. <u>SEQÜÈNCIA D'ESDEVENIMENTS MOLECULARS QUE CONDUEIXEN A LA FUSIÓ DE MEMBRANES</u> .....	138
V. 1. 6. <u>CARÀCTER AMORF NO FIBRIL·LAR DELS AGREGATS INTERMOLECULARS DEL FP33</u> .....	143

**V. 2. EFECTE DEL COLESTEROL EN LA INTERACCIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ DE LA PROTEÏNA GP41 DEL VIH AMB MEMBRANES MODEL: IMPORTÀNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA**

.....	<b>146</b>
-------	------------

---

V. 3. <u>COMPARACIÓ AMB LA FUSIÓ DE MEMBRANES INDUÏDA PER ALTRES PÈPTIDS DE FUSIÓ VÍRICS</u> .....	149
V. 4. <u>FUSIÓ DE MEMBRANES: MODELS MOLECULARS</u> .....	152
V. 5. <u>ELS PÈPTIDS DE FUSIÓ I ELS AGREGATS PEPTÍDICS</u> .....	156
<b>VI. CONCLUSIONS</b> .....	<b>161</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>163</b>

## ABREVIATURES

<b>À</b>	Amstrong
<b>ANTS</b>	Sal sòdica d'àcid 8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic
<b>ATR-FTIR</b>	Reflexió total atenuada per FTIR
<b>CD</b>	Dicroisme circular
<b>CF</b>	5-carboxifluoresceïna
<b>CHR</b>	Repeticions en tàndem de l'extrem carboxi terminal
<b>COL</b>	Colesterol
<b>Di-8-ANEPPS</b>	Betaïna 1-(3-sulfonatopropil)-4-[β[2-(di- <i>n</i> -octilamino)-naftil]vinil] piridina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid deuterat
<b>DOPC</b>	Dioleilfosfatidilcolina
<b>DOPE</b>	Dioleilfosfatidiletanolamina
<b>DPPC</b>	Dipalmitoilfosfatidilcolina
<b>DPX</b>	Bromat $\rho$ -xilè-bis-piridina
<b>Env</b>	Poliproteïna de l'envolta viral
<b>FP</b>	Pèptid de fusió
<b>FPE</b>	Fluoresceïnafosfatidiletanolamina
<b>FRET</b>	Transferència d'energia per ressonància de fluorescència
<b>FTIR</b>	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier
<b>gp120</b>	Glicoproteïna 120
<b>gp41</b>	Glicoproteïna 41
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HA<sub>0</sub></b>	Precursor de l'hemaglutinina
<b>HA<sub>1</sub></b>	Subunitat 1 de l'hemaglutinina
<b>HA<sub>2</sub></b>	Subunitat 2 de l'hemaglutinina
<b>HFIP</b>	Hexafluoroisopropanol
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida d'alta resolució
<b>IR</b>	Infraroig
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>6-KC</b>	6-cetocolestanol
<b>LUVs</b>	Liposomes unilamel·lars grossos
<b>MET</b>	Microscòpia electrònica de transmissió
<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>MLVs</b>	Liposomes multilamel·lars grossos
<b>NBD-PE</b>	N-(Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) fosfatidiletanolamina
<b>NHR</b>	Repeticions en tàndem de l'extrem amino terminal
<b>nm</b>	Nanòmetre
<b>NMR</b>	Ressonància magnètica nuclear

<b>PA</b>	Àcid fosfatídic
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>Rh-PE</b>	N-(lissamina rhodamina B sulfonil) fosfatidiletanolamina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>SIDA</b>	Síndrome de la immunodeficiència adquirida
<b>SM</b>	Esfingomielina
<b>ss-NMR</b>	NMR en estat sòlid
<b>SUVs</b>	Liposomes unilamel·lars petits
<b>TFA</b>	Àcid trifluoroacètic
<b>TFE</b>	Trifluoroetanol
<b>ThT</b>	Tioflavina T
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de transició
<b>TX100</b>	Triton X-100 reduït
<b>UV-Vis</b>	Espectroscòpia d'ultraviolat-visible
<b>VIH</b>	Virus de la immunodeficiència humana
<b>VIS</b>	Virus de la immunodeficiència de simi

# Introducció

## I. INTRODUCCIÓ

La Síndrome de la Immunodeficiència Humana Adquirida (**SIDA**) va ser descrita com una nova malaltia l'any 1981 als Estats Units. Aquesta síndrome va ser advertida per l'aparició d'una sèrie d'infeccions oportunistes inusuals. Primerament van aparèixer 8 casos en joves homosexuals d'una forma més agressiva de la síndrome de Kaposi a Nova York (Hymes *i col.*, 1981). Al mateix temps que apareixien aquests casos, tant a Califòrnia com a Nova York, va incrementar-se el nombre de casos d'una infecció de pulmó poc freqüent: la pneumònia causada per *Pneumocystis carinii* (Gottlieb *i col.*, 1981). Al juny del mateix any van aparèixer 5 nous casos d'aquest tipus de pneumònia a Los Àngeles, fet que va suggerir que la nova malaltia provocava una depressió molt important del sistema immunitari i que podia ser causada per un agent infeccios transmes per via sexual (Masur *i col.*, 1981).

Simultàniament a aquests esdeveniments van aparèixer nous casos de SIDA en toxicòmans, en persones d'origen haitià, en persones hemofíliques i en un nadó el qual havia rebut múltiples transfusions de sang i productes sanguinis. També es va descriure el primer cas d'una possible transmissió de SIDA per via materno-fetal (Quagliarello, 1982). Tots aquests casos indicaven que la nova malaltia no era exclusiva dels homosexuals.

L'any 1983, el grup del Professor Luc Montagnier va aïllar un nou retrovirus d'una biòpsia d'un nòdul limfàtic d'un pacient amb SIDA, el va anomenar LAV (Virus Associat a la Limfadenopatia) (Barre-Sinoussi *i col.*, 1983) i en va enviar una mostra al grup del Professor Robert Gallo. L'any següent el Professor Gallo va descobrir un nou virus, l'HTLV-III (Gallo *i col.*, 1984), que va resultar ser el mateix virus que el virus LAV descobert pel Professor Montagnier l'any anterior.

Finalment, a l'any 1986, el Comitè Internacional de Taxonomia Viral va batejar el nou virus com **VIH** (Virus de la Immunodeficiència Humana) (Coffin *i col.*, 1986).

Al 1999, un grup d'investigadors de la universitat d'Alabama, va anunciar que la font del VIH-1, un dels tipus del VIH, podia ser una transmissió zoonòtica entre una subespècie de ximpanzé de l'Àfrica central, el *Pan troglodytes troglodytes* i els humans. A més, aquesta zoonosi s'hauria produït degut al contacte entre la sang dels caçadors i la sang infectada d'aquests simis (Gao *i col.*, 1999).

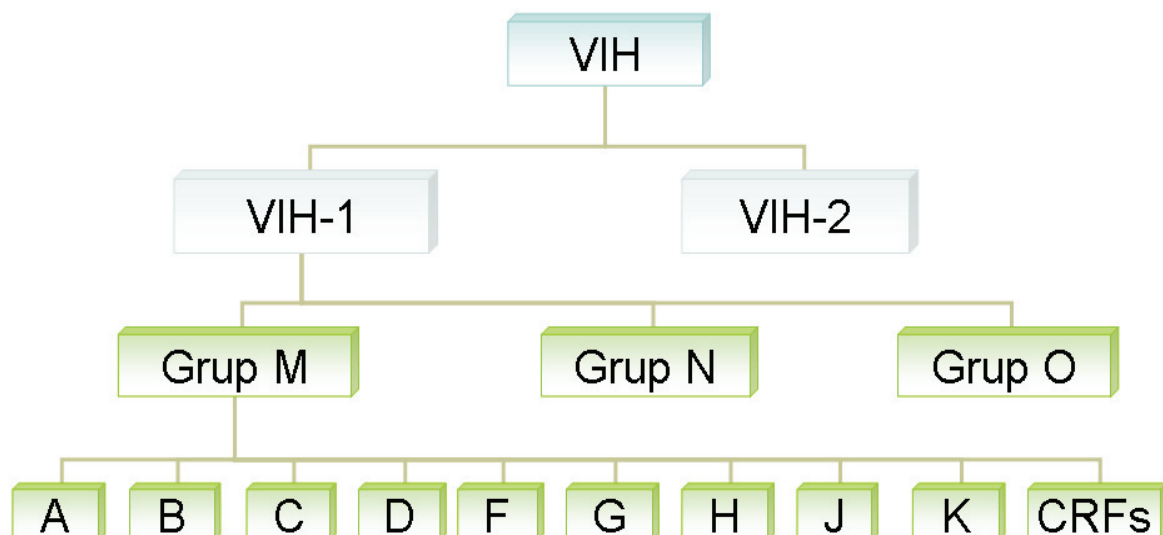
D'altra banda, l'any 2003 un grup d'investigadors belgues va concloure que la font del VIH-2, l'altre tipus del VIH menys agressiu, podria haver estat una transmissió zoonòtica entre l'espècie de simi *Sooty mangabeys* i els humans a Guinea Bissau durant els anys 40 (Lemey *i col.*, 2003).

El VIH és un retrovirus que muta fàcilment i ràpidament, la qual cosa fa que fins i tot, dins d'una mateixa persona infectada, puguin existir diferents formes del virus. Així doncs, basant-se en les similituds genètiques entre les diferents soques, el VIH es classifica en tipus, aquests en grups i finalment els grups en subtipus.

Els dos tipus existents del VIH són els ja esmentats 1 i 2. Aquests dos tipus es transmeten per contacte sexual, a través de la sang o per via materno-fetal entre d'altres; i ambdós tipus provoquen una síndrome indistingible clínicament. Tot i això, sembla ser que el VIH-2 és més difícil de transmetre i que el seu període de latència és més llarg.

El VIH-1 és el tipus que està més estès per tot el món i, quan no s'especifica el tipus, normalment es refereix a aquest. En canvi, el VIH-2 és menys comú i tan sols es troba localitzat en determinades zones de l'Àfrica occidental.

Els diferents nivells de classificació del VIH es presenten a la següent figura (Figura I.1):



**Figura I.1.** Diferents nivells de classificació del VIH. El VIH es classifica en dos tipus: 1 i 2. El tipus 1 a la vegada es classifica en diferents grups: Grup M (*Major*, principal); Grup O (*Outlier*, que no pertany al grup) i N (*New*, nou). Finalment, el grup M es classifica en diferents subtipus: A, B, C, D, F, G, H, J, K i CRFs.

## **I. 1. Composició i Estructura dels Virions Madurs del VIH**

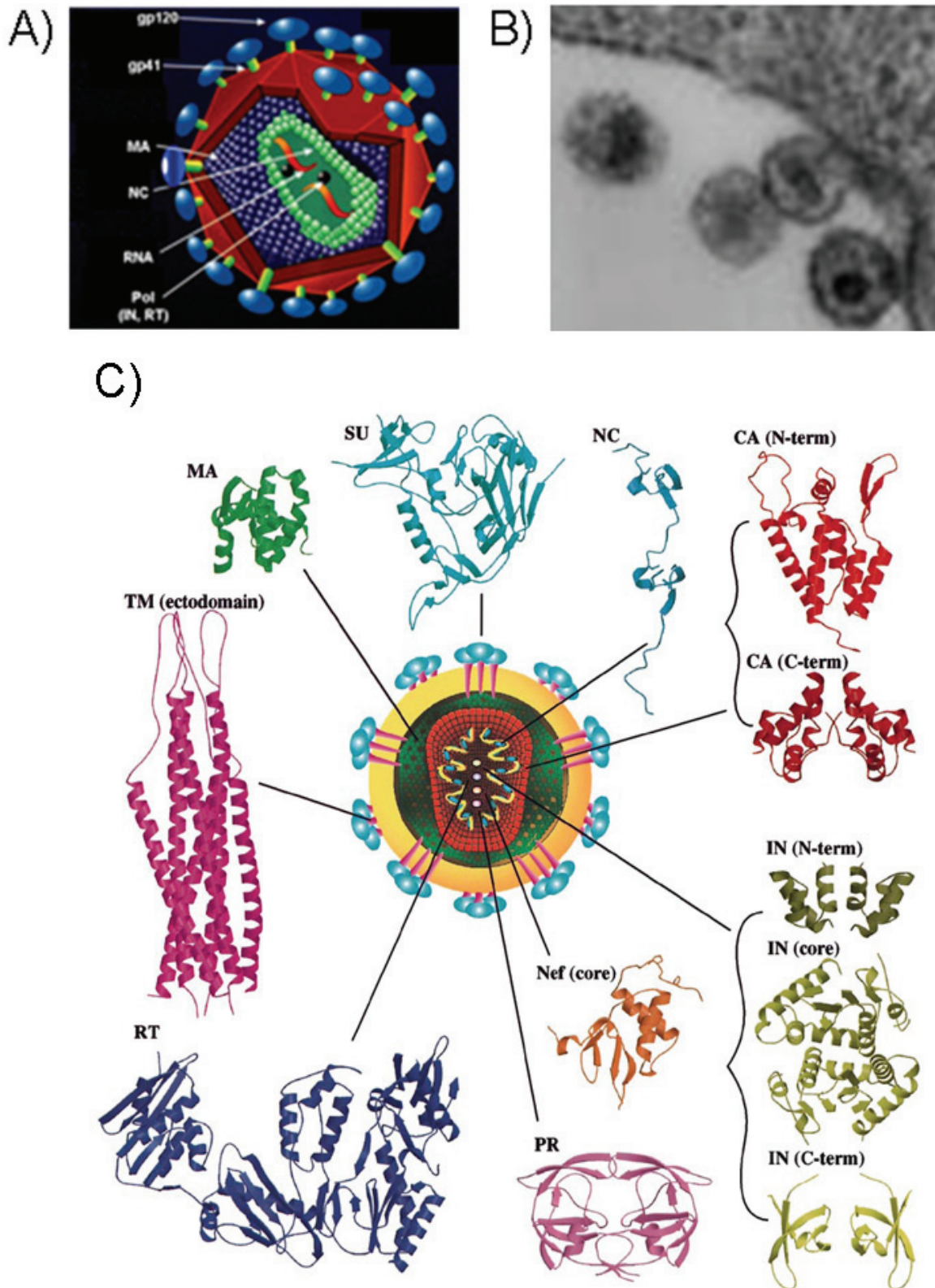
El Virus de la Immunodeficiència Humana tipus 1 (**VIH-1**) és un membre de la família *Retroviridae*. Aquesta família vírica es caracteritza per posseir un enzim, la transcriptasa inversa que permet al virus copiar el seu genoma de RNA de cadena senzilla ((+)ssRNA) a DNA de doble cadena (dsDNA) (Baltimore, 1970; Temin i Mizutani, 1970). Dins de la família *Retroviridae*, el VIH-1 es troba classificat dins del gènere *Lentivirus*. Els *Lentivirus* són retrovirus exògens no oncogènics que provoquen principalment depressions del sistema immunitari o alteracions del sistema nerviós central.

Els virions madurs del VIH-1 presenten una forma esfèrica (*Figura 1.2 A i B*), amb un diàmetre aproximat de 110 nm i tenen una envolta lipídica externa. Aquesta envolta lipídica prové de la cèl·lula hoste i s'hi localitzen principalment la glicoproteïna de la superfície viral gp120 (SU) i la glicoproteïna transmembrana gp41 (TM), tot i que també s'hi localitzen altres proteïnes de membrana provinents de la cèl·lula hoste. Al centre del virió madur es troba la càpsida, envoltada per una matriu proteica formada per la proteïna de la matriu p17 (MA). La càpsida té forma cònica i està formada per la proteïna de la càpsida p24 (CA).

Dins de la càpsida es localitza el genoma viral, format per dues còpies de RNA, el qual es troba estabilitzat per la proteïna de la nucleocàpsida p7 (NC) donant lloc a un complex ribonucleoproteic. La càpsida també conté tres enzims essencials codificats pel virus: la proteasa p9 (PR), la transcriptasa inversa p66 (RT) i la integrasa p32 (IN). A més, existeixen tres proteïnes accessòries que també són empaquetades als virions madurs: Nef, Vif i Vpr (*Figura 1.2 C*).

Finalment el virus també codifica per tres proteïnes que actuen a la cèl·lula hoste però que no s'empaqueten als virions madurs. Aquestes proteïnes són: Rev, Tat i Vpu (Turner i Summers, 1999).

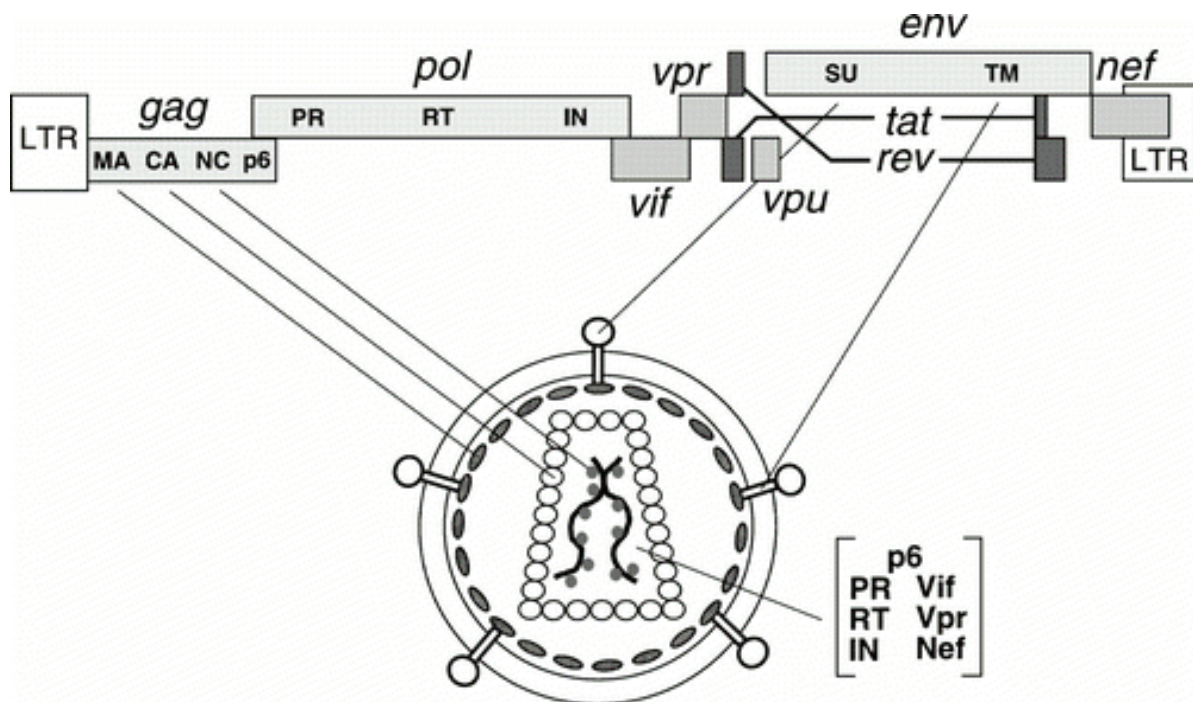




**Figura 1.2.** (A) Representació esquemàtica del virió madur del VIH, indicant les principals proteïnes tant estructurals com funcionals. (B) Microfotografia electrònica de transmissió on es mostra l'alliberament del VIH d'una cèl·lula hoste. (C) Composició i estructura del virió madur del VIH envoltat per la representació en cintes de les proteïnes virals o fragments de proteïna caracteritzades estructuralment. Totes les estructures proteiques es troben representades a la mateixa escala [extret de (Turner i Summers, 1999)].

## I. 2. Organització del Genoma Viral

El VIH, com tots els altres retrovirus, posseeix dues formes genòmiques: RNA de cadena senzilla (ssRNA) a l'etapa extracel·lular del seu cicle vital i DNA de doble cadena (dsDNA), integrat al genoma de la cèl·lula hoste, durant l'etapa del seu cicle vital que transcorre a l'interior de la cèl·lula. Durant la seva etapa intracel·lular, el virus rep el nom de provirus.



**Figura I.3.** Organització genòmica del VIH [extret de (Frankel i Young, 1998)].

La forma integrada del genoma del VIH té aproximadament unes 9.8 Kb de longitud (Muesing *i col.*, 1985). Els dos extrems del provirus estan flanquejats per unes seqüències repetitives conegudes amb el nom de *Long Term Repeats* (LTRs), que codifiquen la informació necessària per a la integració del genoma viral en el genoma de la cèl·lula hoste, així com la informació per a l'inici i la regulació de la transcripció. Els gens del VIH es localitzen a la part central del genoma i codifiquen per a 9 proteïnes (Gallo *i col.*, 1988). Aquestes 9 pautes diferents de lectura codifiquen per tres proteïnes relativament grans: el precursor per Gag que formarà el cor del virió, el precursor per Pol que formarà els enzims essencials del VIH i el precursor per Env que formarà les proteïnes de l'envolta viral. A més, el genoma també codifica per 6 proteïnes petites: Vpu, Vpr, Vif, Tat, Rev i Nef que intervenen

en diferents moments del cicle vital del VIH (*Figura 1.3*). Així doncs, les proteïnes del VIH es poden classificar en tres grups:

1. Proteïnes estructurals: els precursors Gag, Pol i Env.
2. Proteïnes reguladores: Tat i Rev.
3. Proteïnes accessòries: Vpu, Vpr, Vif i Nef.

La següent taula (*Taula 1*) mostra les diferents proteïnes codificades pel VIH i algunes de les funcions que realitzen, així com la seva mida i la seva localització.

GEN	PROTEÏNA	MIDA (KDa)	FUNCIÓ	LOCALITZACIÓ
<i>gag</i>	Matriu (MA)	17	Estabilització de la partícula viral. Interacció amb Env. Transport nuclear de la càpsida	Virió
	Càpsida (CA)	24	Formació de la càpsida viral	Virió
	Nucleocàpsida (NC)	7	Nucleocàpsida, estabilització del RNA	Virió
<i>pol</i>	Proteasa (PR)	9	Hidròlisi dels precursors	Virió
	Transcriptasa inversa (RT)	51/66	Transcripció inversa	Virió
	Integrasa (IN)	32	Integració del genoma viral al genoma de la cèl·lula hoste	Virió
<i>env</i>	Glicoproteïna transmembrana (TM)	41	Fusió de membranes	Membrana viral
	Glicoproteïna superfície (SU)	120	Reconeixement del receptor CD4	Membrana viral
<i>tat</i>	Tat	16/14	Transactivador transcripcional	Nucli cel·lular
<i>rev</i>	Rev	19	Transport del RNA del nucli al citoplasma	Nucli i citoplasma
<i>vpu</i>	Vpu	16	Augment de l'alliberament dels virions.	Proteïna integral de membrana
<i>vpr</i>	Vpr	10/15	Transport del complex de pre-integració. Atura el cicle de les cèl·lules infectades a G2/M. Implicada en apoptosi	Virió, nucli cel·lular
<i>vif</i>	Vif	23	Promou la maduració viral i la capacitat d'infecció	Citoplasma, viriό
<i>nef</i>	Nef	27/25	Regulació del CD4. Influència en la activació cel·lular. Augment de la capacitat d'infecció dels virions	Membrana plasmàtica, citoplasma, viriό

**Taula 1.** Gens i proteïnes del VIH [modificat de (Knipe *i col.*, 2001)].

D'altra banda les proteïnes del VIH també es poden classificar segons la seva mida en dos tipus:

1. Proteïnes petites: aquestes proteïnes són sintetitzades directament en la seva forma madura.
2. Proteïnes grans: aquestes proteïnes, durant el procés de maduració dels virions, són proteolitzades donant lloc a proteïnes en la seva forma madura capaces de realitzar la seva funció. El precursor Pol és processat per donar lloc a la proteasa [PR (p9)], la transcriptasa inversa [RT (p66)], la RNasa H (p15) i la integrasa [IN (p32)]. El precursor Gag és proteolitzat per donar lloc a proteïnes estructurals: la proteïna de la matriu [MA (p17)], la proteïna de la càpsida [CA (p24)], la proteïna de la nucleocàpsida [NC (p7)] i la proteïna p6. Finalment, el precursor Env és processat per donar lloc a la glicoproteïna de superfície [SU (gp120)], responsable del reconeixement de la cèl·lula diana, i a la proteïna transmembrana [TM (gp41)] encarregada de la fusió de les membranes vírica i cel·lular. Tots aquests processos de proteòlisi els realitza la proteasa viral [PR (p9)].

### **I. 3. Cicle Vital del VIH**

Existeixen nombrosos treballs de revisió (Adamson i Jones, 2004; Bukrinskaya *i col.*, 1998; Clapham *i col.*, 1999; Harrich i Hooker, 2002; Van Maele i Debyser, 2005) referents a les diferents etapes del cicle vital del VIH.

El cicle vital del VIH es pot dividir en dues fases: una **fase primerenca**, que comprèn tots els processos implicats des del reconeixement i entrada del virus dins de la cèl·lula hoste fins a la integració del genoma viral en el genoma de la cèl·lula hoste; i una **fase tardana**, que comença amb l'expressió dels gens del genoma viral integrat i que acaba amb l'alliberament del virió al medi extracel·lular i la seva posterior maduració.

#### ***I. 3. 1. Fase Primerenca***

Aquesta fase del cicle vital del VIH consta de diferents etapes (*Figura I.4*):

##### ***I. 3. 1. i) Reconeixement i Unió del VIH***

El primer pas en el procés d'infecció del VIH és el reconeixement entre la glicoproteïna de la superfície vírica gp120 i el receptor CD4 localitzat a la membrana plasmàtica dels limfòcits T. Aquest reconeixement es produeix a la part amino terminal del domini immunoglobulina del receptor CD4. Tot i que aquesta interacció és necessària per a la infecció, no és suficient i cal, a més, la interacció addicional amb uns co-receptors de la cèl·lula hoste. Concretament aquests co-receptors són les molècules CXCR4 i CCR5. Recentment s'ha proposat que la entrada del VIH es produiria per uns microdominis de membrana rics en esfingolípid i colesterol, anomenats *rafts* lipídics.

##### ***I. 3. 1. ii) Fusió de Membranes***

Un cop produït el reconeixement del receptor CD4 i del co-receptor, té lloc un canvi conformacional de la proteïna gp120 que afecta també a la proteïna vírica gp41. Tots aquests canvis conformacionals donen com a resultat la fusió entre l'envolta lipídica del virus i la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste, alliberant-se així la nucleocàpsida al citosol. Aquest procés d'entrada a la cèl·lula hoste s'explicarà amb més detall en seccions posteriors (**Introducció I. 4.**).

### *1. 3. 1. iii) Desensamblatge de la Càpsida*

Un cop la nucleocàpsida es troba a l'interior de la cèl·lula hoste, es produeix el seu desensamblatge, probablement amb el virió encara unit a la membrana de la cèl·lula hoste. Aquest és un procés poc estudiat, però alguns treballs indiquen que es produeix per la fosforilació de la proteïna de la matriu viral per part de la proteïna activadora del mitògen (MAP) cinasa i per accions addicionals de la ciclofilina A i de les proteïnes accessòries Vif i Nef. A més, s'especula que aquest procés de desensamblatge podria ser provocat per un canvi local de pH, ja que la proteïna Nef s'associa a la bomba de protons  $\nu$ ATPasa, en un procés similar al provocat per la proteïna M2 del virus de la grip.

### *1. 3. 1. iv) Transcripció Inversa*

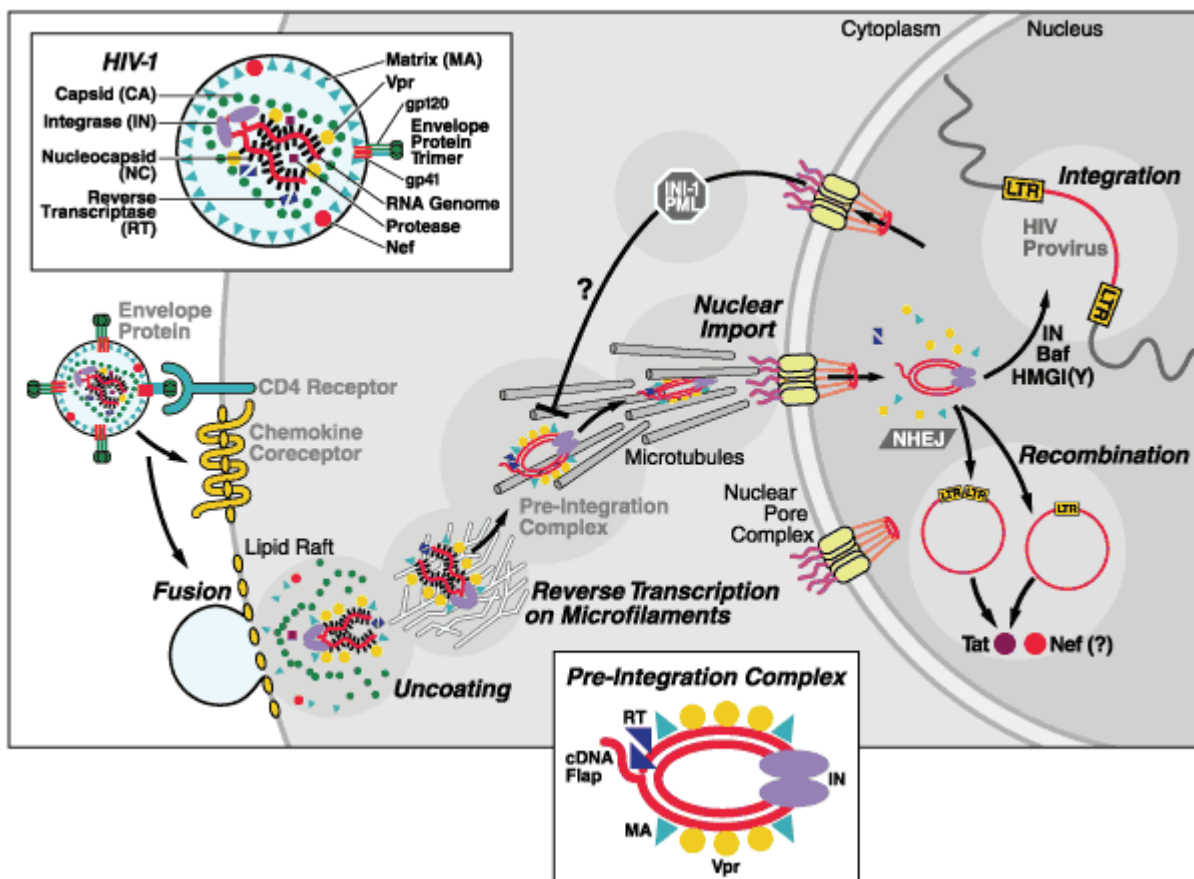
Un cop produït el desensamblatge de la càpsida, el RNA viral de cadena senzilla és transcrit per la transcriptasa inversa a DNA de doble cadena en el citosol de la cèl·lula hoste. En aquesta transcripció inversa també hi participa la proteïna Vif, la qual facilita l'inici de la transcripció, i el RNA de transferència de Lys (tRNA<sup>Lys</sup>) que actua com a iniciador de la transcripció. La transcripció del ssRNA a dsDNA es produeix simultàniament a la hidròlisi del RNA viral per part de la RNasa H. Posteriorment, la DNA polimerasa sintetitza la cadena de DNA complementària a la formada per la transcriptasa inversa. Aquest procés de transcripció es produeix als microfilaments d'actina del citosol.

Un cop sintetitzat, el DNA viral és transportat cap al nucli en forma de complex de pre-integració, el qual inclou la integrasa, la proteïna de la matriu, la mateixa transcriptasa inversa i la proteïna Vpr, així com també altres proteïnes de la cèl·lula hoste. La proteïna de la càpsida, a diferència d'altres complexos de pre-integració retrovirals, sembla ser que no forma part d'aquest complex. La localització nuclear d'aquest complex està dirigida per la proteïna Vpr, la qual no presenta cap senyal de localització nuclear, però que interacciona amb la maquinària cel·lular d'importació nuclear. Aquesta proteïna, Vpr, també interfereix en el cicle cel·lular aturant cèl·lules infectades a la fase G2.

### 1. 3. 1. v) Integració del Genoma Viral

Un cop format el complex de pre-integració, aquest viatja cap al nucli utilitzant els microtúbuls del citoesquelet i penetra al seu interior a través dels porus nuclears. Aquest és un procés poc estudiat en el qual es creu que estan implicades les proteïnes importines  $\alpha$  i  $\beta$  de la cèl·lula hoste, que reconeixen el senyal d'importació nuclear de la proteïna de la matriu. Tot i això, recentment s'ha descobert que la proteïna Vpr conté tres senyals no canòniques d'importació nuclear. Així doncs, es proposa que el transport del complex de pre-integració cap al nucli es produeix degut a les múltiples senyals d'importació nuclear que actuarien d'una manera cooperativa més que no pas per un únic senyal d'importació nuclear.

Un cop a l'interior del nucli, el complex de pre-integració s'estableix com a provirus, de manera que el dsDNA s'integra al genoma de la cèl·lula hoste mitjançant la integrasa viral, la qual s'uneix als extrems del genoma viral.



**Figura 1.4.** Fase primària del cicle vital del VIH després de la seva entrada a la cèl·lula hoste [extret de <http://whivinsite.ucsf.edu> (*HIV InSite Knowledge*) (Greene i Peterlin, 2005)].

### ***1. 3. 2. Fase Tardana***

Aquesta fase del cicle vital del VIH es pot dividir en diferents etapes (*Figura 1.5 i Figura 1.6*):

#### ***1. 3. 2. i) Expressió de les Proteïnes Virals***

La transcripció del genoma viral del VIH dona lloc a més d'una dotzena de transcrits diferents. Alguns d'aquests transcrits són processats simultàniament durant la seva transcripció i viatgen ràpidament cap al citosol de la cèl·lula hoste. Aquest és el cas de les proteïnes reguladores Tat, Rev i Nef. Els altres transcrits individuals o no processats, que codifiquen per proteïnes estructurals, per enzims virals, pel precursor Gag o per proteïnes accessòries, romanen al nucli i són relativament estables ja que seran necessaris en etapes finals del cicle vital.

Els tres processos finals del cicle vital del VIH són l'ensamblatge dels virions, l'alliberament al medi extracel·lular i la seva posterior maduració.

#### ***1. 3. 2. ii) Ensamblatge dels Virions***

Les noves partícules víriques formades s'ensamblen a la part interna de la membrana cel·lular. Cadascun dels nous virions formats conté unes 1500 molècules de Gag i 100 còpies aproximadament del precursor Gag, 2 còpies del genoma viral i la proteïna Vpr. En aquest procés, a més, hi participen diferents proteïnes virals, com el precursor Env, la proteïna Nef i la proteïna Vif, així com també la proteïna de la cèl·lula hoste HP68, que actuaria dirigint els canvis estructurals de Gag necessaris per l'ensamblatge de la càpsida viral.

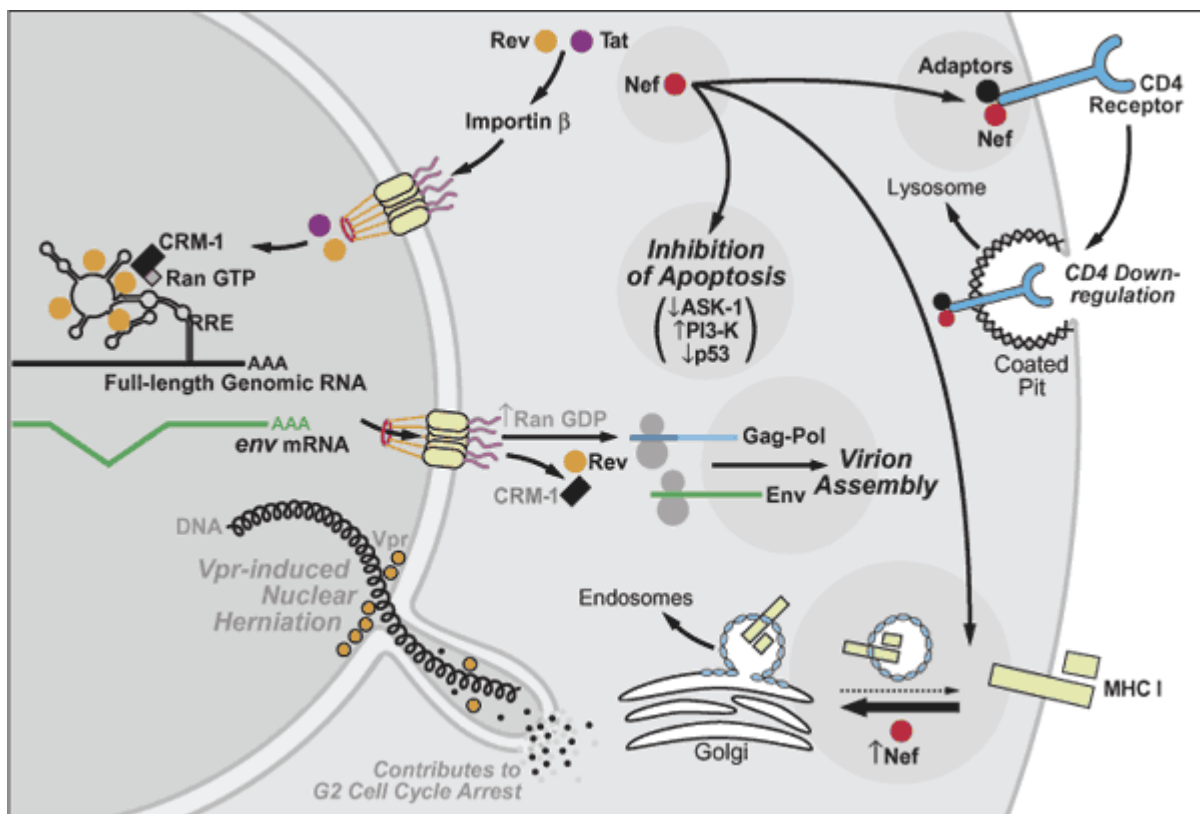
#### ***1. 3. 2. iii) Alliberament dels Virions al Medi Extracel·lular***

Les poliproteïnes Gag sofreixen miristoilacions durant la seva traducció en l'extrem amino terminal, la qual cosa provoca la seva unió preferencial als microdominis de membrana rics en esfingolípid i colesterol. L'alliberament dels virions té lloc per aquestes zones concretes de la membrana, donant lloc a virions l'envolta dels quals és rica en colesterol.

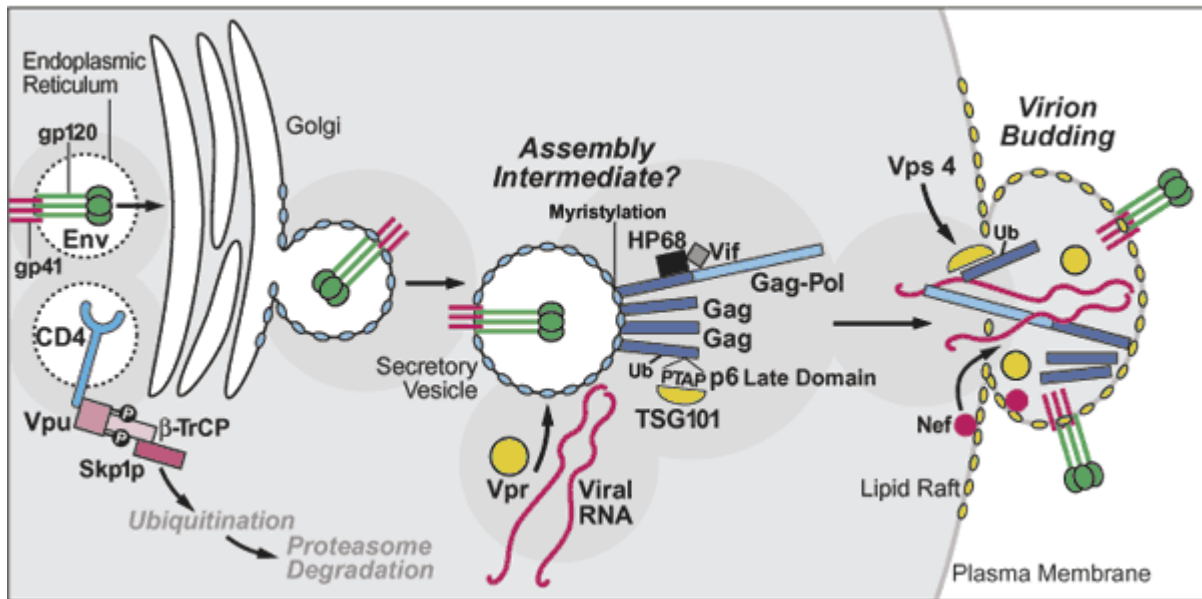


### I. 3. 2. iv) Maduració dels Virions

Un cop el viriò s'allibera al medi extracel·lular, aquest sofreix un procés de maduració que dóna lloc a la formació de virions madurs totalment infectius. Durant aquest procés, els precursors de Gag són processats per donar lloc a la proteïna de la càpsida, a la proteïna de la matriu, a la proteïna de la nucleocàpsida i a la proteïna p6. Aquest processament el realitza la proteasa viral, la qual és una aspartil proteasa i la seva forma activa és un dímer.



**Figura I.5.** Fase tardana del cicle vital del VIH. Expressió de les proteïnes reguladores petites [extret de <http://hivinsite.ucsf.edu> (*HIV InSite Knowledge*) (Greene i Peterlin, 2005)].



**Figura I.6.** Fase tardana del cicle vital del VIH. Processament dels precursors grans [extret de <http://hivinsite.ucsf.edu> (*HIV InSite Knowledge*) (Greene i Peterlin, 2005)].

#### **I. 4. Entrada del VIH a la Cèl·lula Hoste**

La fusió de membranes és un procés cel·lular ubic. Aquest procés té lloc durant el trànsit de membranes, en l'alliberament de neurotransmissors durant la transmissió sinàptica, en la formació de gàmetes durant la reproducció sexual, en la fusió de mitocondris o en determinades infeccions víriques. En el cas del VIH, l'entrada del virus a la cèl·lula hoste implica la fusió de les membranes vírica i cel·lular.

En tots aquests casos, dues membranes diferents, que separen dos compartiments cel·lulars diferents, han de fusionar-se i connectar així els dos compartiments cel·lulars, el contingut dels quals és lliure ara per barrejar-se i reaccionar. D'altra banda, les membranes lipídiques no es fusionen espontàniament i cal energia per superar la repulsió d'hidratació existent entre les dues membranes que s'han de fusionar, així com per desorganitzar l'estructura normal d'aquestes. Per tant, l'energia s'ha d'invertir en eliminar les molècules d'aigua que es troben interaccionant amb els caps polars dels fosfolípids que formen la bicapa, i en afavorir el doblegament de les membranes que s'han de fusionar, creant-se les estructures lipídiques intermediàries de no-bicapa que es formen durant la fusió. Aquesta energia és proporcionada per proteïnes altament especialitzades (Tamm *i col.*, 2003).

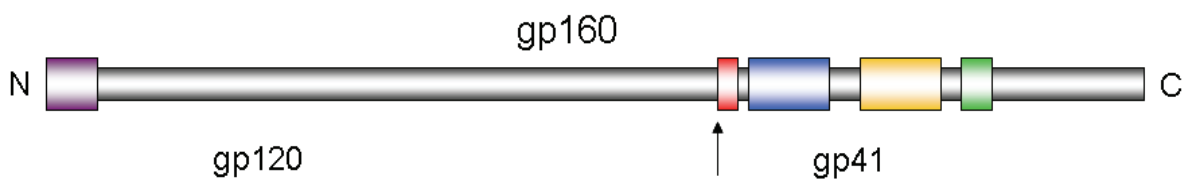
Actualment, el procés més ben estudiat de fusió de membranes és la fusió induïda per les proteïnes de fusió virals de classe I, i més concretament, la fusió de membranes induïda per la proteïna hemaglutinina (HA) del virus de la grip, el qual s'ha utilitzat com a model i paradigma per a la resta de virus amb envolta i, fins i tot, com a model d'altres sistemes de fusió de membranes, com el cas de les proteïnes responsables de l'alliberament de neurotransmissors (SNAREs).

##### ***I. 4. 1. Les Proteïnes de l'Envolta Viral del VIH***

La proteïna precursora Env del VIH és la responsable del reconeixement entre el virus i la cèl·lula hoste, així com també de la posterior fusió entre la membrana vírica i la membrana cel·lular. Aquesta fusió permet l'entrada del virus dins de la cèl·lula produint-se així la infecció d'aquesta per part del virus.

Com a la majoria de virus amb envolta, aquesta proteïna (Env) és processada per donar lloc a dues subunitats: la glicoproteïna de superfície [SU (gp120)], responsable del reconeixement dels receptors i co-receptors de la cèl·lula hoste, i la glicoproteïna transmembrana [TM (gp41)] que és la responsable de la fusió entre la membrana vírica i la membrana cel·lular.

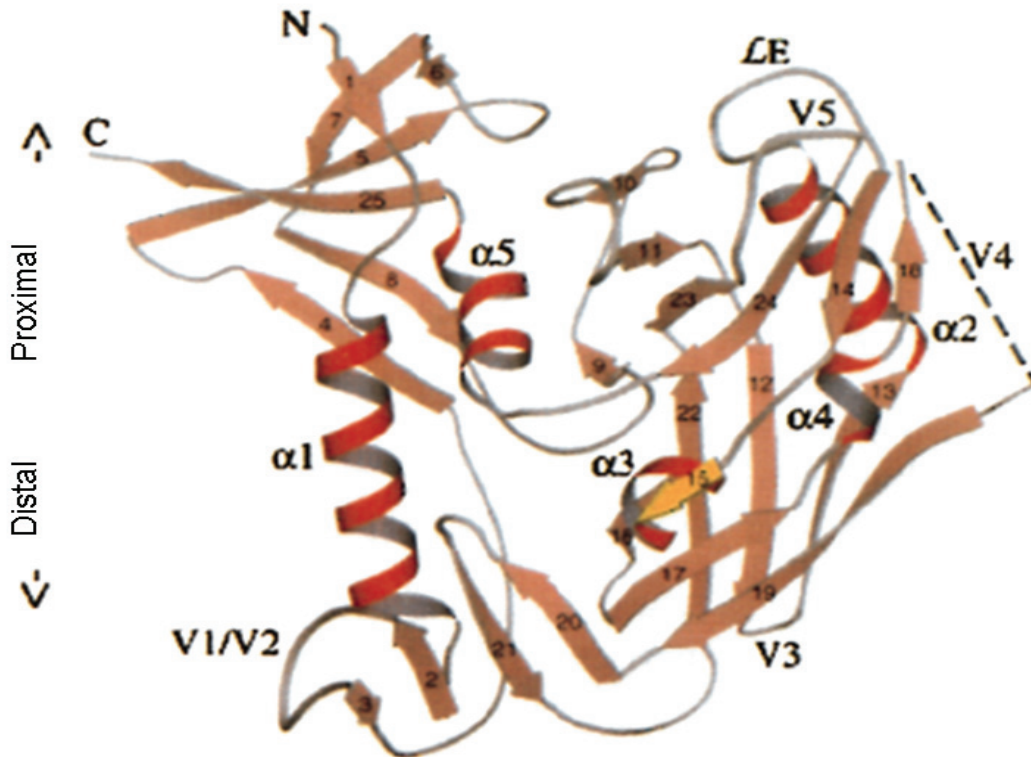
La glicoproteïna Env té 160 KDa (gp160) (*Figura 1.7*) i s'expressa en forma de transcrit no processat. Primerament és sintetitzada al reticle endoplasmàtic i migra posteriorment cap a l'aparell de Golgi, on sofreix un fort procés de glicosilació en 25 o 30 asparagines. Aquesta glicosilació és imprescindible per a la capacitat d'infecció dels virions. Un cop és sintetitzat i glicosilat, el precursor Env és proteolitzat per una proteasa cel·lular generant-se els dos fragments corresponents a les dues subunitats (gp120 i gp41), les quals romanen unides mitjançant interaccions no covalents de tipus feble i que s'expressen en forma de trímers.



**Figura 1.7.** Representació esquemàtica del precursor Env (gp160). La fletxa indica el lloc de tall de la proteasa cel·lular que donarà lloc a les dues subunitats (gp120 i gp41). N i C simbolitzen l'extrem amino i carboxi terminal, respectivament.

#### 1. 4. 1. i) La Proteïna gp120 del VIH

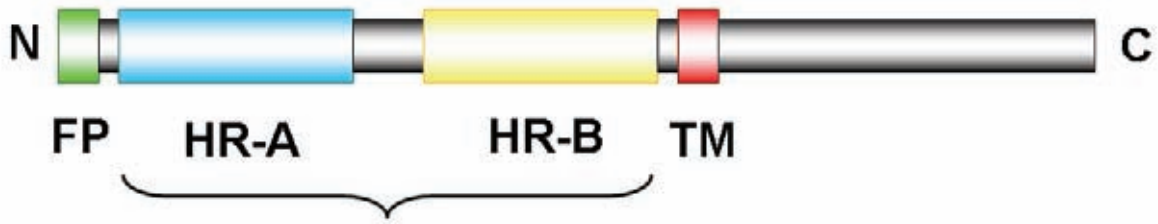
La interacció entre el VIH i el receptor CD4 es dona en dominis específics de la proteïna gp120. L'estructura cristal·logràfica (Kwong *i col.*, 1998) d'aquesta proteïna ha estat resolta (*Figura 1.8*) revelant 9 ponts disulfur molt conservats. També presenta 5 regions hipervariables, anomenades des de V1 fins V5, la seqüència de les quals pot variar enormement dins de les diferents soques víriques. Una d'aquestes regions, concretament la regió V3, no està directament implicada en la unió amb el receptor CD4 sinó que està implicada en la unió als co-receptors CCR5 o CXCR4, els quals pertanyen a la família de receptors de citosines i són molècules de 7 hèlixs  $\alpha$  transmembrana acoblades a proteïna G. Aquest fet determina el tropisme preferencial del VIH o bé per les línies cel·lulars de limfòcits T o bé pels macròfags primaris.



**Figura 1.8.** Estructura cristal·logràfica de la proteïna gp120 mostrant les regions hipervariables (V1-V5), així com els diferents tipus d'estructures secundàries que la formen [modificat de (Kwong *i col.*, 1998)].

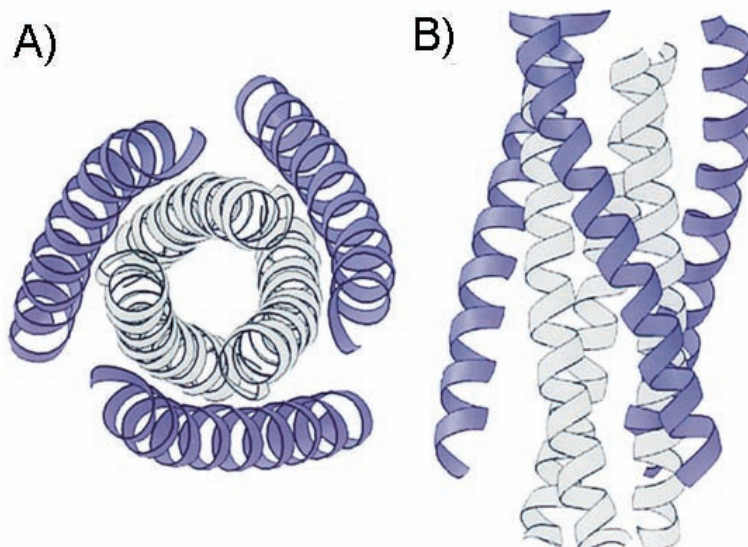
#### 1. 4. 1. ii) La Proteïna gp41 del VIH

La glicoproteïna transmembrana gp41 és la responsable final de la fusió entre la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste i l'envolta lipídica viral. Aquesta proteïna consta d'un ectodomini a l'extrem amino terminal, una regió transmembrana i un domini carboxi terminal intraviral petit que interacciona amb la proteïna de la matriu viral (*Figura 1.9*). L'extrem amino terminal de la proteïna gp41 és una regió rica en residus de glicina i alanina, amb longitud d'uns 15-33 residus i que es coneix amb el nom de **pèptid de fusió (FP)**. A l'ectodomini d'aquesta proteïna també s'hi localitzen dues zones conegudes amb el nom de *heptad repeats A* i *B*, respectivament, que presenten una sèrie d'aminoàcids hidrofòbics repetits en tàndem característics de les molècules que formen hèlixs superenrotllades.



**Figura I.9.** Representació esquemàtica de la proteïna gp41. En verd es representa el pèptid de fusió, en vermell és representa la regió transmembrana i en blau i groc el *heptad repeat A* i *B*, respectivament. N simbolitza l'extrem amino terminal i C l'extrem carboxi terminal.

L'estructura de l'ectodomini de l'extrem amino terminal de la proteïna gp41 ha estat resolta (Chan *i col.*, 1997; Tan *i col.*, 1997; Weissenhorn *i col.*, 1997) així com l'ectodomini d'altres proteïnes virals de classe I (Baker *i col.*, 1999; Bullough *i col.*, 1994; Caffrey *i col.*, 1998; Chen *i col.*, 1999; Malashkevich *i col.*, 1999; Zhao *i col.*, 2000). L'estructura cristal·logràfica de l'ectodomini de la proteïna gp41 del VIH (Figura I.10) revela que s'associa formant trímers simètrics i que cada monòmer està format per dues hèlixs  $\alpha$  unides mitjançant un llaç. Les hèlixs  $\alpha$  amino terminal de cada monòmer formen el nucli central d'una hèlix superenrotllada (*coiled coil*) paral·lela i les tres hèlixs  $\alpha$  carboxi terminal s'empaqueten al voltant d'aquest nucli de manera antiparal·lela. La forma global d'aquesta estructura és bàsicament cilíndrica, amb els extrems amino i carboxi terminals en el mateix extrem de la molècula, mentre que a l'altre extrem d'aquesta es localitza el llaç.



**Figura I.10.** Estructura cristal·logràfica de l'ectodomini de la proteïna gp41 del VIH. (A) Vista superior. (B) Vista lateral. En blau es representen les hèlixs  $\alpha$  carboxi terminal i en gris les hèlixs  $\alpha$  amino terminals [extret de (Chan *i col.*, 1997)].

Cal remarcar, però, que l'elevada hidrofobicitat del pèptid de fusió de la proteïna gp41 ha fet impossible la cristal·lització de l'ectodomini complet, i per tant, l'estructura cristal·logràfica de l'ectodomini amb el pèptid de fusió no ha pogut ser determinada mitjançant cristal·lografia de raigs X.

#### ***1.4.2. El Mecanisme de la Fusió de Membranes***

El model actual del mecanisme de la fusió de membranes induïda per proteïnes virals va ser proposat per Carr i Kim (1993).

Com ja ha estat comentat, l'entrada del VIH dins la cèl·lula hoste s'inicia quan la gp120 interacciona amb el receptor CD4 i amb els co-receptors. Un cop s'ha produït aquesta interacció té lloc la fusió entre l'envolta lipídica del virus i la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste.

Les proteïnes de fusió virals sofreixen una sèrie de canvis conformacionals que finalment desencadenaran la fusió. S'ha proposat que aquestes proteïnes, abans de la fusió, es trobarien en un estat metastable (un estat energètic proper a l'estat estable però separat d'aquest per una barrera energètica), en el qual el pèptid de fusió es trobaria en una butxaca hidrofòbica de la proteïna transmembrana i sense estar exposat al medi. Un cop produïts els canvis conformacionals deguts a la interacció entre la gp120, el CD4 i els co-receptors, tindria lloc l'exposició d'aquest pèptid al medi, aproximant-se les dues membranes que s'han de fusionar. Per estudiar la fusió del VIH amb la cèl·lula hoste s'ha utilitzat com a model i paradigma el virus de la grip per al qual s'ha proposat un elegant mecanisme de fusió d'entrada del virus dins de la cèl·lula hoste. Aquest model ha estat utilitzat per la resta de proteïnes de fusió virals.

Per tal d'explicar la fusió de membranes induïda per la proteïna gp41 del VIH, sovint es fa referència als experiments realitzats amb la proteïna hemaglutinina (HA) del virus de la grip, que actuaria d'una manera anàloga a la proteïna Env. Tot i que aquestes dues proteïnes (HA i Env) pertanyen a virus de dues famílies víriques diferents, *Paramixoviridae* i *Retroviridae*, respectivament, i que difereixen en la seva organització genòmica, morfologia i estratègia de replicació, sembla ser que a nivell molecular utilitzen un mecanisme similar d'entrada a la cèl·lula hoste.

S'ha establert que les proteïnes HA i Env són les úniques proteïnes necessàries perquè es produeixi la fusió. Les dues són sintetitzades com a precursors incapaçs de realitzar la fusió. Aquests precursors són després proteolitzats donant lloc a dues subunitats, una de superfície (HA<sub>1</sub> i gp120) i una altra transmembrana (HA<sub>2</sub> i gp41), les quals romanen associades per un pont disulfur, en el cas del virus de la grip o per interaccions no covalents de tipus feble, en el cas del VIH. La funció de la proteïna de superfície és el reconeixement dels receptors, mentre que la subunitat transmembrana, que conté en el seu extrem amino terminal l'anomenat **pèptid de fusió**, és responsable de la interacció amb la membrana de la cèl·lula hoste. Tot i les grans similituds entre aquestes dues proteïnes, els llocs d'entrada del virus són diferents. El virus de la grip utilitza com a receptor l'àcid siàlic, seguidament és endocitat, viatja cap als endosomes i penetra al citosol de la cèl·lula hoste per una disminució del pH. En canvi, el VIH utilitza el receptor CD4 per entrar a la cèl·lula hoste mitjançant un mecanisme independent del pH.

#### *1. 4. 2. i) Canvis Conformationals de les Proteïnes de l'Envolta Viral*

La confirmació que, en el cas del virus de la grip, la disminució del pH induïa la fusió (Maeda *i col.*, 1981; Maeda i Ohnishi, 1980; Simons *i col.*, 1982) va fer que s'iniciés l'estudi de l'estructura de l'HA<sub>2</sub> a pH àcid. Estudis similars per al VIH indiquen que existeixen canvis conformationals en resposta a la unió de la proteïna gp41 al receptor CD4. Aquestes evidències són:

1. L'exposició a condicions que indueixen fusió (interacció amb el receptor CD4 en el cas de la gp120) fa que la gp41 esdevingui més hidrofòbica, ja que adquireix la capacitat d'unir bis-ANS, una sonda fluorescent hidrofòbica (Jones *i col.*, 1998; Korte i Herrmann, 1994).
2. La gp41 en condicions fusogèniques presenta un patró de digestió diferent al patró de digestió que presenta en condicions no fusogèniques (Clements *i col.*, 1991; Doms *i col.*, 1985).



3. Estudis mutagènics suggereixen l'existència de diferents conformacions de la proteïna, ja que mutacions en la gp41 que prediuen una pèrdua de la capacitat de formació d'hèlixs superenrotllades però que no alteren la seva expressió ni el seu processament proteolític, sí que afecten a la seva capacitat d'infecció. Així doncs, molt probablement, aquestes mutacions alteren l'estat actiu fusogènic de la proteïna, però no l'estat natiu no fusogènic (Cao *i col.*, 1993; Chen, 1994; Chen *i col.*, 1993; Dubay *i col.*, 1992; Pountourios *i col.*, 1997; Weng i Weiss, 1998; Wild *i col.*, 1994a).
4. En condicions fusogèniques es produeix una alteració de l'accessibilitat dels epítops; per exemple, la regió V3 de la gp120 és reconeguda un cop s'ha produït la unió amb el CD4 i és en aquest moment que es fan accessibles altres epítops tant de la gp41 com de la pròpia gp120 (Sattentau i Moore, 1991; Thali *i col.*, 1993).

#### *1. 4. 2. ii) Estudis Estructurals i Funcionals de les Proteïnes de l'Envolta Viral*

Després de dècades de treball, els estudis sobre l'estructura i la funció de les glicoproteïnes, tant del virus de la grip com del VIH, han aportat detalls dels canvis conformacionals que tenen lloc durant la fusió.

A més, aquests canvis han estat ben definits en el cas de la HA<sub>2</sub> del virus de la grip ja que ha estat resolta cristal·logràficament la seva estructura en els seus tres estats:

1. El precursor no processat (HA<sub>0</sub>).
2. El precursor processat en la forma activada a pH àcid (HA<sub>2</sub> actiu).
3. El precursor processat en la forma inactiva a pH neutre (HA<sub>2</sub> inactiu).

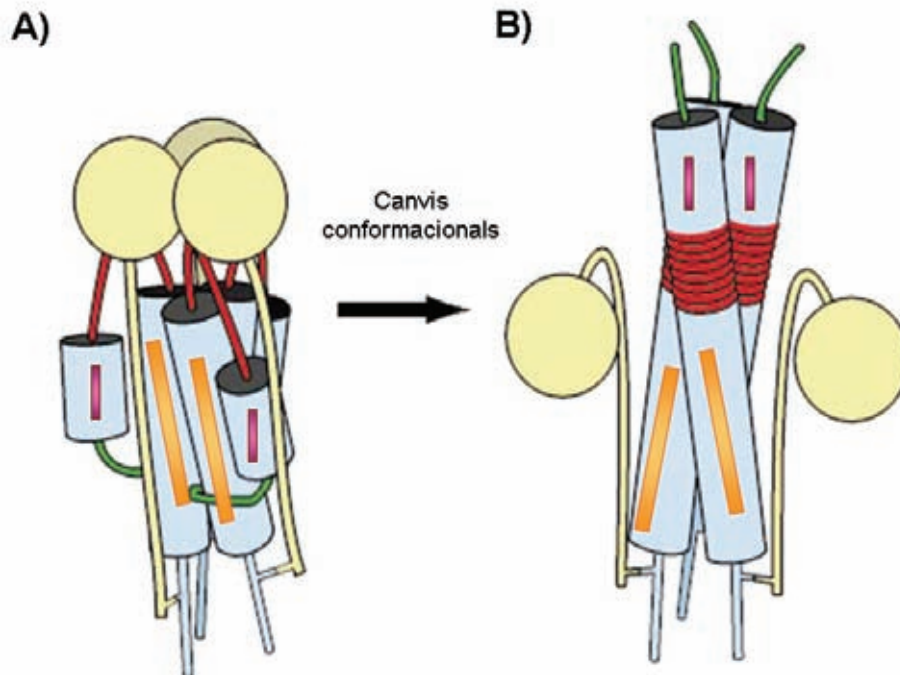
En el cas del VIH, en canvi, tan sols ha estat possible resoldre l'estructura cristal·logràfica de la gp41 en un estat que es creu que és l'estat final del procés de fusió.

L'any 1981 es va resoldre l'estructura de l'HA<sub>0</sub> a pH neutre (Wilson *i col.*, 1981) revelant que forma un trímer de 135 Å de longitud. Al capdamunt de l'estructura es localitzen tres zones polars exposades, corresponents a la subunitat HA<sub>1</sub> i que són les responsables de la unió a àcid siàlic. Aquesta subunitat HA<sub>1</sub> seria l'homòloga a la subunitat gp120 del VIH. D'altra banda, l'extrem amino terminal de la subunitat HA<sub>2</sub> (homòloga a la gp41) conté el pèptid de fusió, el qual es troba amagat a dins de

l'estructura. Aquest pèptid es localitza aproximadament a uns 35 Å de l'extrem carboxi terminal i a 100 Å de l'extrem oposat. Posteriorment, a l'any 1993, diferents experiments realitzats amb pèptids sintètics suggerien que la disminució de pH que té lloc als endosomes podria provocar canvis conformacionals en l'HA<sub>0</sub>. Mitjançant mètodes computacionals es va identificar que una regió de l'HA<sub>2</sub> (residus 54-81) tenia una elevada tendència a formar hèlixs superenrotllades. Estudis posteriors mitjançant pèptids sintètics, suggerien que aquesta regió s'estructurava en forma d'hèlix superenrotllada. Tot i això, l'estructura nativa mostrava que aquests residus es trobaven formant un llaç.

Per tant, es va proposar que la transició de la forma no fusogènica de l'HA a la seva forma fusogènica estava provocada per una transició llaç-hèlix. D'aquesta manera l'hèlix superenrotllada trimèrica s'estendria, aproximant el pèptid de fusió cap a l'extrem oposat d'on es localitza inicialment, permetent així la interacció amb la membrana endosomal. Aquest mecanisme va ser batejat com **Spring-Load Mechanism** (mecanisme de la molla carregada) (*Figura 1.11*) (Carr i Kim, 1993).

Un any més tard es va determinar l'estructura cristal·logràfica del precursor processat en la forma activada a pH àcid (HA<sub>2</sub> actiu) (Bullough *i col.*, 1994), que va confirmar el mecanisme proposat i descrit en el paràgraf anterior. Tot i que aquesta estructura no presenta el pèptid de fusió, el mecanisme proposat és coherent amb un desplaçament del pèptid de fusió de 100 Å des de la seva posició inicial fins al seu estat final.



**Figura I.11.** Mecanisme de la molla carregada (**Spring-Load Mechanism**). **(A)** Esquema de la conformació nativa de l'HA<sub>0</sub>: les esferes grogues simbolitzen les subunitats HA<sub>1</sub> i els cilindres blaus representen l'hèlix superenrotllada trimèrica central de les subunitats HA<sub>2</sub>. El peptid de fusió es representa en verd i en vermell es representa la zona inicialment estructurada en forma de laç. Els rectangles taronges representen els pèptids C i en morat es representen els pèptids N (veure més endavant (Introducció I. 4. 2. iii) ). **(B)** Esquema de la conformació fusogènica de l'HA. A pH àcid es produeixen els canvis conformacionals que donen lloc a l'estructura activa fusogènica de la molècula d'HA<sub>2</sub>. Les interaccions no covalents entre les subunitats HA<sub>1</sub> i HA<sub>2</sub> es debiliten i les regions en forma de laç de les subunitats HA<sub>2</sub> (representades en vermell) passen a estructurar-se en forma helicoidal, estenent-se l'hèlix superenrotllada trimèrica central i permetent així que els pèptids de fusió puguin interaccionar amb la membrana endosomal i s'iniciï la fusió de membranes [modificat de (Eckert i Kim, 2001)].

Aquesta transició laç-hèlix durant l'activació de l'HA<sub>0</sub>, ha estat confirmada mitjançant l'estudi de mutacions puntuals que disminueixen la propensió a formar hèlixs en la regió estructurada inicialment en forma de laç. Mutacions a prolines (aminoàcids trencadors d'estructura helicoidal) en les posicions 55 i 71 fan que l'HA<sub>0</sub> mantingui inalterable la seva expressió a la superfície de l'envolta i la seva maduració proteolítica, però en canvi inhibeixen la fusió (Qiao *i col.*, 1998).

Tot i l'elevat grau de coneixement del mecanisme de fusió, el mecanisme pel qual la disminució de pH en el cas de la HA<sub>0</sub> fa possible el canvi conformacional roman encara desconegut. S'ha proposat que la HA<sub>0</sub> en estat natiu no activat es trobaria en una conformació metastable separada per una barrera energètica de la forma fusogènica estable, ja que si se sotmet l'HA<sub>0</sub> a elevades temperatures o bé a diferents agents químics, l'HA<sub>0</sub> s'activa d'una manera independent del pH (Carr i Kim, 1993).

Així doncs, aquesta disminució del pH serviria per superar la barrera energètica existent entre l'estat natiu metastable i l'estat actiu més estable termodinàmicament.

En el cas del VIH, per tal d'obtenir informació estructural de la gp41 es va expressar el seu ectodomini en absència del pèptid de fusió i es va tractar posteriorment amb proteases. Després de l'acció de les proteases, es va observar que l'ectodomini romanent era extremadament estable i estava format per dos pèptids discontinus, anomenats N51 i C43, de manera que els diferents pèptids derivats d'aquestes dues regions s'anomenen pèptids N i pèptids C, respectivament (*Figura 1.11*) (Lu *i col.*, 1995). Estudis biofísics amb aquests pèptids van suggerir que formaven una hèlix superenrotllada, la qual cosa va ser confirmada posteriorment mitjançant l'obtenció de la seva estructura cristal·logràfica.

Finalment, la fusió de membranes es produeix degut a un canvi conformacional lent de la proteïna transmembrana gp41, que forma una estructura de **forquilla trimèrica** (*trimeric hairpin*) (*Figura 1.12*). Aquest tipus d'estructura en forma d'hèlix superenrotllada permet l'acostament de les dues membranes que s'han de fusionar.

#### 1. 4. 2. iii) Pèptids Inhibidors Derivats de la Proteïna gp41

El descobriment dels pèptids inhibidors derivats de l'ectodomini de la proteïna gp41 del VIH va ajudar a establir un model de fusió degut al seu efecte inhibidor sobre la fusió, el qual ja havia estat observat abans que es ressolés l'estructura cristal·logràfica de la proteïna gp41. Els resultats van mostrar que, mentre que els pèptids N mostraven una inhibició de la fusió a concentracions micromolars, els pèptids C mostraven una inhibició d'aquesta a concentracions nanomolars, la qual cosa indicava que aquests últims eren molt més efectius inhibint la infecció. Per aquest motiu es va proposar que els pèptids C es podien unir a la regió adjacent al pèptid de fusió (corresponent al *heptad repeat A*), que s'havia predit que s'estructurava en forma d'hèlix  $\alpha$  i que corresponia a la regió dels pèptids N, inhibint la fusió d'una manera dominant negativa (Chen *i col.*, 1995; Jiang *i col.*, 1993; Lu *i col.*, 1995; Wild *i col.*, 1993; Wild *i col.*, 1992; Wild *i col.*, 1994b). Algunes de les evidències que donaven suport a la hipòtesi de l'efecte inhibidor dominant negatiu dels pèptids van ser:

1. L'activitat inhibidora dels pèptids C disminuïa en presència de quantitats equimolars de pèptids N (Lu *i col.*, 1995).
2. Els pèptids C mutats que desestabilitzaven la formació de l'hèlix superenrotllada trimèrica tenien una capacitat inhibidora menor que la dels pèptids salvatges (Chan *i col.*, 1998; Wild *i col.*, 1995).
3. La regió hidrofòbica del pèptid N predit com a lloc d'unió per al pèptid C es trobava molt conservada entre el VIH i el VIS (Malashkevich *i col.*, 1998).
4. Determinats virus que havien desenvolupat resistència a pèptids C mostraven substitucions aminoacídiques en la regió dels pèptids N (Furuta *i col.*, 1998).

Tot i això, encara quedava per resoldre la qüestió de com els pèptids C podien inhibir la formació de la forquilla trimèrica entre els pèptids NHR i CHR d'una mateixa molècula de gp41 a través d'una interacció que es produïa a concentracions nanomolars.

#### *1. 4. 2. iv) L'Intermediari de la Fusió de Membranes*

Tot i les evidències descrites en el punt anterior, encara no es coneixia el mecanisme pel qual aquests pèptids inhibien la fusió. Aquesta qüestió va ser parcialment resolta amb la suposició de l'existència d'un intermediari transitori durant el procés de fusió (*Figura 1.12*) que es formaria després de la interacció amb el receptor, però abans de la formació de la forquilla trimèrica. En aquest intermediari, anomenat pre-forquilla, la regió dels pèptids N quedaria exposada transitòriament, de manera que els pèptids C sintètics s'hi podrien unir. A més, aquesta unió hauria de ser irreversible (Chan i Kim, 1998; Furuta *i col.*, 1998; Weissenhorn *i col.*, 1999).

Tot i que el possible intermediari no ha estat encara visualitzat, existeixen algunes evidències experimentals que donen suport a la hipòtesi de la seva existència. Per exemple, si s'incuba una mostra de VIH amb pèptids C i aquests s'eliminen abans de l'addició de la cèl·lula hoste, la fusió no queda inhibida. Això implica que aquests pèptids han d'estar presents durant el canvi conformacional que sofreix la proteïna gp41 (Furuta *i col.*, 1998). A més, la cinètica de la inhibició de la fusió per part dels pèptids C suggereix l'existència d'un intermediari transitori amb una vida mitja de l'ordre de minuts (Muñoz-Barroso *i col.*, 1998).

#### 1. 4. 2. v) Un Mecanisme de Fusió de Membranes Comú

Així doncs, amb les dades estructurals existents fins al moment, és possible descriure un mecanisme de fusió comú per al VIH i per al virus de la grip que es pot fer extensible a altres virus amb envolta. Segons aquest mecanisme, en les cèl·lules infectades pels virus, les glicoproteïnes de l'envolta viral serien expressades en forma de precursor no proteolitzat, incapaç de realitzar la fusió. Un cop proteolitzats, la proteïna quedaria en un estat metastable.

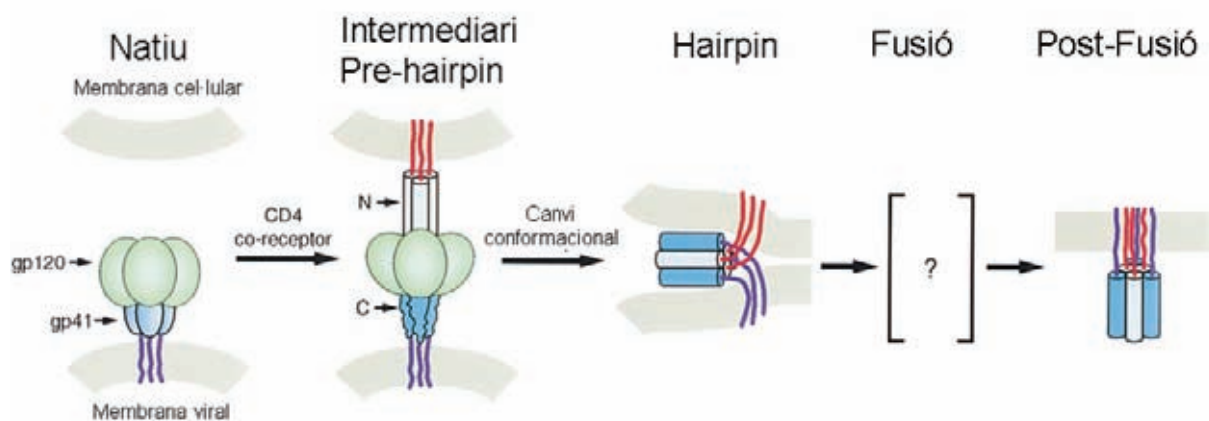
L'estructura cristal·logràfica del HA<sub>0</sub> (estat natiu sense proteolitzar) ha estat resolta i presenta una estructura gairebé idèntica a l'estructura de la forma nativa processada a pH neutre, únicament diferint en els 18 residus implicats en aquest processament. En l'estructura del precursor, aquests residus es troben exposats al solvent amb una estructura desordenada, però un cop produït aquest trencament la nova zona de l'extrem carboxi terminal creada de l'HA<sub>1</sub> i la nova zona amino terminal de l'HA<sub>2</sub> se separen. Aleshores el pèptid de fusió quedaria amagat a l'interior de la molècula de HA<sub>2</sub>, situant-se a la seva base i preparat per sofrir el canvi conformacional un cop s'activi la molècula. Les dades suggereixen que aquest processament atrapa la proteïna en un estat metastable separat de l'estat estable per una barrera energètica quedant, per tant, la fusió bloquejada.

Un cop la proteïna s'exposa a condicions fusogèniques (ja sigui una disminució del pH o la interacció amb la molècula del receptor CD4), sofreix una sèrie de canvis conformacionals que li permeten superar aquesta barrera energètica, un procés imprescindible perquè tingui lloc la fusió. En el cas del virus de la grip, les subunitats HA<sub>1</sub> perden els seus contactes amb les altres subunitats d'HA<sub>1</sub>, passant a formar una estructura menys compacte (Huang *i col.*, 2003). Un cop l'estructura ha sofert aquest canvi conformacional, el pèptid de fusió queda exposat al medi, es mou fins a l'extrem oposat del seu lloc inicial i interacciona amb la membrana endosomal de la cèl·lula hoste.

En el cas del VIH, la unió amb el receptor CD4 per part de la proteïna gp120, provoca canvis conformacionals en aquesta última que li permeten interaccionar amb els co-receptors. A continuació aquests canvis conformacionals es transmeten també a la proteïna gp41, debilitant-se les interaccions entre aquestes dues subunitats. Un cop produïts aquests canvis conformacionals, l'intermediari de la preforquilla format interacciona amb la membrana de la cèl·lula hoste a través del pèptid de fusió exposant-se la regió on s'uneixen els pèptids C. A diferència del que s'ha

descriu per al virus de la grip, es desconeix si en el cas del VIH l'activació segueix el mecanisme de la molla carregada exposat anteriorment o bé si el pèptid de fusió es manté en la mateixa posició que en l'estat inactiu i simplement queda el descobert degut al moviment de la subunitat gp120.

Un cop el pèptid de fusió ha interaccionat amb la membrana de la cèl·lula hoste, la proteïna transmembrana sofreix un canvi conformacional lent formant-se la forquilla trimèrica fusogènica. Aquesta estructura és extremadament estable i presumiblement representa la forma més favorable termodinàmicament. La transició des de l'estat metastable a la forma termodinàmicament més favorable aproxima les dues membranes que s'han de fusionar. És probable que l'energia que es guanya en la formació d'aquest estat més estable serveixi per superar la barrera energètica que suposa la fusió de dues membranes. Sembla també probable que per mantenir les dues membranes suficientment pròximes i mantenir-les en contacte, la subunitat transmembrana hagi de sofrir un canvi que la mantingui paral·lela a la superfície de la membrana. Aquest fet explicaria perquè els dos extrems de la subunitat transmembrana es localitzen al mateix extrem de la molècula en l'estructura cristal·logràfica.



**Figura I.12.** Model de fusió de membranes de la molla carregada (*Spring-Load Mechanism*) induïda per la proteïna gp41 del VIH. Inicialment la proteïna gp41 i gp120 estarien unides mitjançant interaccions de tipus feble en l'estat natiu. Un cop produïda la interacció amb el receptor CD4 i el co-receptor, la gp120 sofreix un canvi conformacional ràpid que es transmet a la proteïna gp41 formant-se l'intermediari de pre-forquilla. És en aquest moment que els pèptids C podrien interaccionar amb la regió NHR inhibint-se la fusió. Seguidament la gp41 sofreix un canvi conformacional lent formant-se l'estat de forquilla trimèrica i donant lloc a la fusió de membranes [modificat de (Chan i Kim, 1998)].

#### *1. 4. 2. vi) Altres Proteïnes de Fusió de Membranes*

##### *1. 4. 2. vi. a Proteïnes de Fusió d'Altres Virus amb Envolt*

Durant els darrers anys s'han resolt les estructures cristal·logràfiques de proteïnes de fusió virals d'altres famílies víriques, com per exemple proteïnes de la família *Orthomixoviridae* (Bullough *i col.*, 1994; Chen *i col.*, 1999), *Retroviridae* (Caffrey *i col.*, 1998; Chan *i col.*, 1997; Tan *i col.*, 1997; Weissenhorn *i col.*, 1997), *Paramixoviridae* (Baker *i col.*, 1999; Zhao *i col.*, 2000) i *Filoviridae* (Malashkevich *i col.*, 1999) (*Figura 1.13 A-D*). La característica comú que presenten totes aquestes proteïnes és el fet que formen una forquilla trimèrica, igual que la descrita anteriorment per al virus de la grip i per al VIH. Degut a aquest fet, és probable que comparteixin un mecanisme de fusió comú totes elles. A més, s'ha descrit mitjançant mètodes computacionals que altres proteïnes de fusió virals per a les que encara no ha estat resolta la seva estructura cristal·logràfica, també formarien hèlixs superenrotllades.

##### *1. 4. 2. vi. b Proteïnes de Fusió de Vesícules Sinàptiques*

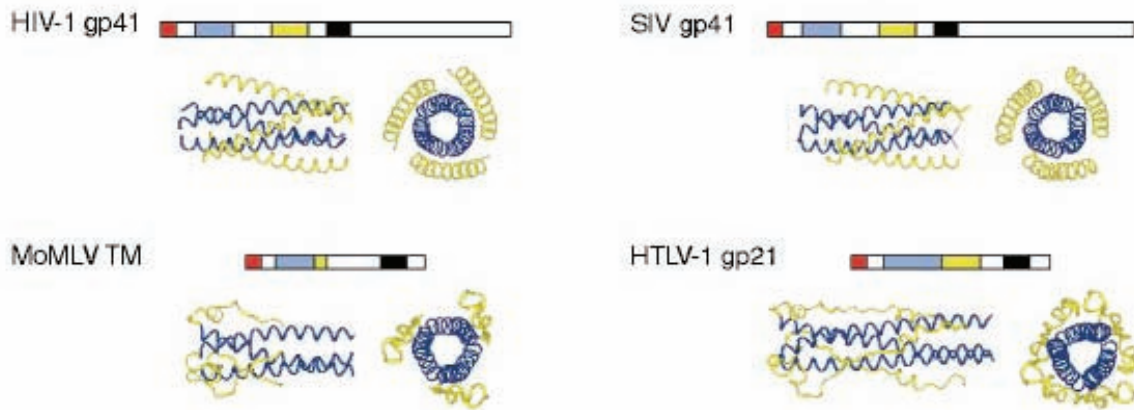
El motiu de forquilla trimèrica s'ha suggerit que podria ser el motiu comú de la fusió de membranes. Aquest, ha estat descrit en altres processos en els que es produeix fusió de membranes.

Un d'aquests processos en que ha estat descrit el motiu de forquilla trimèrica és el cas de les vesícules sinàptiques. Aquestes vesícules durant la transmissió sinàptica es fusionen amb la membrana plasmàtica de les neurones alliberant els neurotransmissors que contenen a l'espai extracel·lular. En aquest procés de sinapsi intervenen unes proteïnes anomenades SNAREs, localitzades tant a la membrana de les vesícules sinàptiques com a la membrana neuronal. Les dades cristal·logràfiques (*Figura 1.13 E*) suggereixen que les proteïnes SNAREs de la membrana de la vesícula sinàptica (sinaptovrebina) i la membrana neuronal (syntaxina i SNAP-25) s'associen per donar lloc a una estructura de forquilla trimèrica que seria la responsable de la fusió (Sutton *i col.*, 1998).



Altres mecanismes cel·lulars en els que es produeix fusió de membranes són el procés de fertilització de l'òocit o de la fusió de mitocondris, per als quals també s'ha proposat la formació d'estructures d'hèlix superenrotllades.

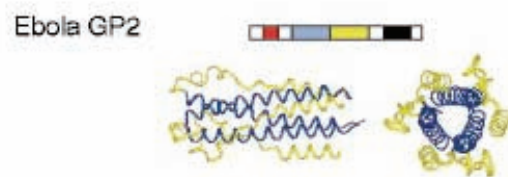
### A) Retrovirus



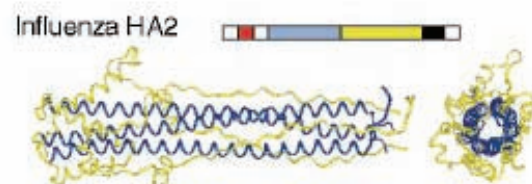
### B) Paramixovirus



### C) Filovirus



### D) Orthomixovirus



### E) Vesícules de fusió sinàptiques/SNAREs



**Figura I.13.** Forquilles trimèriques corresponents a les subunitats transmembrana de diferents glicoproteïnes de fusió virals i de l'hèlix superenrotllada formada per les partícules de fusió sinàptiques. Les proteïnes estan representades aproximadament a la mateixa escala. En vermell es simbolitza el pèptid de fusió, la regió N en blau, la regió C en groc i finalment la regió transmembrana en negre [modificat de (Eckert i Kim, 2001)].

### **I. 5. El Pèptid de Fusió del VIH**

Els pèptids de fusió són fragments molt hidrofòbics de les proteïnes de fusió víriques que els permeten fusionar dues membranes oposades. La seqüència dels pèptids de fusió es troba altament conservada dins dels diferents grups de proteïnes de fusió (Bosch *i col.*, 1989). Aquesta similitud és molt elevada dins de les diferents famílies víriques però no entre pèptids de fusió de famílies víriques diferents. La majoria d'aquests pèptids es troben localitzats a l'extrem amino terminal, tot i que en alguns casos, com en el de les proteïnes de fusió víriques de classe II, aquest pèptid de fusió es localitza a una regió interna de la proteïna (Peisajovich i Shai, 2002).

La importància d'aquest pèptid en la fusió de membranes s'ha establert mitjançant estudis de mutagènesi en els que la deleció del pèptid de fusió o mutacions puntuals en determinats residus d'aquest pèptid, suprimeixen la infecció de les cèl·lules, mantenint-se intactes altres propietats estructurals i funcionals de les proteïnes (Delahunty *i col.*, 1996; Freed *i col.*, 1992; Freed *i col.*, 1990). És per aquest motiu que es va iniciar l'estudi dels pèptids de fusió durant el mecanisme de fusió de membranes.

La majoria de treballs sobre l'estructura i la funció dels pèptids de fusió s'han realitzat amb pèptids de fusió derivats de la proteïna l'HA<sub>2</sub> del virus de la grip, i de la proteïna gp41 del VIH-1, tot i que també existeixen multitud de treballs referents als pèptids de fusió de les proteïnes de fusió víriques de classe II (Ghosh *i col.*, 2000; Larios *i col.*, 2005a; Larios *i col.*, 2005b; Peisajovich *i col.*, 2000b). Les seqüències consens d'aquestes dues famílies de pèptids de fusió virals mostren que els dos pèptids són molt hidrofòbics en el seu extrem amino terminal, però en canvi en el seu extrem carboxi terminal contenen un cert nombre de residus polars. El pèptid de fusió del virus de la grip té uns 24 residus de longitud mentre que el pèptid de fusió del VIH-1 en té uns 30.

Influenza A: GLFgAiAGFiENGWeGMldgWYGF  
 VIH-1: avgigalFLGFLGAAGSTMGAaSmtLTvQA

**Figura I.14.** Seqüències consens derivades de la proteïna HA<sub>2</sub> del virus de la grip i de la proteïna gp41 del VIH. En majúscules es representen els residus conservats [extret de (Tamm i Han, 2000)].

Tal i com es mostra en aquesta figura (*Figura 1.14*), els pèptids de fusió de les dues famílies contenen un elevat nombre de residus de glicina. El pèptid de fusió del VIH-1, a més, també conté un percentatge elevat i inusual de residus d'alanina. Aquest elevat contingut de residus de glicina i d'alanina fa que aquests pèptids siguin molt flexibles i conformacionalment polimòrfics. És ben conegut que les glicines són residus trencadors d'hèlixs i que les alanines tenen més tendència a formar estructures helicoïdals en proteïnes solubles (Chou i Fasman, 1978) que en proteïnes de membrana (Li i Deber, 1994). De fet, pèptids model basats en alanines formen preferentment fulles  $\beta$  que no pas hèlixs  $\alpha$  en membranes (Chung i Thompson, 1996). En canvi, quan aquests pèptids són modelats com a hèlix  $\alpha$ , formen hèlixs amfipàtiques amb els residus de fenilalanines encarats cap a la part hidrofòbica de la membrana (Tamm i Han, 2000).

### *1.5.1. Estudis Previs del Pèptid de Fusió del la Proteïna gp41 del VIH*

Per estudiar l'estructura i la funció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH quan interacciona amb membranes, s'han realitzat bàsicament aproximacions utilitzant pèptids sintètics i liposomes com a model de membranes. Des del primer treball de Rafalski i col. (1990) sobre l'estudi de la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH-1 amb membranes model s'han realitzat multitud d'estudis referents a aquest tema. Bàsicament els estudis estructurals s'han realitzat mitjançant espectroscòpia d'IR, ja sigui per FTIR de transmissió o per Reflexió Total Atenuada (ATR-FTIR), encara que també s'ha estudiat la seva estructura mitjançant Dicroisme Circular (CD) o Ressonància Magnètica Nuclear (NMR). Finalment, la seva estructura també ha estat estudiada mitjançant mètodes computacionals. D'altra banda, els estudis funcionals s'han realitzat mitjançant diferents espectroscòpies, ja sigui de fluorescència o d'Ultraviolat-Visible (UV-Vis) estudiant l'agregació de liposomes i mesurant la dispersió de la llum en la regió del visible o bé l'alliberament de continguts intraliposomals al medi o la barreja de lípids mitjançant la utilització de sondes fluorescents específiques.

Principalment s'han utilitzat 3 tipus diferents d'aproximacions pel que fa als pèptids: en la primera s'ha utilitzat la part més hidrofòbica del pèptid de fusió, és a dir, els 16 primers residus. Aquests experiments han estat duts a terme bàsicament pel grup del Professor Ruyschaert de la Universitat Lliure de Brusel·les (Martin i

*col.*, 1993a; Martin i Ruyschaert, 1995; Martin *i col.*, 1996). En el segon cas, s'ha estudiat el pèptid de 23 residus, bàsicament pel grup del Professor Nieva de la Universitat del País Basc (Nieva *i col.*, 1994; Pereira *i col.*, 1995; Pereira *i col.*, 1997b; Sáez-Cirió i Nieva, 2002), i més recentment pel grup del Professor Weliky de la Universitat Estatal de Michigan (Yang *i col.*, 2001; Yang *i col.*, 2004; Yang i Weliky, 2003). En la tercera aproximació s'ha estudiat el pèptid de 33 residus de longitud, bàsicament en col·laboració entre els grups del Professor Blumenthal i del Professor Shai del Centre de Recerca del Càncer del NIH i de l'Institut Weizmann d'Israel, respectivament (Gerber *i col.*, 2004; Kliger *i col.*, 1997; Peisajovich *i col.*, 2003; Peisajovich *i col.*, 2000a; Pritsker *i col.*, 1998; Sackett i Shai, 2003; Sackett i Shai, 2005; Shnaper *i col.*, 2004).

Un dels principals problemes que hom troba en revisar la bibliografia són les grans diferències entre els esmentats treballs, ja sigui en les tècniques emprades per a realitzar els experiments, així com en la composició lipídica dels liposomes utilitzats en cadascun dels experiments. Aquestes dues diferències presents a la literatura, juntament amb la diferent longitud del pèptid de fusió emprat pels diferents grups, ha fet gairebé impossible extreure una conclusió clara sobre quina és l'estructura que adopta el pèptid de fusió durant la fusió de membranes o quina és l'estructura que desencadena aquest procés. Aquestes diferències presents a la literatura es resumeixen a continuació:

1. Llargada del pèptid de fusió.
2. Composició lipídica emprada per a formar els liposomes entre els diferents treballs.
3. Tècnica utilitzada per determinar l'estructura secundària.
4. Divergència en la concentració tant de liposomes com de pèptid de fusió entre els experiments funcionals i estructurals.
5. Presència/absència de cations divalents.
6. Preparació de la mostra.

### *1. 5. 1. i) Estructura Secundària i Orientació del Pèptid de Fusió*

L'estructura secundària dels diferents pèptids de fusió ha estat determinada mitjançant CD i FTIR. És important remarcar que amb aquestes dues tècniques s'han obtingut resultats molt diferents. Això pot ser degut a les pròpies característiques de cada tècnica. En el cas del CD, els experiments es realitzen amb els pèptids de fusió barrejats amb liposomes unilamel·lars petits (SUVs) a una baixa concentració de liposomes per evitar els problemes de dispersió de llum inherents a la tècnica. Per tal d'evitar el problema de la baixa concentració de liposomes, una tècnica molt utilitzada és l'espectroscòpia d'IR, ja que permet estudiar alhora tant l'estructura del pèptid de fusió com l'estructura dels lípids de la mostra. Dins d'aquesta espectroscòpia existeixen dues variants: l'ATR-FTIR i la FTIR de transmissió. En el primer cas, es disposa un film de liposomes sobre un cristall d'ATR i s'asseca la mostra. Aquesta tècnica permet estudiar tant l'estructura secundària del pèptid de fusió com la seva orientació utilitzant la radiació d'IR polaritzada. Els resultats obtinguts amb aquesta tècnica varien enormement depenent de si els pèptids de fusió es disposen en el cristall a partir de dissolvents orgànics, o bé si es disposen a partir de solucions aquoses. Finalment, també cal tenir en compte l'estat d'hidratació del film, ja que els resultats poden variar segons si el film està submergit en tampó aquós, si està parcialment hidratat o si està totalment sec. D'altra banda l'espectroscòpia d'IR de transmissió permet estudiar l'estructura del pèptid de fusió quan interacciona amb membranes model en suspensió aquosa.

La literatura existent sobre l'estructura secundària i l'orientació dels pèptids de fusió derivats de la proteïna gp41 del VIH-1 és complexa i en alguns casos es poden trobar resultats contradictoris. Així doncs, el pèptid de fusió de 33 residus del VIH (**FP33**) dissolt inicialment en metanol i barrejat amb membranes de POPG o POPC presenta una estructura d'hèlix  $\alpha$  i fulla  $\beta$  (Pritsker *i col.*, 1999). Un altre estudi, en canvi, mostra que aquest mateix pèptid presenta un 50% de fulla  $\beta$  i només un 32% d'hèlix  $\alpha$  en membranes formades de DOPC/DOPE/COL (1:1:1) (Peisajovich *i col.*, 2000a). Altres treballs, realitzats al laboratori del Professor Shai en col·laboració amb el laboratori del Professor Blumenthal, conclouen que el FP33 s'estructura principalment en forma de fulla agregada  $\beta$  i només una petita part s'estructura en forma d'hèlix  $\alpha$  (Gerber *i col.*, 2004; Kliger *i col.*, 1997; Peisajovich *i col.*, 2003;

Shnaper *i col.*, 2004). Finalment, determinats estudis realitzats amb un pèptid que inclou la regió del pèptid de fusió i una regió adjacent corresponent a la primera repetició en tàndem (NHR) de la proteïna gp41, formant-se un pèptid amb una longitud de 70 residus, mostra que aquest pèptid més llarg s'estructura principalment en forma helicoïdal però amb una petita proporció d'estructura  $\beta$ , que correspondria, segons els autors i basant-se en resultats propis anteriors, al pèptid de fusió (Peisajovich *i col.*, 2003; Sackett i Shai, 2003). Recentment, els mateixos autors han publicat un treball segons el qual es demostra que els 16 primers residus del pèptid de fusió FP33, adopten una estructura de fulla  $\beta$  paral·lela intermolecular quan interacciona amb membranes, mitjançant FTIR i la tècnica de substitució isotòpica del  $^{13}\text{C}$  (Sackett i Shai, 2005).

Diferents estudis amb el pèptid de fusió del VIH-1 de 23 residus (**FP23**) van mostrar que aquest pèptid presentava una estructura secundària predominantment helicoïdal quan es trobava unit a membranes a una relació molar 200:1 de lípid respecte de pèptid, però que aquest mateix pèptid presentava una estructura predominantment de fulla  $\beta$  a una relació molar 30:1 de lípid respecte de pèptid (Rafalski *i col.*, 1990). D'altra banda, el laboratori del Professor Nieva va observar que aquest mateix pèptid experimenta un canvi des d'una estructura helicoïdal a una estructura de fulla  $\beta$  depenent de la concentració de pèptid i de la presència o absència de cations  $\text{Ca}^{2+}$  (Nieva *i col.*, 1994; Pereira *i col.*, 1997a; Pereira *i col.*, 1995; Pereira *i col.*, 1997b; Sáez-Cirió i Nieva, 2002). En canvi, els dos grups no coincideixen en quina és l'estructura rellevant per a la fusió: mentre que Rafalski *i col.* (1990) argumenten que a baixes concentracions el pèptid adopta una estructura helicoïdal que ja és suficient per promoure la fusió, el grup del Professor Nieva proposa que la formació de la fulla  $\beta$  és imprescindible per què tingui lloc la fusió i que l'estructura secundària helicoïdal del FP23 a baixes concentracions tan sols indueix la formació de porus en la bicapa. A més, el grup del Professor Weliky, mitjançant diferents treballs sobre l'estudi del FP23 utilitzant ss-NMR, conclou que aquest pèptid, quan interacciona amb membranes, presenta una estructura de fulla  $\beta$  oligomèrica (Yang *i col.*, 2001; Yang *i col.*, 2004; Yang i Weliky, 2003). D'altra banda, el grup dels Professors Gordon i Mobley, per aquest mateix pèptid FP23 dissolt en HFIP o TFE, conclou que presenta una estructura helicoïdal quan interacciona amb membranes o amb micel·les de SDS (Gordon *i col.*, 1992; Gordon *i col.*, 2004;

Gordon *i col.*, 2002; Mobley *i col.*, 1999). En aquest punt és important mencionar que el pèptid de fusió es troba inicialment dissolt en HFIP o en TFE, i que tant aquests alcohols halogenats com el SDS són potenciadors d'estructures helicoïdals (Dwyer, 1999), de manera que dissoldre el pèptid en aquests tipus de solvents podria bloquejar el pèptid en una estructura helicoïdal.

Finalment, el grup del Professor Ruyschaert, (Martin *i col.*, 1993a; Martin i Ruyschaert, 1995; Martin *i col.*, 1996), mitjançant ATR-FTIR, va determinar que el pèptid de fusió de 16 residus del VIH (**FP16**) adopta una estructura d'hèlix  $\alpha$  quan interacciona amb membranes model i que s'insereix a membranes model formades de PC/PE (1:1) d'una forma obliqua. Una altra vegada, les concentracions entre els experiments de barreja de lípids, indicatius de la fusió, i de l'anàlisi de l'estructura secundària es troben molt allunyades l'una de l'altra. Per exemple, la relació molar lípid/pèptid emprada per als estudis estructurals és 200 a 1 mentre que la relació molar lípid/pèptid utilitzada per als experiments de barreja de lípids és de 25 a 1. A més, estudis de dinàmica molecular han mostrat que el FP16 s'estructura en forma d'hèlix  $\alpha$  i que s'insereix a la membrana de manera obliqua amb un angle de  $44^\circ \pm 6^\circ$  respecte a la superfície de la membrana (Kamath i Wong, 2002) coincidint amb els resultats descrits anteriorment pel grup del Professor Ruyschaert. En canvi, Peisajovich i col. (2000a) determinaren que aquest mateix pèptid FP16 presenta un 76% de fulla  $\beta$  i només un 25% d'hèlix  $\alpha$  en membranes de DOPC/DOPE/COL (1:1:1) a una relació molar de lípid respecte de pèptid de 100 a 1. Altres autors (Sackett i Shai, 2003; Sackett i Shai, 2005) han demostrat mitjançant ATR-FTIR i marcant els pèptids amb  $^{13}\text{C}$ , que el FP16 adopta una estructura  $\beta$  paral·lela quan interacciona amb membranes i que aquesta estructura es troba estabilitzada per una regió adjacent a aquest pèptid de 16 residus. En aquests experiments, però, no presenten cap prova funcional per tal de correlacionar l'estructura del FP16 amb la seva funció, ja sigui mitjançant experiments d'alliberament de continguts intraliposomals o de barreja de lípids.

Finalment, degut a aquesta gran variabilitat en les condicions experimentals dels diferents treballs i a la diferent longitud dels pèptids de fusió emprats, resulta gairebé impossible extreure conclusions clares també sobre altres processos en els quals intervé el pèptid de fusió i que s'estudien en els treballs, com pot ser per exemple, la fusió de membranes mitjançant els estudis de barreja de lípids.

*1. 5. 1. ii) Influència del Colesterol i de la Composició Lipídica de les Membranes Model*

Un factor que cal tenir en compte, tant a l'hora d'estudiar la interacció del pèptid de fusió amb membranes model com de mesurar la fusió o d'altres processos provocats per aquest, és la composició lipídica de les membranes model utilitzades en els diferents tipus d'experiments.

Com ja s'ha comentat anteriorment durant la Introducció, l'envolta lipídica del VIH prové de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste; per tant caldria esperar que la composició de lipídica de la seva envolta fos molt similar a la composició lipídica de la membrana plasmàtica d'aquesta cèl·lula.

Estudis realitzats per Aloia i col. (1988; 1993) sobre la composició lipídica i la fluïdesa de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste i de l'envolta lipídica viral van revelar que aquesta última presentava una elevada relació colesterol/fosfolípid (C/P); sent aquestes composicions les que es mostren a la següent taula (*Taula 2*):

Lípid	Composició lipídica, mol%				
	Membrana plasmàtica H9			Virus	
	no infectades	infectades amb VIH-1	infectades amb VIH-2	VIH-1	VIH-2
PC	47.55	50.51	50.48	29.85	27.57
PE	23.34	24.87	24.45	24.58	27.26
SM	9.64	7.14	8.26	24.06	22.97
PI	4.87	4.72	5.50	0.42	1.14
PS	10.26	6.36	6.34	9.02	15.50
PA	0.59	0.33	0.47	1.21	1.21
Altres	3.44	6.07	4.49	8.25	4.81
Recuperat	97.70	100.17	99.69	97.40	96.13
Relació C/P (n = 2)	0.476	0.371	0.343	0.958	0.876

**Taula 2.** Composició lipídica de la membrana plasmàtica de cèl·lules infectades pels virus VIH-1 i VIH-2, així com la composició lipídica de l'envolta viral dels mateixos [modificat de (Aloia i col., 1993)].



A part de l'elevada relació C/P, també es va constatar que l'envolta lipídica conté diferents tipus de fosfolípids, dels quals l'esfingomielina és un component molt important. Aquesta determinada composició lipídica i l'elevada relació C/P esmentada és característica dels microdominis de membrana anomenats *rafts* lipídics.

Els resultats sobre la composició lipídica de l'envolta viral del VIH i de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste suggerien que el VIH podria entrar i/o sortir de la cèl·lula per aquestes zones concretes de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste, tal i com es va demostrar en estudis posteriors. En un d'aquests estudis es va observar que el colesterol era necessari per a la infecció de cèl·lules per part del VIH, ja que si tractaven aquestes amb  $\beta$  ciclodextrina (un agent segrestador del colesterol de les membranes, de manera que els microdominis de membrana desapareixien), s'inhibia la infecció sense que es veiés afectada l'expressió de les proteïnes de l'envolta viral. A més, quan s'afegia colesterol extern, recuperant-se els nivells d'aquesta molècula a la membrana, el VIH podia infectar novament aquestes cèl·lules (Liao *i col.*, 2001; Viard *i col.*, 2002). Un estudi posterior va demostrar que la infecció del VIH provocava una reorganització lateral dels components de la membrana indicant, que un cop la infecció s'ha produït, es produeix una redistribució i un agrupament d'aquests microdominis de membrana permetent, segurament, la posterior interacció amb els co-receptors (Manes *i col.*, 2000).

Tot i aquestes evidències, la literatura existent sobre l'efecte del colesterol en la interacció del pèptid de fusió amb membranes model és minsa. Únicament existeix un treball amb el FP33 del VIH suggerint que la presència de colesterol disminueix la fusió induïda pel pèptid corresponent a l'extrem amino terminal (corresponent al *heptad repeat A*), mentre que la presència de colesterol afavoreix la fusió de membranes induïda pel pèptid corresponent l'extrem carboxi terminal (corresponent al *heptad repeat B*) (Shnaper *i col.*, 2004). En aquest treball es presenta també l'estructura secundària del pèptid de fusió, el qual presenta una estructura  $\beta$  agregada en presència de membranes model formades de PC/COL/SM (1:1:1).

Altres estudis presents a la literatura, tant del FP23 com del FP16, no discuteixen la composició lipídica de les membranes ni el paper que podria jugar en l'estructura del pèptid de fusió o en la seva funció. Fins i tot, existeixen treballs en els que els experiments funcionals i els estudis estructurals han estat realitzats amb

composicions lipídiques diferents (Gordon *i col.*, 1992). Existeix un treball realitzat amb el FP23 en el qual s'intenta mimetitzar la composició lipídica de l'envolta vírica. En aquest estudi i mitjançant ss-NMR van observar que el FP23 està formant una estructura  $\beta$  oligomèrica (Yang *i col.*, 2001; Yang i Weliky, 2003).

Per tant, quan es revisa la literatura sobre la influència de colesterol o de la composició lipídica en la interacció del pèptid de fusió amb membranes model un altre cop es fa molt difícil extreure'n conclusions degut a la gran varietat de condicions utilitzades tant en les seqüències emprades com en les tècniques utilitzades.

#### *1. 5. 1. iii) Influència del Potencial Dipolar de Membrana*

El colesterol, d'altra banda, pot afectar a un paràmetre físic de les membranes biològiques: el potencial dipolar de membrana. La influència d'aquest potencial en la interacció del pèptid de fusió del VIH amb membranes model no ha estat exhaustivament estudiada. L'únic estudi fins al moment sobre la influència del potencial dipolar de membrana en la interacció de pèptids de fusió vírics ha estat portat a terme per Cladera *i col.* (1999). En aquest treball s'estudia la interacció del pèptid de fusió del Virus de la Immunodeficiència de Simi (VIS) amb membranes model. Aquest pèptid està format per 12 residus corresponents a l'extrem amino terminal de la proteïna gp32 d'aquest virus, la qual seria la proteïna homòloga a la proteïna gp41 del VIH. El treball demostra que la interacció del pèptid de fusió amb la bicapa lipídica pot estar afectada pel potencial dipolar. A més, en aquest treball es descriu que la interacció del pèptid de fusió amb membranes model causa una disminució del potencial dipolar. Aquesta disminució es va mesurar en forma de mínim a 450 nm i màxim a 520 nm a l'espectre de diferència de la sonda Di-8-ANEPPS, coincidint amb l'espectre de diferència originat per molècules que disminueixen el potencial dipolar, com és el cas de la floretina (Franklin i Cafiso, 1993). La importància de la modificació del potencial dipolar per part del pèptid de fusió va quedar demostrada en estudiar l'extensió del procés de fusió en funció de la magnitud del potencial (Cladera *i col.*, 1999). En aquest treball, la variació de la magnitud del potencial dipolar de membrana s'aconseguí afegint a les membranes 6-KC i floretina, els quals augmenten i disminueixen respectivament el potencial dipolar. Els resultats de la mesura de fusió de les bicapes mitjançant transferència

d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) posà de manifest que l'augment del potencial dipolar de membrana, incrementa l'extensió de la barreja de lípids.

**Objectius**

## II. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat la caracterització molecular de la seqüència d'esdeveniments moleculars que porten a la fusió de membranes quan el pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH interacciona amb membranes model. L'assoliment d'aquest objectiu general s'ha plantejat a través dels següents objectius específics:

1. La determinació dels paràmetres cinètics i termodinàmics del procés d'unió dels diferents pèptids de fusió a les membranes model, mitjançant espectroscòpia de fluorescència, utilitzant la sonda fluorescent FPE.
2. La determinació de l'extensió i la cinètica del procés de fusió de membranes induïda per aquests pèptids de fusió, mitjançant espectroscòpia de fluorescència, utilitzant les sondes fluorescentes NBD-PE/Rh-PE.
3. La determinació de l'efecte desestabilitzador dels pèptids de fusió sobre l'estructura de la bicapa lipídica, mitjançant espectroscòpia de fluorescència, utilitzant les sondes fluorescentes ANTS/DPX o CF.
4. La determinació de l'agregació dels LUVs deguda a la interacció amb els pèptids de fusió així com la determinació de la seva mida, mitjançant espectroscòpia UV-Vis.
5. La determinació dels canvis conformacionals, i de manera especial la cinètica d'aquests canvis, associats a la unió dels pèptids de fusió amb membranes i a la fusió posterior d'aquestes, mitjançant FTIR.
6. La determinació de la influència del colesterol i del potencial dipolar de membrana en la interacció dels pèptids de fusió amb membranes model.
7. L'estudi de la morfologia dels complexos pèptid-membrana durant el procés de fusió mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (MET).



# **Mètodes Experimentals**

### III. MÈTODES EXPERIMENTALS

#### III. 1. Materials Utilitzats

La L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (PC) i la L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina (PE) d'ou es van comprar a Avanti Polar Lipids. El colesterol (COL), el 6-cetocolestanol (6-KC), el Triton X-100 reduït (TX100), la tioflavina T (ThT) i la 5-carboxifluoresceïna (CF) es van obtenir de Sigma. El dimetilsulfòxid deuterat (DMSO) es va obtenir de Merck. Les diferents sondes fluorescents, fluoresceïnafosfatidiletanolamina (FPE), N-(lissamina rhodamina B sulfonil) fosfatidiletanolamina (Rh-PE), N-(nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) fosfatidiletanolamina (NBD-PE), betaïna 1-(3-sulfonatopropil)-4-[ $\beta$ [2-(di-*n*-octilamino)-6-naftil]vinil] piridina (Di-8-ANEPPS), sal sòdica d'àcid 8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic (ANTS) i bromat *p*-xilè-bis-piridina (DPX) es van comprar a Molecular Probes. Les columnes desaladores pD 10 de Sephadex<sup>®</sup> G-25 es van comprar a Amersham Biosciences.



### III. 2. Pèptids de Fusió

Els pèptids de fusió emprats en el present treball (*Taula 3*) van ser sintetitzats per Jerini Peptide Technologies utilitzant ió clorur com a contraió. Aquest fet és molt important perquè en una de les etapes de la síntesi de pèptids es requereix la utilització d'àcid trifluoroacètic (TFA) com a contraió. Aquesta substància presenta una gran absorció a  $1674\text{ cm}^{-1}$  de la regió de l'espectre d'IR, la qual cosa dificulta l'anàlisi de la regió de l'espectre corresponent a l'amida I en la que es localitzen les vibracions dels enllaços corresponents a les diferents estructures secundàries.

La puresa dels pèptids va ser sempre superior al 90%, determinada mitjançant espectrometria de masses i HPLC. Les solucions mare dels pèptids de fusió es van preparar en DMSO deuterat.

---

#### Pèptids de fusió utilitzats

---

FP16	<b>H-AVGIGALFLGFLGAAG-CONH<sub>2</sub></b>
FP23-Ac	<b>Ac-AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-CONH<sub>2</sub></b>
FP23-H	<b>H-AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-CONH<sub>2</sub></b>
FP33	<b>H-AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARSMTLTVQARQL-CONH<sub>2</sub></b>

---

**Taula 3.** Pèptids de fusió utilitzats.

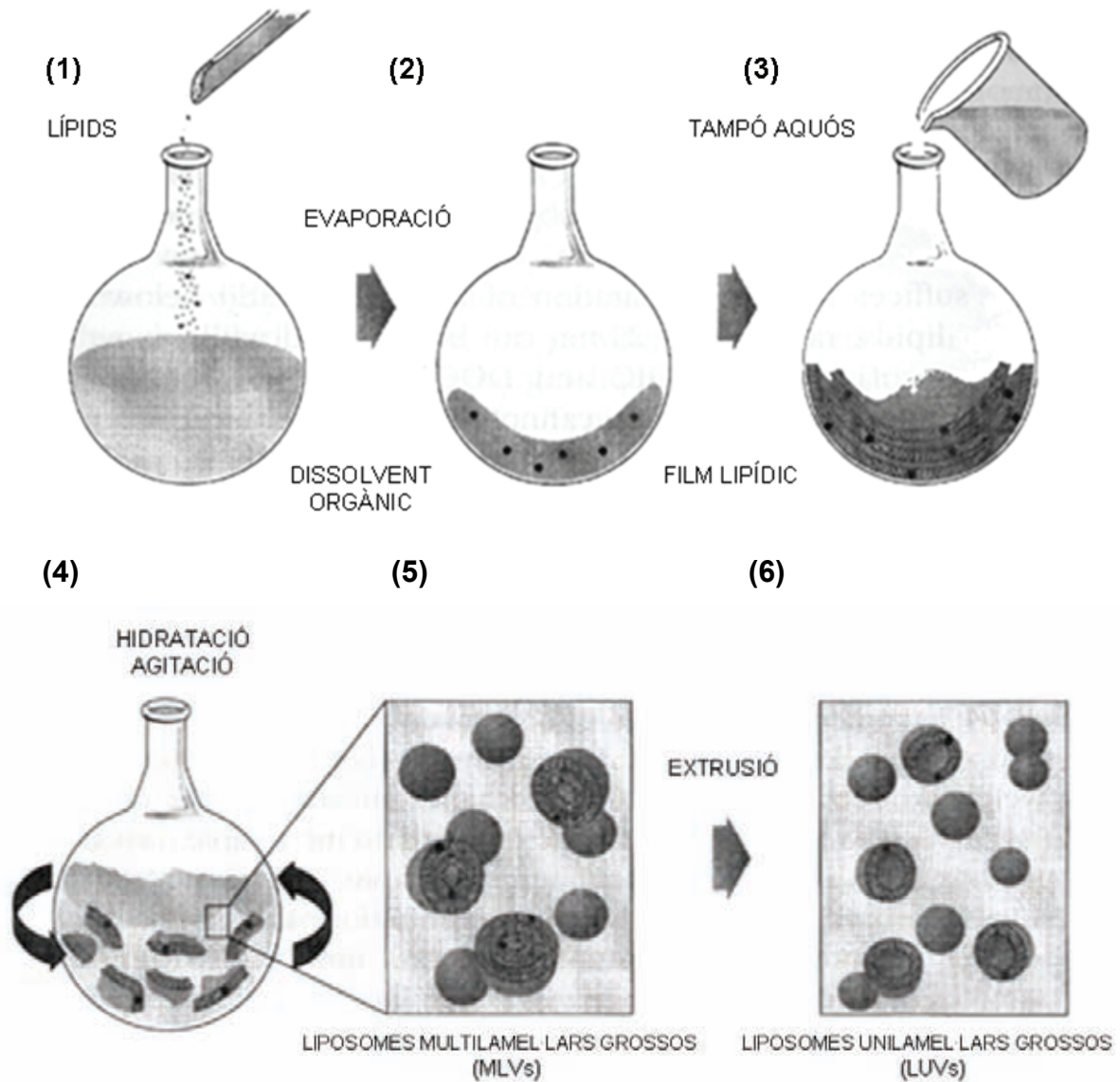
### **III. 3. Preparació de Liposomes Unilamel·lars Grossos (LUVs)**

#### **III. 3. 1. Preparació de LUVs**

La preparació dels LUVs es portà a terme segons el mètode desenvolupat per Mayer i col. (1986) el qual està basat en la realització de cicles de congelació/descongelació de la suspensió lipídica i la seva posterior extrusió a través de membranes de policarbonat amb uns porus de diàmetre definit.

En un baló es va afegir el volum necessari de cadascun dels lípids seleccionats per formar els liposomes dissolts en cloroform, o de 6-KC també dissolt en cloroform per tal d'obtenir una concentració final de lípid de  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  **(1)**. Aleshores, es va evaporar el cloroform aplicant un corrent suau de  $\text{N}_{2(g)}$  fins a formar un film homogeni de lípids al fons del baló **(2)**. Un cop format el film lipídic, aquest es va resuspendre en tampó [10 mM TRIS pH 7.5 per als experiments de fluorescència (exceptuant els experiments de permeabilitat de membranes) o 10 mM HEPES pD 7.5 per als experiments d'espectroscòpia d'IR] amb l'ajuda d'un vòrtex **(3)**. En aquest punt la suspensió presenta un aspecte lletós degut a la formació de liposomes multilamel·lars grossos (MLVs) **(4)**. Després es van realitzar 5 cicles de congelació/descongelació utilitzant  $\text{N}_{2(l)}$  i aigua calenta alternativament. Un cop realitzats aquests cicles de congelació/descongelació la suspensió presenta un aspecte menys lletós però encara opac **(5)**. Finalment, la suspensió es va fer passar 10 vegades a través de 2 membranes de policarbonat (Armatis), amb un diàmetre de porus de 100 nm mitjançant un extrusionador (Liposofast, Avestin) **(6)**. La suspensió lipídica després de l'extrusió presenta un aspecte translúcid, la qual cosa és indicativa de la formació de liposomes unilamel·lars amb un diàmetre menor. Els LUVs es van guardar a 4°C abans a la seva utilització en una atmosfera lliure d'oxigen per tal d'evitar la seva oxidació.

La *Figura III.1* representa els diferents passos del procés de preparació dels LUVs numerats anteriorment en el text.

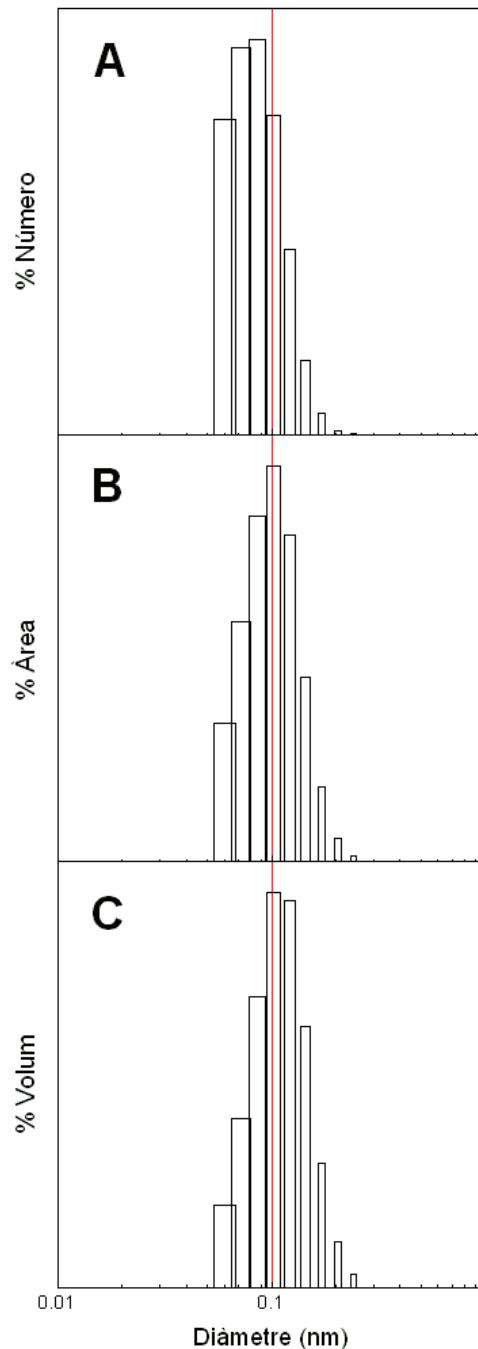


**Figura III.1.** Representació esquemàtica de la preparació dels LUVs, mostrant les diferents etapes descrites en el text.

### III. 3. 2. Determinació de la Mida dels LUVs

La determinació de la mida dels LUVs es va portar a terme amb un analitzador de partícules Microtrack UPA 150 a 20°C. Els LUVs a una concentració de 10 mg·ml<sup>-1</sup>, es van diluir amb tampó 10 mM TRIS pH 7.5 fins a una concentració que proporcionà un índex de càrrega de l'aparell situat entre 0.1 i 0.2 (paràmetre que determina el nivell de senyal del detector). El temps de lectura va ser de 10 minuts. La resta de paràmetres van ser fixats segons Barnadas (1999).

Els LUVs formats de PC/PE (relació molar 1 a 1) extrusionats a través de 2 membranes de policarbonat amb un diàmetre de porus de 100 nm van ser analitzats per un mètode de dispersió de la llum per tal de comprovar la seva mida. La *Figura III.2* mostra com els LUVs preparats mitjançant aquest mètode presenten un diàmetre centrat al voltant dels 100 nm i amb molt poca dispersió. Els resultats es van expressar en % de nombre, % d'àrea i % de volum.



**Figura III.2.** Distribució de mida dels LUVs. **(A)** En funció del nombre. **(B)** En funció de l'àrea. **(C)** En funció del volum.

### III. 4. Espectroscòpia de Fluorescència

#### III. 4. 1. Fonaments teòrics

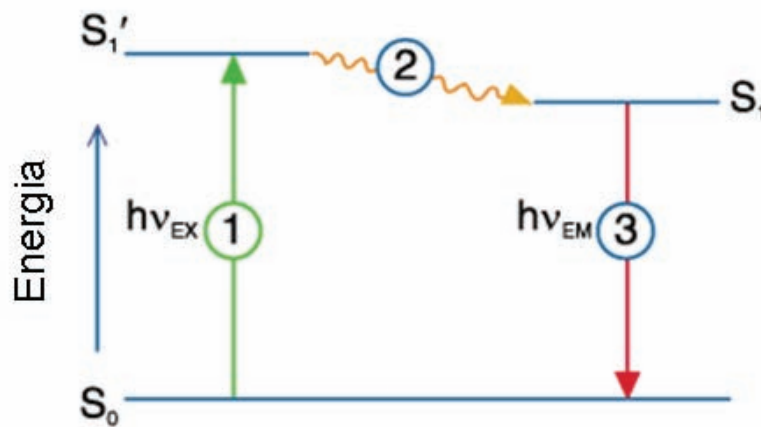
Quan una molècula és irradiada amb energia electromagnètica poden produir-se diferents processos: absorció, fluorescència i fosforescència.

La **fluorescència** és el resultat d'un procés de tres etapes (*Figura III.3*):

En la primera etapa **(1)** la radiació electromagnètica d'una determinada energia o longitud d'ona ( $h\nu_{EX}$ ) és absorbida per una molècula. L'absorció d'aquesta energia fa que els electrons de l'estat basal ( $S_0$ ) de la molècula passin a un nivell electrònic excitat més elevat, creant així un estat electrònic excitat de singlet ( $S_1'$ ).

En la segona etapa **(2)**, aquest estat excitat de singlet roman durant un cert temps depenent del temps de vida mitja del fluoròfor. Durant aquest temps el fluoròfor sofreix una sèrie de canvis conformacionals i està subjecte a multitud de possibles interaccions amb molècules del seu entorn. Aquests processos tenen dues conseqüències molt importants. La primera és que part de l'energia de l'estat excitat es dissipa en forma de calor donant lloc a un estat electrònic de singlet relaxat ( $S_1$ ) des del qual s'origina la fluorescència. El segon és que no totes les molècules excitades retornen a l'estat basal emetent fluorescència si no que existeixen altres processos com pot ser la desactivació deguda a col·lisions laterals o la transferència d'energia per ressonància cap a altres molècules presents en el medi, que poden fer disminuir la població de molècules en l'estat excitat. La mesura de la quantitat relativa d'aquests processos és el rendiment quàntic que es defineix com la relació entre el nombre de fotons fluorescents emesos i el nombre de fotons absorbits.

En l'última etapa **(3)**, el fluoròfor retorna al seu estat basal emetent un fotó amb una determinada energia ( $h\nu_{EM}$ ). Degut a la dissipació de l'energia durant el temps de vida mitja de l'estat excitat que s'ha produït anteriorment, l'energia emesa del fotó és menor que l'energia absorbida, de manera que es produeix un desplaçament cap a longituds d'ona majors d'aquesta radiació. Aquest desplaçament cap al vermell de la longitud d'ona emesa respecte la longitud d'ona absorbida es coneix com desplaçament de Stokes (Lakowicz, 2001).



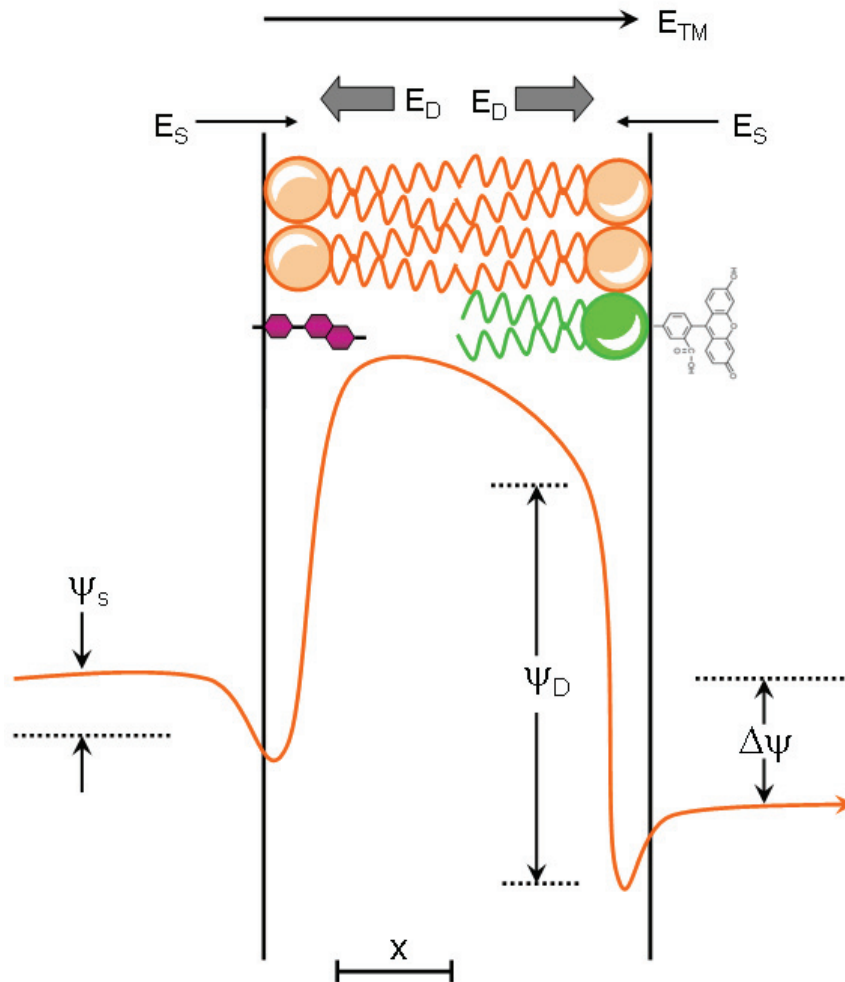
**Figura III.3.** Diagrama de Jablonski il·lustrant els processos implicats en la fluorescència descrits en el text [modificat de (Haugland, 2002)].

#### *III. 4. 2. Sensors Fluorescents de Potencials Electrostàtics Associats a Membranes Biològiques*

En els sistemes biològics, el medi aquós que conté ions, banya la superfície de les membranes. Aquestes membranes estan formades de lípids i proteïnes que contenen càrregues elèctriques així com grups amb moments dipolars. Com a conseqüència de la naturalesa amfipàtica dels constituents de les membranes, els grups polars o carregats estan relativament fixats respecte a la seva orientació i distància fins al centre de la membrana. Degut a aquestes restriccions, els dipols i les càrregues tan sols poden ser compensades parcialment per molècules d'aigua i electròlits en dissolució. Tot això dóna lloc a un complex arranjament de camps elèctrics importants per a la estructura i funció de les membranes biològiques.

Normalment a les membranes biològiques es troben associats tres tipus diferents de potencials electrostàtics: el potencial transmembrana, el potencial de superfície i el potencial dipolar de membrana. El **potencial transmembrana** ( $\Delta\psi$ ), conegut com a potencial de membrana, és la diferència de potencial entre els dos costats de la membrana i resulta del gradient de càrregues elèctriques a través d'aquesta (Nicholls i Ferguson, 1992). El **potencial de superfície** ( $\psi_s$ ) (McLaughlin, 1989) és la diferència de potencial entre la superfície de la membrana i el sí del medi aquós i és generat per les càrregues elèctriques que es troben fixades a la superfície de la membrana. El **potencial dipolar** ( $\psi_D$ ) és la diferència de potencial entre el

centre de la bicapa lipídica i la interfície aigua-lípid i és generat pels dipols moleculars d'aquesta zona concreta de la membrana presents a les molècules que les constitueixen (Clarke, 2001).



**Figura III.4.** Representació dels tres tipus de potencials associats a les membranes. El potencial transmembrana ( $\Delta\psi$ ), el potencial de superfície ( $\psi_s$ ) i el potencial dipolar de membrana ( $\psi_D$ ). La línia taronja representa el valor del potencial. Les fletxes indiquen els camps elèctrics associats a cadascun d'aquests potencials i representen la zona en la qual aquests camps elèctrics són efectius. El gruix de les fletxes indica la seva intensitat en una membrana plasmàtica típica. La distància està representada per  $x$ . També es mostra la localització teòrica de les sondes Di-8-ANEPPS (morat) i FPE (verd) [modificat de (Gross *i col.*, 1994)].

D'aquests tres potencials, el potencial transmembrana és el que ha estat més ben caracteritzat en relació als processos biològics. Els altres dos potencials resulten menys estudiats. Tot i això, en els darrers anys, s'està posant de manifest la seva importància en determinats processos biològics, així com la possibilitat de mesurar variacions en la seva magnitud per estudiar la interacció de macromolècules amb les membranes biològiques.

### III. 4. 2. i) El Potencial Electrostàtic de Superfície

El potencial electrostàtic de superfície ( $\psi_s$ ), com s'ha descrit anteriorment, és la diferència de potencial entre la superfície de la membrana i el sí del medi aquós i és generat per les càrregues elèctriques que es troben fixades a la superfície de la membrana. En les membranes biològiques, aquest potencial és degut bàsicament als lípids carregats negativament.

Aquest potencial pot afectar a processos que tenen lloc a la superfície de la membrana com pot ser l'associació de diferents tipus de pèptids amb membranes; per exemple la interacció de pèptids antimicrobians (Zhang *i col.*, 2001), pèptids hemolítics (Hristova *i col.*, 2001), pèptids senyal (Golding *i col.*, 1996) o pèptids de fusió vírics (Cladera *i col.*, 2001).

Les càrregues de la superfície de la membrana són capaces d'atraure contraions del medi aquós. Aquest efecte sobre la concentració d'ions a la superfície de la membrana crea una capa difusa de contraions. Aquesta situació és descrita pel model clàssic de Gouy-Chapman-Stern (Cevc, 1990), el qual permet relacionar el potencial electrostàtic de superfície ( $\psi$ ) amb l'excés de densitat de càrregues ( $\sigma$ ) a la superfície de la membrana, tal i com descriu la següent equació (Eq. 1):

$$\psi_0 = \sqrt{\frac{2\pi RT}{F^2 \epsilon_c}} \times \frac{\sigma}{z} \quad (\text{Eq. 1})$$

on R és la constant dels gasos, T és la temperatura, F és la constant de Faraday,  $\epsilon$  és la constant dielèctrica del medi,  $c_b$  és la concentració d'ions del medi aquós i z és la valència de l'ió.

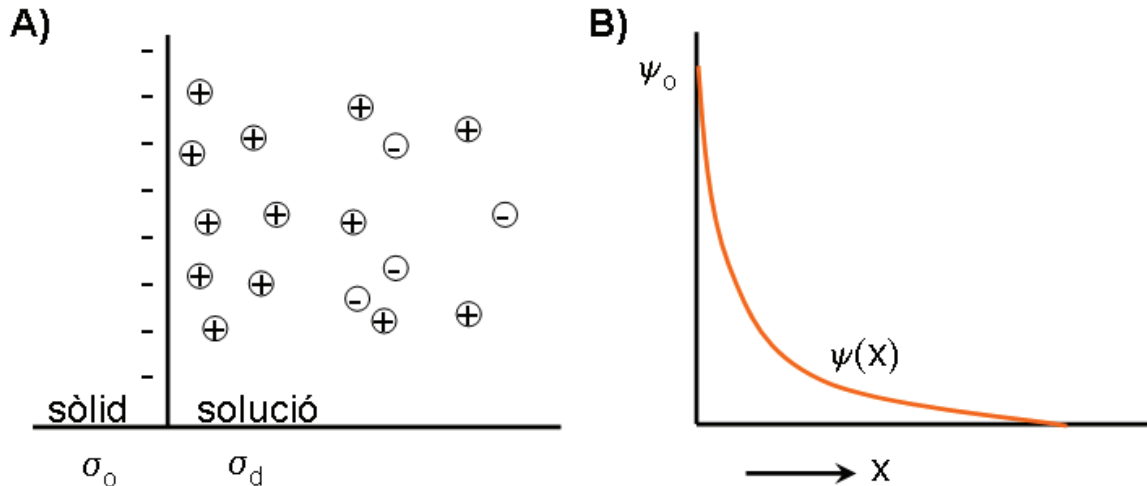
D'altra banda, la concentració d'ions a la superfície de la membrana depèn del potencial de superfície tal i com descriu l'equació de Boltzman (Eq. 2):

$$C_s = C_b e^{-ze\psi/K_B T} \quad (\text{Eq. 2})$$

on  $C_s$  és la concentració d'ions a la superfície de la membrana,  $C_b$  és la concentració d'ions al medi aquós, e és la càrrega elemental,  $K_B$  és la constant de Boltzman, T és la temperatura absoluta i z és la valència de l'ió determinat.



Així doncs, el potencial de superfície provoca una distribució desigual d'ions a la superfície de la membrana en relació a la distribució que tenen en el sí del medi aquós, de manera que els ions d'igual càrrega que els de la superfície de la membrana són expulsats mentre que els de càrrega oposada són atrets. La següent figura (*Figura III.5*) mostra la variació del valor del potencial de superfície en funció de la distància des de la membrana fins al sí del medi aquós.



**Figura III.5. (A)** Representació esquemàtica de la distribució desigual d'ions entre la superfície de la membrana (sòlid) i el sí del medi aquós (solució) on  $\sigma_0$  és la densitat de càrregues a la superfície de la membrana i  $\sigma_d$  és la densitat de càrregues al sí de la solució. **(B)** Representació de la variació del potencial de superfície ( $\psi_0$ ) en funció de la distància des de la superfície de la membrana fins al sí del medi aquós ( $x$ ), creant el potencial electrostàtic de superfície ( $\psi(x)$ ) (línia taronja).

La combinació de l'equació de Boltzman amb l'equació de Henderson-Hasselbalch, dóna lloc a una expressió que relaciona el pK d'un grup acídic situat a la superfície d'una membrana amb el pK d'aquest mateix grup en el sí de la solució, a través del potencial de superfície:

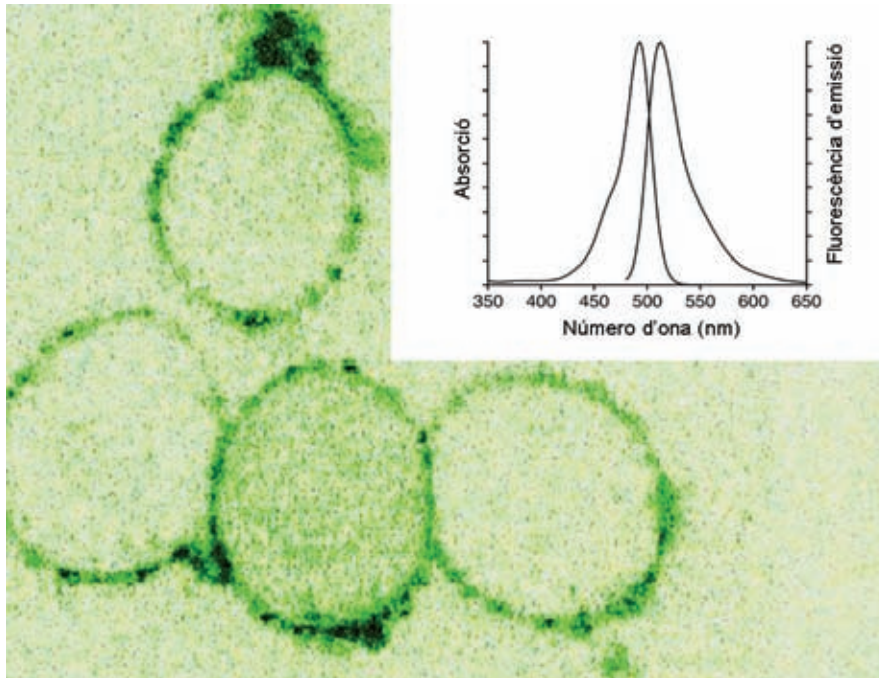
$$\log \frac{C_s}{C_B} = \psi \times 0.05V \quad (\text{Eq. 3})$$

$$pK_s = pK_B + \psi \quad (\text{Eq. 4})$$

L'equació 4 indica que el pK d'un grup acídic localitzat a la superfície de la membrana és diferent del pK d'aquest mateix grup quan es troba en el medi aquós. La variació en el valor del pK vindrà determinada per la magnitud del potencial de superfície. Per tant, un indicador fluorescent sensible a variacions de pH, com per exemple la fluoresceïna, situada a la superfície de la membrana, pot variar la seva fluorescència degut a canvis en la magnitud del potencial electrostàtic de superfície. D'aquesta manera, canvis en el nombre de càrregues en la superfície de la membrana induïts per la unió d'ions inorgànics o macromolècules amb càrrega elèctrica neta, causaran una alteració en el potencial electrostàtic de superfície (Cladera i O'Shea, 2001).

#### *III. 4. 2. i. a La Sonda FPE*

La fluoresceïnafosfatidiletanolamina (FPE) és una sonda sensible a canvis en el potencial electrostàtic de superfície. Aquesta sonda consta d'una molècula de fluoresceïna, la qual li aporta la fluorescència, unida covalentment a una molècula de fosfatidiletanolamina. Aquesta molècula, quan es barreja amb liposomes, s'insereix a la bicapa, de manera que les cues d'àcid gras de la fosfatidiletanolamina se situen cap al centre de la membrana, mentre que el cap polar de la fosfatidiletanolamina i la molècula de fluoresceïna queden localitzades a la superfície de la membrana (tal i com mostra la *Figura III.4*). La *Figura III.6* mostra cèl·lules marcades amb la sonda FPE observant-se que la major part de la fluorescència es localitza a la superfície de la membrana. En aquesta figura també es mostra l'espectre d'excitació i d'emissió de la sonda FPE presentant un màxim d'excitació al voltant de 490 nm i un màxim d'emissió al voltant de 520 nm quan es troba inserida als liposomes. Aquests valors són els que s'utilitzaran en els experiments de fluorescència en els quals intervingui la FPE.

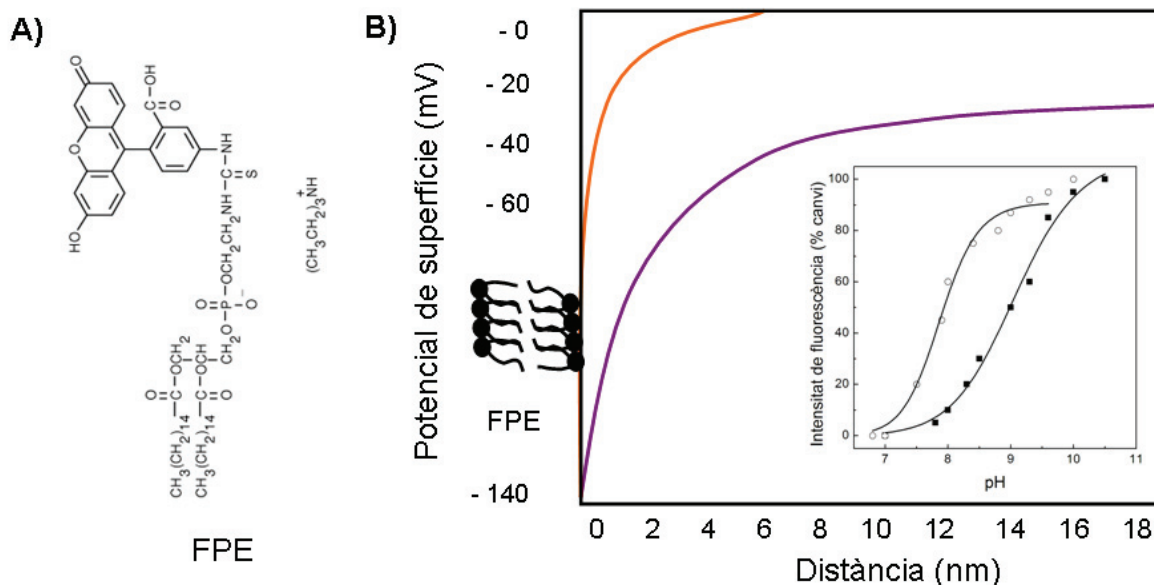


**Figura III.6.** Cèl·lules marcades amb la sonda FPE, on es mostra que la major part de la fluorescència emesa per aquesta es localitza a la membrana (foto cedida pel Dr.Cladera). L'insert mostra l'espectre d'excitació i d'emissió de la sonda FPE, presentant un màxim d'excitació a 490 nm i un màxim d'emissió a 520nm.

Aquesta disposició de la sonda li permet respondre a canvis en la magnitud del potencial electrostàtic de superfície degut a la interacció de molècules carregades amb la superfície de la membrana.

Aquesta capacitat de respondre a canvis en el potencial electrostàtic de superfície és deguda al fet que la fluoresceïna és una molècula la fluorescència de la qual depèn del pH. Així doncs, al localitzar-se a la superfície de la membrana, variacions en el pH a la superfície d'aquesta degudes a la interacció de càrregues elèctriques faran variar la fluorescència de la FPE. Així doncs, la interacció de molècules amb la membrana que facin el seu potencial de superfície més electronegatiu (addició de càrregues negatives a la superfície de la membrana) causaran una disminució de la fluorescència de la FPE, mentre que interaccions que facin la superfície de la membrana més electropositiva (addició de càrregues positives) provocaran un augment de la fluorescència de la FPE.

La següent figura (*Figura III.7*) mostra l'estructura de la sonda FPE i la dependència de la seva fluorescència en funció del pH i en funció de la concentració salina, així com el valor del potencial de superfície.



**Figura III.7. (A)** Representació molecular de la sonda fluorescent FPE. La sonda FPE està formada per una molècula de fluoresceïna unida covalentment a una molècula de fosfatidiletanolamina. **(B)** Valor del potencial de superfície en funció de la distància a la superfície de la membrana. L'insert de la figura mostra els canvis en la fluorescència de la sonda FPE inserida en membranes a baixa concentració salina (10 mM, cercles blancs) i a elevada concentració salina (150 mM, cercles negres) en funció del pH.

#### III. 4. 2. i. b Marcatge dels LUVs amb FPE

El marcatge dels LUVs amb la sonda fluorescent FPE es va realitzar segons està descrit (Wall *i col.*, 1995a; Wall *i col.*, 1995b). En un èpendorf es va afegir el volum necessari de la sonda fluorescent FPE dissolta en cloroform/metanol (2:1) per aconseguir una relació molar lípid/FPE de 0.25 mol%. Després es va evaporar el dissolvent orgànic passant un corrent suau de  $N_{2(g)}$  i es va resuspendre la sonda en 15  $\mu$ l d'etanol amb l'ajuda d'una pipeta Hamilton de 25  $\mu$ l. Aquest pas es realitza perquè els LUVs no entrin en contacte amb el cloroform, ja que aquest podria alterar la integritat de les membranes. Després, en el mateix èpendorf es va afegir 1 ml de LUVs i es va incubar la barreja durant 1 hora a 37°C a les fosques. Un cop transcorregut aquest temps, cal eliminar la sonda no incorporada a la membrana. Per tant, la suspensió de liposomes es va fer passar per una columna PD10 de Sephadex® G-25 prèviament equilibrada amb tampó TRIS 10 mM a pH 7.5 i es va recollir la franja que contenia els liposomes marcats (franja amb un color groc tènue). Finalment, els LUVs es van guardar a 4°C en una atmosfera lliure d'oxigen com a màxim dos dies abans de la seva utilització.

### III. 4. 2. i. c *Condicions Experimentals de les Mesures d'Unió a Membranes*

Els experiments d'unió dels diferents pèptids de fusió a membranes model es van mesurar amb un fluorímetre SLM-Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 490 i 520 nm, corresponents als màxim d'absorció i emissió respectivament de la sonda FPE. La mostra es va mantenir a una temperatura constant de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3.

Les mesures es van realitzar en cubetes de fluorescència de poliestirè en les que s'hi va afegir el volum necessari de LUVs per aconseguir una concentració final de 300 µM de lípids en un volum final de 2 ml. La mostra es va mantenir en agitació constant per evitar la seva sedimentació.

L'experiment va consistir en mesurar els canvis de la fluorescència emesa per la sonda FPE a 520 nm al llarg del temps provocats per l'addició de petits volums dels pèptids de fusió dissolts en DMSO a diferents concentracions finals. Després es va mesurar la contribució de la dispersió de la llum provocada pels LUVs sense marcar amb FPE i es va restar de les traces obtingudes amb LUVs marcats. Per tal d'obtenir les corbes d'unió dels diferents pèptids de fusió a membranes, es va representar la variació de fluorescència acumulada en funció de la concentració de pèptid addicionat i a continuació les dades es van ajustar a un model d'unió hiperbòlic (Eq. 5) o sigmoïdal (Eq. 6) (Golding *i col.*, 1996) utilitzant les següents equacions:

$$F = (F_{\max} \cdot [FP]) / (K_d + [FP]) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$F = (F_{\max} \cdot [FP]^n) / (K_d^n + [FP]^n) \quad (\text{Eq. 6})$$

on, F és la variació de fluorescència,  $F_{\max}$  és la variació de fluorescència màxima, [FP] és la concentració de pèptid de fusió,  $K_d$  és la constant de dissociació del procés d'unió a la membrana i n és el coeficient de Hill.

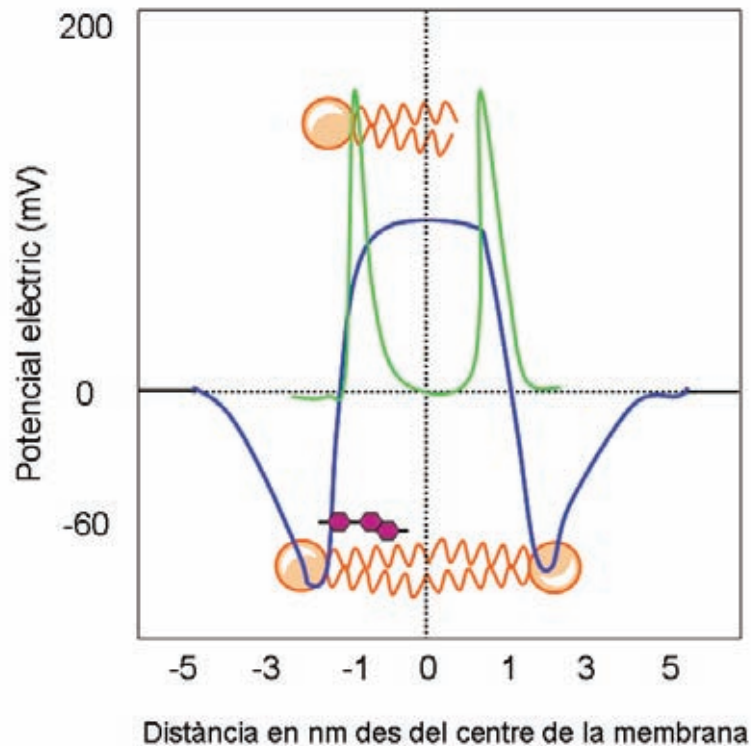
### III. 4. 2. ii) El Potencial Dipolar de Membrana

El potencial dipolar ( $\psi_D$ ), com s'ha descrit anteriorment, és la diferència de potencial entre el centre de la bicapa lipídica i la interfície aigua-lípid. Aquest potencial té el seu origen en les polaritzacions associades a les molècules de fosfolípids i proteïnes que formen les membranes. Els dipols que es troben a les molècules de lípid són:

1. Dipols associats al grup carbonil de l'enllaç èster del cap polar dels fosfolípids.
2. Els enllaços dipolars fòsfor-oxigen i fòsfor-nitrogen del grup fosfat del cap polar dels fosfolípids.
3. Determinats grups del cap polar dels fosfolípids.
4. Els moments dipolars de les molècules d'aigua orientades a la interfície aigua-lípid.

El resultat vectorial total dels moments dipolars d'una meitat de la membrana és un vector positiu orientat cap al centre de la membrana. El potencial associat a aquest moment dipolar resultant en les membranes biològiques pot arribar a ser de centenars de milivolts i augmenta molt ràpidament al passar des del cap polar dels fosfolípids de la membrana fins a l'inici de les cues hidrofòbiques dels mateixos, una regió en la que existeix un gradient de polaritat molt important. Per tant, aquest potencial pot tenir un efecte sobre els cossos polaritzats, com ara els grups polars de pèptids i proteïnes que interaccionin amb aquesta regió de la membrana (Brockman, 1994). Aquest potencial, doncs, pot jugar un paper important en determinats processos com pot ser modular la conductivitat de canals de membrana, com és el cas del canal de gramicidina (Antonenko *i col.*, 1999), dirigir el plegament de proteïnes de membrana (Gilson i Honig, 1988), variar la difusió de substàncies a través de la pell (Valenta *i col.*, 2001) o modificar la unió de molècules carregades amb la membrana, com poden ser pèptids senyals (Cladera i O'Shea, 1998), un inhibidor de la proteasa del VIH (Asawakarn *i col.*, 2001) o pèptids de fusió vírics (Cladera *i col.*, 1999).

La *Figura III.8* mostra una representació del valor del potencial dipolar de membrana.

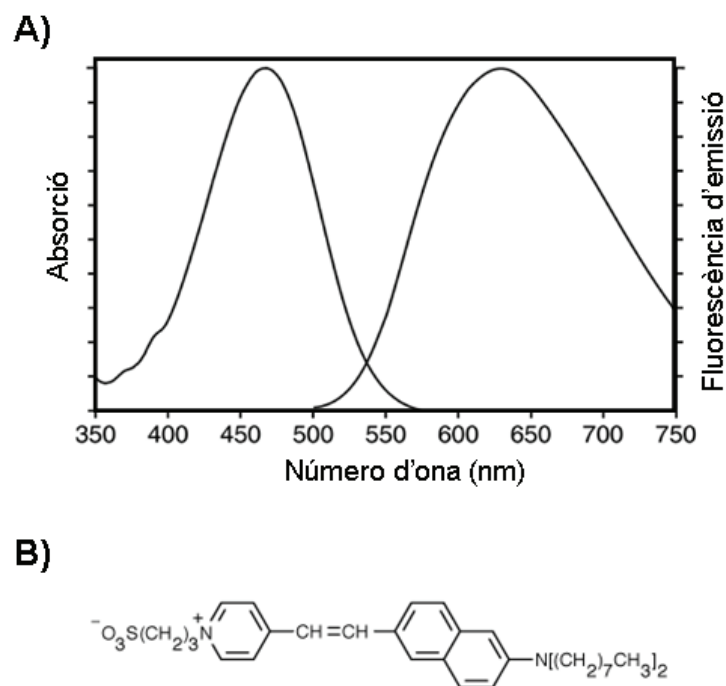


**Figura III.8.** Valor del potencial elèctric associat a una bicapa lipídica, en absència de potencial transmembrana (línia blava). Contribució del potencial dipolar de membrana (línia verda). També s'indica la posició teòrica de la sonda Di-8-ANEPPS (morat).

#### III. 4. 2. ii. a La Sonda Di-8-ANEPPS

Durant els últims vint anys s'han desenvolupat sondes fluorescents per mesurar el valor del potencial dipolar de membrana. La fluorescència d'aquestes sondes varia en funció del camp elèctric segons un mecanisme electrocròmic o de desplaçament de la càrrega molecular (Loew *i col.*, 1979). A més, la fluorescència d'aquestes sondes és independent de possibles variacions en el potencial de superfície (Cladera i O'Shea, 1998; Gross *i col.*, 1994). Una d'aquestes sondes és la betaïna 1-(3-sulfonato-propil)-4-[ $\beta$ [2-(di-n-octil-amino)-6-naftil]vinil]piridina, coneguda com a Di-8-ANEPPS (*Figura III.9 B*). El desplaçament del màxim d'excitació d'aquesta sonda (al voltant de 468 nm) és sensible únicament a variacions del camp elèctric. Per seguir aquest desplaçament s'ha de calcular l'espectre de diferència després de normalitzar la intensitat dels espectres d'excitació (abans i després de la pertorbació que causa la variació del camp elèctric). En el cas de compostos que provoquen un

augment del potencial dipolar de membrana, com el cas del 6-KC o el colesterol, l'espectre de diferència reflecteix un desplaçament cap al blau amb un màxim al voltant de 430 nm i un mínim cap a 510 nm. L'existència d'aquest màxim i mínim ha permès el desenvolupament d'un mètode ratiomètric de doble longitud d'ona d'excitació el qual consisteix en excitar la mostra a dues longituds d'ona, 430 i 510 nm, i mesurar la fluorescència emesa a 580 nm. Aquest mètode ratiomètric de doble longitud d'ona permet obtenir el valor  $R_{(430/510)}$  que és una mesura de la magnitud del potencial dipolar de membrana.



**Figura III.9.** (A) Espectres d'excitació i emissió de la sonda Di-8-ANEPPS. (B) Representació molecular de la sonda fluorescent Di-8-ANEPPS.

#### III. 4. 2. ii. b Marcatge dels LUVs amb Di-8-ANEPPS

Un cop preparats els LUVs, es van marcar amb la sonda fluorescent Di-8-ANEPPS tal i com ha estat prèviament descrit per Cladera i O'Shea (1998). En una cubeta que contenia els LUVs a una concentració final de 300  $\mu\text{M}$ , es va afegir la sonda (d'una solució mare que estava dissolta en etanol) a una concentració final de 8  $\mu\text{M}$  i es va incubar durant 24 hores a les fosques a 37°C per tal d'assegurar la màxima incorporació de la sonda als liposomes.



### *III. 4. 2. ii. c* *Condicions Experimentals de les Mesures del Potencial Dipolar de Membrana*

Els experiments per determinar la magnitud del potencial dipolar de membrana es van mesurar amb un fluorímetre SLM-Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 460 i 580 nm, corresponents als màxim d'absorció i emissió respectivament de la sonda Di-8-ANEPPS obtenint-se d'aquesta manera l'espectre d'excitació dels diferents tipus de LUVs marcats. La mostra es va mantenir a una temperatura constant de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3 i en agitació constant.

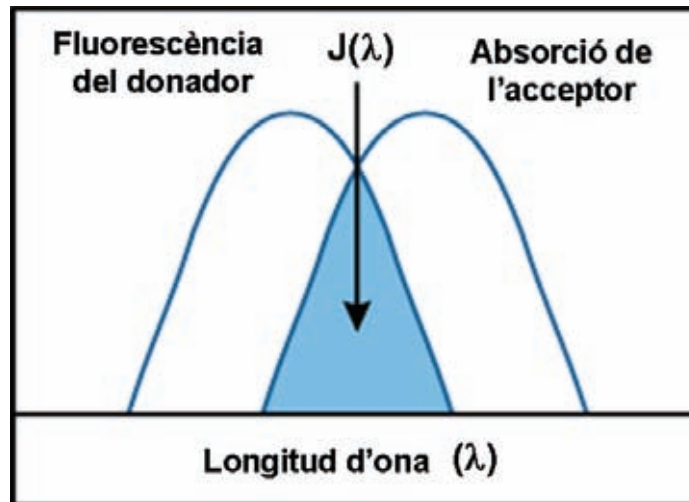
El paràmetre  $R_{(430/510)}$  es va determinar utilitzant el mètode ratiomètric de doble longitud d'ona descrit anteriorment (**Mètodes Experimentals III. 4. 2. ii. a**). Les mostres es van excitar a dues longituds d'ona, 430 nm i 510 nm alternativament cada segon i es va mesurar la fluorescència emesa a 580 nm.

### *III. 4. 3. Experiments de Fusió de Membranes*

#### *III. 4. 3. i) Fonaments Teòrics*

La transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) té lloc quan l'espectre d'emissió d'un fluoròfor, anomenat donador, es superposa amb l'espectre d'excitació d'una altra molècula, anomenada acceptor (*Figura III.10*). Aquesta última no cal que sigui necessàriament un fluoròfor, per tant, la transferència d'energia per ressonància es produeix sense la necessitat d'aparició d'un fotó i és el resultat de la interacció dipol-dipol entre l'acceptor i el donador.

Un factor que cal tenir en compte quan s'estudia qualsevol procés mitjançant FRET és l'eficiència en la transferència d'energia entre el donador i l'acceptor la qual depèn del grau de superposició entre l'espectre d'emissió del primer i l'espectre d'absorció del segon, del rendiment quàntic del donador, de l'orientació relativa dels dipols del donador i de l'acceptor i de la distància entre ambdues molècules.



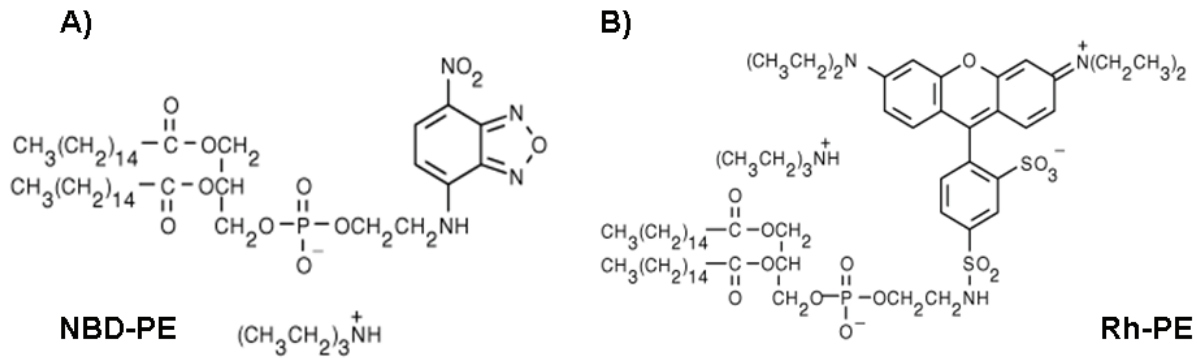
**Figura III.10.** Representació esquemàtica de la superposició dels espectres durant la FRET. En blau es representa la zona de superposició de l'espectre d'emissió del donador i de l'espectre d'absorció de l'acceptor ( $J(\lambda)$ ) [modificat de (Haugland, 2002)].

Una característica important de la FRET és que la transferència d'energia es produeix a distàncies comparables a la mida de les molècules biològiques. La distància a la qual té lloc el 50% de la FRET s'anomena distància de Förster i equival a 20-60 Å. Aquesta distància és comparable al diàmetre de certes proteïnes, al gruix de les membranes biològiques o la distància entre dos llocs d'una mateixa proteïna. Així doncs, qualsevol fenomen que afecti a la distància entre l'acceptor i el donador, afectarà a la transferència d'energia, i per tant, podrà ser mesurat mitjançant aquesta tècnica. L'eficiència de la FRET és inversament proporcional a la sisena potència de la distància entre el donador i l'acceptor, de manera que la transferència d'energia disminueix molt ràpidament en augmentar la distància entre ambdues molècules (Lakowicz, 2001).

Així doncs, la FRET pot ser utilitzada per mesurar processos biològics molt diversos (Gerber *i col.*, 2004; Heyduk, 2002; Lagerholm *i col.*, 2005; Zhuang i Rief, 2003) :

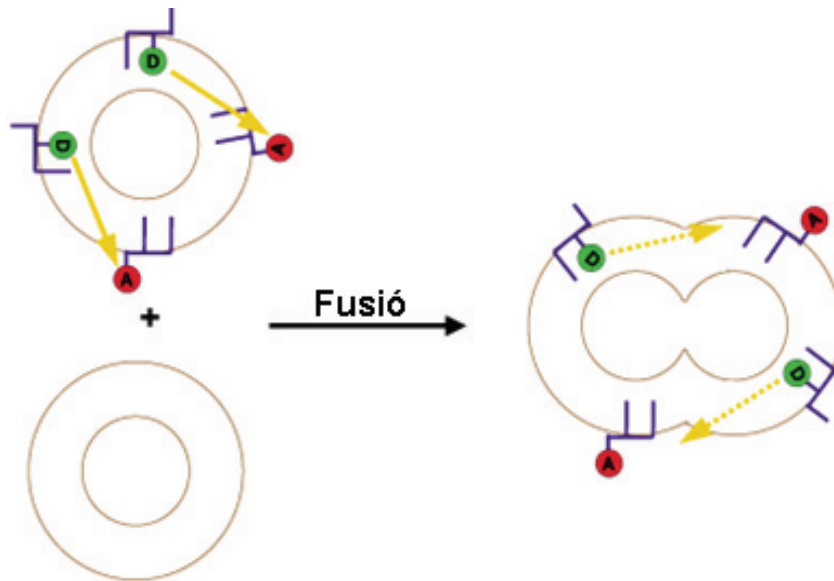
1. Mesurar la distància entre dos dominis d'una proteïna.
2. Mesurar canvis conformacionals de proteïnes.
3. Estudiar el plegament i desplegament de proteïnes i àcids nucleics.
4. Estudiar la interacció entre un lligand i un receptor.
5. Detectar la hibridació d'àcids nucleics.
6. Estudiar la distribució i el transport de lípids.
7. Mesurar la fusió entre dues membranes.

El seguiment de la fusió de membranes lipídiques model induïda pels pèptids de fusió es va fer utilitzant el mètode desenvolupat per Struck i col. (1981). Aquest mètode es fonamenta en la transferència d'energia per ressonància entre les sondes NBD-PE i Rh-PE (*Figura III.11*).



**Figura III.11.** Representació molecular de les sondes fluorescents emprades en els experiments de fusió de membranes. **(A)** NBD-PE. **(B)** Rh-PE.

En aquest cas la sonda fluorescent NBD-PE actua com a donador (**D**), ja que el seu espectre d'emissió es superposa amb l'espectre d'excitació de la sonda Rh-PE, la qual actua com a acceptor (**A**). L'experiment es basa en barrejar liposomes marcats amb les dues sondes i liposomes sense marcar, en excés. En absència de pèptid de fusió, les dues poblacions de liposomes (marcats i no marcats) es mantindran separades i no es fusionaran. En afegir el pèptid de fusió es produirà la fusió de membranes. Com a conseqüència de la fusió de les membranes es produirà un augment de la distància entre el donador i l'acceptor, disminuint així la transferència d'energia per ressonància entre ambdues sondes. Per tant es pot mesurar la fusió de membranes mitjançant l'augment de la fluorescència emesa pel donador (o la disminució de la fluorescència de l'acceptor) (*Figura III.12*).



**Figura III.12.** Representació esquemàtica dels experiments de fusió de membranes basat en la FRET. En verd es representa la sonda NBD-PE (D, donador) i en vermell la sonda Rh-PE (A, acceptor). Les fletxes simbolitzen la FRET [modificat de (Haugland, 2002)].

#### III. 4. 3. ii) Marcatge dels LUVs amb NBD-PE/Rh-PE

El marcatge de LUVs amb les sondes NBD-PE/Rh-PE segueix el mateix procediment que la preparació de LUVs però en aquest cas, a la barreja orgànica inicial de lípids s'hi afegeixen ambdues sondes que s'incorporaran als liposomes. En un baló de 25 ml es va afegir el volum necessari de lípids dissolts en cloroform per tal d'obtenir una concentració final de  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . També s'hi van afegir les sondes dissoltes en dissolvents orgànics (metanol i cloroform) per tal d'obtenir-les a una concentració final 0.6 mol%. Es va evaporar el dissolvent orgànic mitjançant un corrent suau de  $\text{N}_{2(g)}$  sec fins a formar un film homogeni de lípids al fons. Un cop format el film de lípids, aquests es van resuspendre amb l'ajuda d'un vòrtex en tampó TRIS 10 mM a pH 7.5. En aquest punt la suspensió presentava un aspecte lletós degut a la formació de LUVs i un color rosat degut a l'emissió de fluorescència de la sonda Rh-PE. Després es van realitzar 5 cicles de congelació/descongelació utilitzant  $\text{N}_{2(l)}$  i aigua calenta alternativament. Un cop realitzats aquests cicles la suspensió presentava un aspecte menys lletós però encara opac. Finalment, la suspensió es va fer passar 10 vegades a través de 2 membranes de policarbonat amb un diàmetre de porus de 100 nm mitjançant un extrusionador. Els LUVs formats es van guardar a  $4^\circ\text{C}$  en una atmosfera lliure d'oxigen i protegits de la llum per evitar la degradació de les sondes com a màxim dos dies abans de la seva utilització.

### III. 4. 3. iii) Condicions Experimentals de les Mesures de la Fusió de Membranes

Els experiments de fusió de membranes model induïda pels pèptids de fusió es van dur a terme mesurant el canvi en la intensitat de fluorescència resultant de la transferència d'energia per ressonància entre les sondes NBD-PE i Rh-PE inserides a les membranes model tal i com descriu Struck i col. (1981).

Els canvis de fluorescència es van mesurar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 465 i 530 nm, corresponents al màxim d'absorció i al màxim d'emissió de la sonda NBD-PE respectivament. La mostra es va mantenir a una temperatura constant de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3 i en contínua agitació.

Les mesures es van realitzar en cubetes de fluorescència de poliestirè en les que s'hi va afegir el volum necessari de LUVs per tal d'aconseguir una concentració final de lípid de 300 µM en un volum final de 2 ml. La cubeta contenia una barreja de LUVs marcats amb les dues sondes i LUVs no marcats a una relació molar 1/9. La fluorescència inicial ( $F_0$ ) de la barreja va correspondre al 0% de fusió i el 100% de fusió es va determinar addicionant TX100 reduït, per evitar la desactivació per col·lisionament de la sonda NBD-PE, a una concentració final a la cubeta de 0.1% (v/v). El percentatge de fusió a un temps determinat es va calcular mitjançant la següent expressió (Eq. 7):

$$F_t = \left( \frac{F_t - F_0}{F_{\max} - F_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

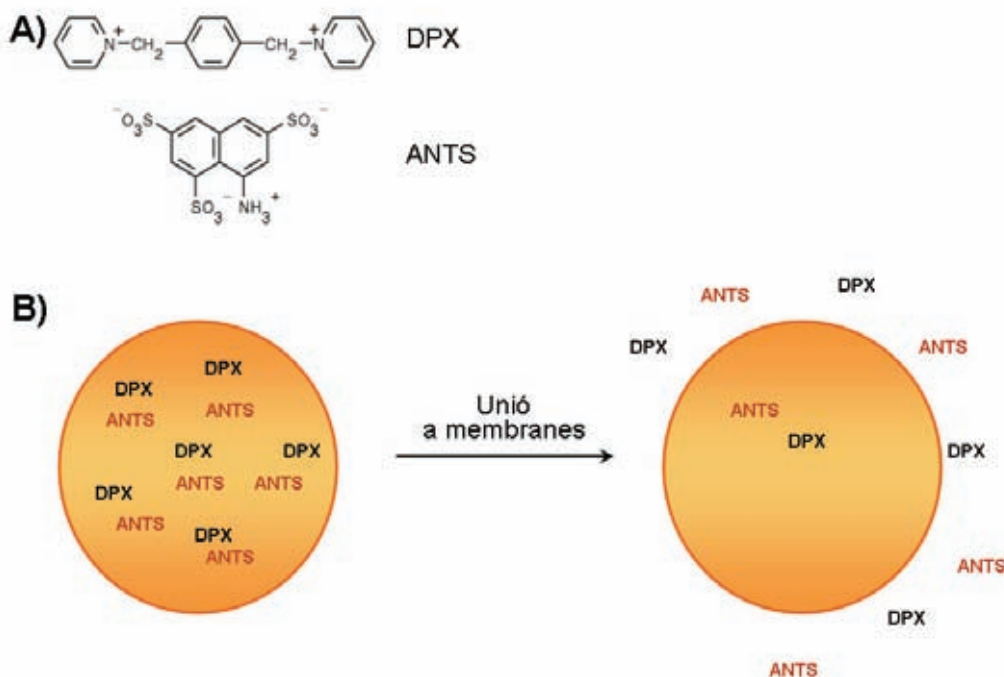
on  $F_t$  és la fluorescència en un temps determinat,  $F_{\max}$  és la fluorescència màxima (després de l'addició del TX100) i  $F_0$  és la fluorescència inicial.

### III. 4. 4. Experiments de Permeabilitat de Membrana

#### III. 4. 4. i) Mesura de Permeabilitat de Membrana amb ANTS/DPX

##### III. 4. 4. i. a Fonaments Teòrics

Per tal de caracteritzar l'efecte dels pèptids de fusió sobre la permeabilitat de les membranes model, es va mesurar l'alliberament de continguts intraliposomals induït per aquests pèptids utilitzant el mètode desenvolupat per Ellens i col. (1985) amb algunes modificacions. L'experiment es basa en l'extinció de fluorescència per col·lisió (*quenching*) de la sonda fluorescent polianiónica ANTS amb el desactivador catiónic DPX (*quencher*). Primerament, s'ha de formar una població de liposomes en el interior dels quals, en la fase aquosa, s'han incorporat la sonda fluorescent i el *quencher*, de manera que no es produeix fluorescència. Un cop s'afegeix el pèptid de fusió, aquest s'uneix als liposomes desestabilitzant la seva membrana. Aquesta desestabilització provoca l'alliberament de les dues molècules, que es dilueixen en el medi produint-se així un augment en la fluorescència de la sonda (*Figura III.13*), ja que el *quencher* no pot anular la seva fluorescència.



**Figura III.13.** (A) Representació molecular de la sonda fluorescent ANTX i el *quencher* DPX. (B) Esquema de l'experiment d'alliberament amb ANTS/DPX descrit en el text.

#### III. 4. 4. i. b Encapsulació d'ANTS/DPX en LUVs

El marcatge dels LUVs amb ANTS/DPX es basa en la incorporació d'aquestes dues molècules a l'interior dels LUVs. En un baló de 25 ml es va afegir el volum necessari de lípids dissolts en cloroform per tal d'obtenir una concentració final de lípid de  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Aleshores es va evaporar el cloroform aplicant un corrent suau de  $\text{N}_{2(g)}$  fins a formar un film homogeni de lípids al fons. Un cop format el film lipídic, aquest es va resuspendre en tampó 10 mM TRIS, 12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM NaCl pH 7.5 amb l'ajuda d'un vòrtex. Seguidament es van realitzar 5 cicles de congelació/descongelació amb  $\text{N}_{2(l)}$  i aigua calenta alternativament. Seguidament els LUVs marcats es van extrusionar 10 vegades a través de 2 membranes de policarbonat amb un diàmetre de porus de 100 nm. Finalment, per tal d'eliminar les sondes no incorporades a l'interior dels LUVs, la suspensió es va fer passar per una columna PD10 de Sephadex<sup>®</sup> G-25 prèviament equilibrada amb tampó TRIS 10 mM 100 mM NaCl pH 7.5 i es va recollir la franja de color groc tènue que contenia els liposomes marcats. Un cop preparats els LUVs es van guardar a 4°C en una atmosfera lliure d'oxigen, un màxim de dos dies abans de la seva utilització.

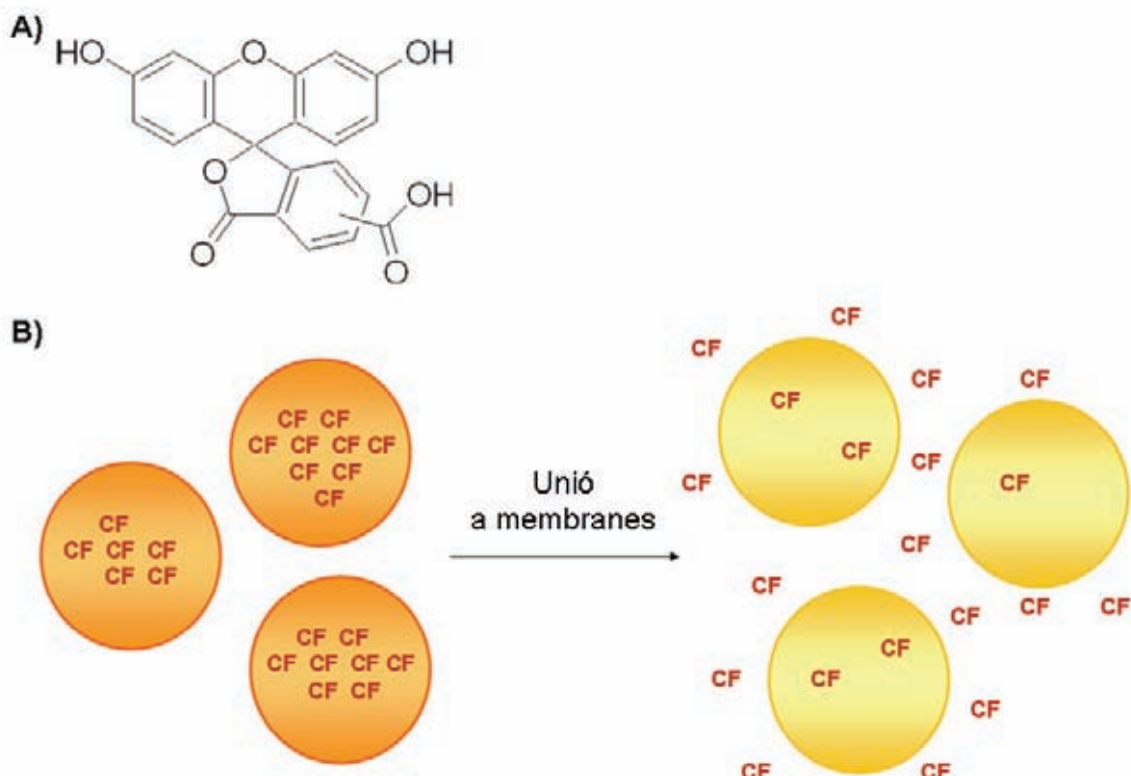
#### III. 4. 4. i. c Condicions Experimentals de les Mesures de Permeabilitat de Membrana

Els canvis de fluorescència es van mesurar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 353 i 520 nm, corresponents al màxim d'absorció i al màxim d'emissió, respectivament de la sonda ANTS. La mostra es va mantenir en agitació constant a una temperatura de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3. Les mesures es van realitzar en cubetes de fluorescència de poliestirè en les que s'hi va afegir el volum necessari de LUVs per tal de tenir una concentració final de 300  $\mu\text{M}$  en un volum final de 2 ml. La fluorescència inicial ( $F_0$ ) de la barreja va correspondre al 0% de fusió, i el 100% de fusió es va determinar addicionant TX100 a una concentració final a la cubeta de 0.1% (v/v). El percentatge de fusió a un temps determinat es va calcular mitjançant l'expressió descrita anteriorment (Eq. 7).

### III. 4. 4. ii) Mesura de Permeabilitat de Membrana amb CF

#### III. 4. 4. ii. a Fonaments Teòrics

L'experiment està basat en l'autoextinció de fluorescència (*autoquenching*) de la pròpia sonda fluorescent quan es troba a elevada concentració (> 50 mM). En canvi, a baixes concentracions aquesta sonda és molt fluorescent. Així doncs, cal formar una població de liposomes amb la sonda fluorescent CF incorporada a la fase aquosa en el seu interior a una elevada concentració, de manera que no es produeix fluorescència. Un cop s'addiciona el pèptid de fusió, aquest s'uneix als liposomes desestabilitzant la seva membrana. Aquesta desestabilització provoca l'alliberament de la sonda, la qual es dilueix en el medi disminuint la seva concentració i produint-se així un augment en la seva fluorescència (*Figura III.14*).



**Figura III.14.** (A) Representació molecular de la sonda fluorescent CF. (B) Esquema de l'experiment d'alliberament amb CF descrit en el text.



#### III. 4. 4. ii. b Encapsulació de Carboxifluoresceïna en LUVs

El marcatge dels LUVs amb CF es basa en la incorporació d'aquesta sonda a l'interior dels LUVs a elevada concentració. En un baló de 25 ml es va afegir el volum necessari de lípids dissolts en cloroform per tal de tenir una concentració final de lípid de  $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A continuació es va evaporar el cloroform aplicant un corrent suau de  $\text{N}_{2(g)}$  fins a formar un film homogeni de lípids al fons. Un cop format el film lipídic, aquest es va resuspendre en tampó 10 mM TRIS, 100 mM NaCl, 50 mM de CF a pH 7.5 amb l'ajuda d'un vòrtex. Seguidament es van realitzar 5 cicles de congelació/descongelació amb  $\text{N}_{2(l)}$  i aigua calenta alternativament i es van extrusionar 10 vegades a través de 2 membranes de policarbonat amb un diàmetre de porus de 100 nm. Finalment, per tal d'eliminar la sonda no incorporada a l'interior dels LUVs, la suspensió es va fer passar per una columna PD-10 de Sephadex<sup>®</sup> G-25 prèviament equilibrada amb tampó 10 mM TRIS, 150 mM NaCl pH 7.5 i es va recollir la franja de color groc que contenia els liposomes marcats. Un cop preparats els LUVs es van guardar a 4°C en una atmosfera lliure d'oxigen fins un màxim de dos dies abans de la seva utilització.

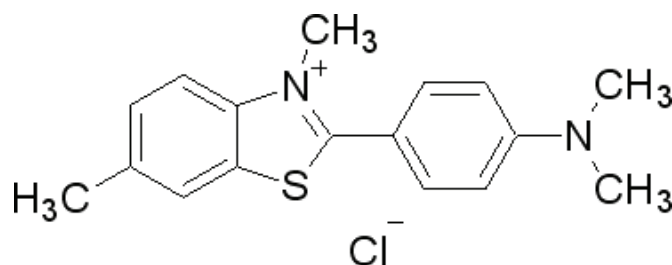
#### III. 4. 4. ii. c Condicions Experimentals de les Mesures de Permeabilitat de Membrana

Els canvis de fluorescència es van mesurar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 490 i 520 nm, corresponents al màxim d'absorció i al màxim d'emissió de la CF, respectivament. La mostra es va mantenir en agitació constant a una temperatura de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3. Les mesures es van realitzar en cubetes de fluorescència de poliestirè en les que s'hi va afegir el volum necessari de LUVs per tal de tenir una concentració final de 300  $\mu\text{M}$  en un volum final de 2 ml. La fluorescència inicial ( $F_0$ ) de la barreja va correspondre al 0% de fusió, i el 100% de fusió es va determinar addicionant TX100 a una concentració final a la cubeta de 0.1% (v/v). El percentatge de fusió a un temps determinat es va calcular mitjançant l'expressió descrita anteriorment (Eq. 7).

### III. 4. 5. Experiments de Formació de Fibres Amiloides

#### III. 4. 5. i) Fonaments Teòrics

La Tioflavina T (ThT) (*Figura III.15*) és una molècula derivada del benzotiazol. Aquesta sonda fluorescent s'ha utilitzat àmpliament per la visualització de depòsits de fibres amiloides al cervell. La seva particularitat recau en el fet que la seva fluorescència depèn de la presència de fibres amiloides: al unir-se a fibres amiloides, les quals s'estructuren en forma de fulla  $\beta$ , el seu espectre d'excitació sofreix un desplaçament cap al vermell d'aproximadament uns 120 nm, de manera que la sonda pot ésser, en aquestes condicions, selectivament excitada a 450 nm emetent fluorescència al voltant de 482 nm (LeVine, 1993).



**Figura III.15.** Representació molecular de la sonda fluorescent ThT.

#### III. 4. 5. ii) Condicions Experimentals de les Mesures de Formació de Fibres

Els possibles canvis de fluorescència de la sonda ThT es van mesurar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.). Les longituds d'ona d'excitació i d'emissió van ser 450 i 490 nm, corresponents al màxim d'absorció i al màxim d'emissió de la sonda ThT respectivament, quan interacciona amb fibres amiloides. La mostra es va mantenir en agitació contínua i a una temperatura constant de 20°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3.

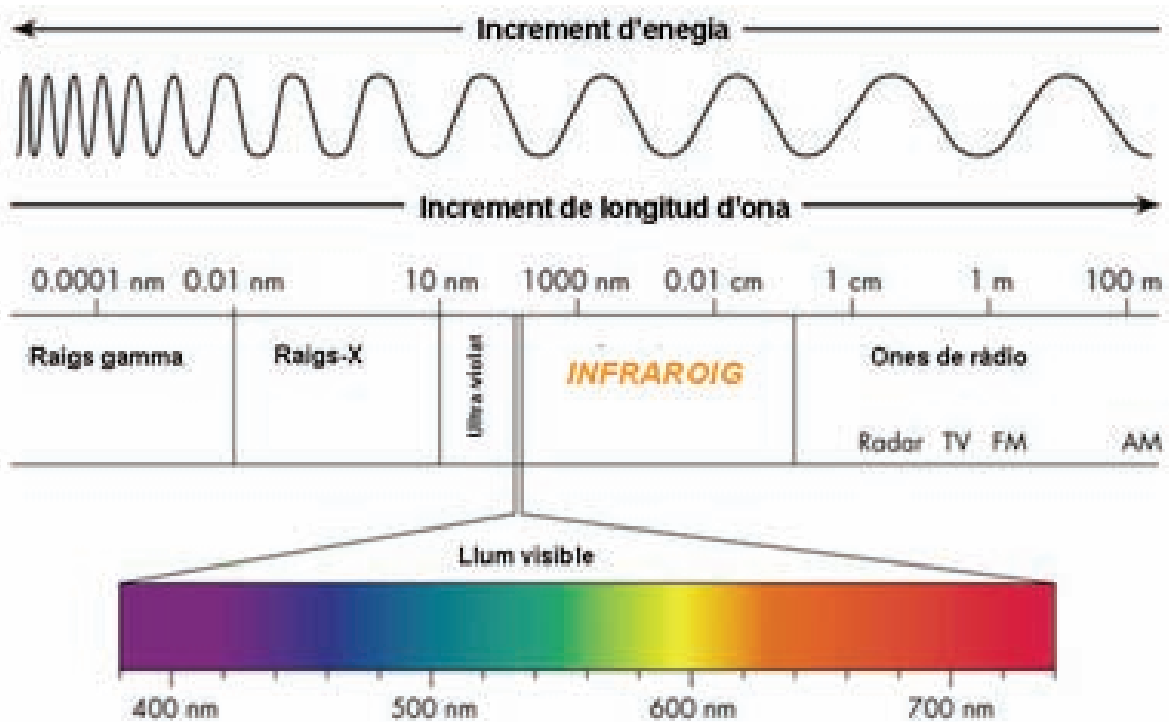
Les mesures es van realitzar en cubetes de fluorescència de poliestirè en les que s'hi va afegir el volum necessari de LUVs i de la sonda per tal de tenir una concentració final de 300  $\mu$ M de lípid i 35  $\mu$ M de ThT respectivament, en un volum final de 2 ml a les que posteriorment s'hi va afegir la quantitat desitjada de pèptid de fusió.

### III. 5. Espectroscòpia d'Infraroig amb Transformada de Fourier

#### III. 5. 1. Fonaments Teòrics

##### III. 5. 1. i) Les Vibracions Moleculares i la Radiació Infraroja

La radiació d'infraroig es defineix com la radiació electromagnètica de número d'ona entre  $14000\text{-}20\text{ cm}^{-1}$ . En aquesta regió de l'espectre electromagnètic, els compostos químics absorbeixen radiació sempre que hi hagi un canvi en el moment dipolar d'una vibració, rotació o rotació-vibració molecular. La regió entre  $4000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  de l'espectre electromagnètic és la que té més interès biològic (*Figura III.16*), ja que és la regió en la qual absorbeixen la majoria de compostos biològics.



**Figura III.16.** L'espectre electromagnètic.

La condició bàsica perquè es produeixi absorció de llum infraroja és que l'energia de la radiació incident es correspongui amb la diferència d'energia entre dos nivells vibracionals. Les transicions es poden donar només entre nivells vibracionals adjacents i en produir-se impliquen un canvi en el moment dipolar de l'enllaç que ha absorbit la radiació.

La posició de les bandes que s'observen a un espectre d'infraroig es dona normalment en números d'ona per cm ( $\text{cm}^{-1}$ ). El número d'ona es relaciona amb la freqüència de la radiació mitjançant l'equació:

$$\nu = c \cdot \nabla \quad (\text{Eq. 8})$$

on  $c$  és la velocitat de la llum,  $\nu$  la freqüència i  $\nabla$  el número d'ona.

A les baixes freqüències de la radiació d'IR absorbeixen els enllaços covalents dels àtoms, la qual cosa origina transicions energètiques entre nivells vibracionals. El comportament dels àtoms units per enllaços covalents es pot aproximar al d'un oscil·lador harmònic, de manera que la freqüència de vibració de l'enllaç pot ser descrita amb la següent expressió (Eq. 9):

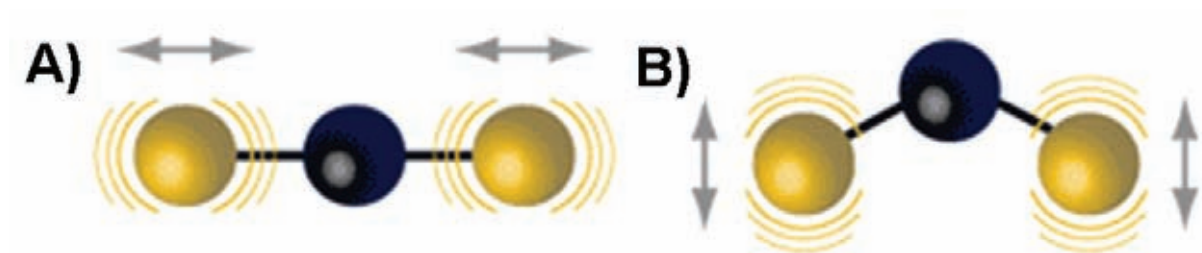
$$\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{Eq. 9})$$

on  $h$  és la constant de Planck,  $k$  és la constant de força de l'enllaç i  $\mu$  és la massa reduïda dels àtoms implicats en l'enllaç. Així doncs, la vibració de l'enllaç depèn de la massa dels àtoms que formen part d'aquest enllaç i de la força d'aquest últim. Per tant, cada grup químic vibrarà de manera diferent i, per tant, absorbirà a una regió diferent de l'espectre electromagnètic. D'aquesta manera si un dels àtoms de l'enllaç es substitueix per un isòtop més pesat, com en el cas de la substitució d'un hidrogen per deuteri, la freqüència de la vibració serà més petita i la banda de l'espectre d'infraroig apareixerà a números d'ona més baixos. Aquesta tècnica de substitució isotòpica és normalment utilitzada en l'estudi estructural de macromolècules, sobretot per l'estudi de l'estructura secundària de proteïnes.

Els modes de vibració dels enllaços es poden classificar en diferents grups:

1. Els de tensió (*stretching*), que són aquells enllaços que vibren en la direcció de l'enllaç.
2. Els de flexió (*bending*), en els quals la vibració implica canvis en l'angle entre els dos àtoms. Aquest tipus de vibració pot ésser en el pla (*in plane*) o fora del pla (*out of plane*), segons la vibració sigui en el pla de l'enllaç o fora d'aquest.

3. Vibracions de l'esquelet. Es donen quan l'esquelet d'un grup, per exemple un anell de benzè, vibra. Es distingeix entre esquelet de tensió i esquelet de flexió.
4. Combinacions, ja siguin sumes o diferències, dels tipus vibracionals esmentats anteriorment.



**Figura III.17.** Modes de vibració dels enllaços covalents descrits en el text. **(A)** Vibració de tensió (*stretching*). **(B)** Vibració de flexió (*bending*).

La posició exacta de les bandes a les diferents regions de l'IR depèn dels següents factors:

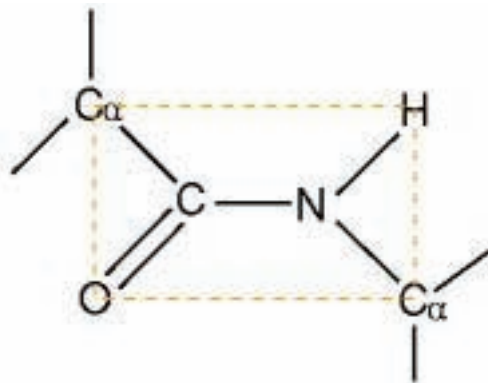
1. De la interacció del grup químic que absorbeix la radiació amb el seu entorn. Aquestes interaccions causen desplaçaments de les bandes que poden donar informació valuosa en sistemes biològics.
2. De l'acoblament de vibracions o el que és el mateix, l'acoblament de moments dipolars de la transició entre dos nivells energètics vibracionals diferents. Aquests acoblaments provoquen també desplaçaments de les bandes, que en aquest cas poden donar informació sobre la conformació de les macromolècules biològiques.

#### III. 5. 1. ii) Informació Sobre la Conformació de les Biomolècules

Mitjançant l'espectroscòpia d'IR es pot obtenir informació sobre la conformació de les macromolècules, degut al fet tot just esmentat, de l'acoblament entre les vibracions moleculars. En el cas de les macromolècules biològiques, l'acoblament entre els grups que es repeteixen al llarg del polímer, origina desdoblaments i desplaçaments de les bandes. En el cas concret de les proteïnes, es pot determinar la conformació mitjançant l'espectroscòpia d'IR, ja que les vibracions dels grups peptídics veïns no són independents sinó que estan dèbilment acoblades i la

naturalitat d'aquest acoblament està determinada pel tipus d'estructura secundària (Campbell i Dwek, 1984).

En el cas de les proteïnes, el grup químic més abundant és l'enllaç peptídic, el qual correspon a un enllaç tipus amida (*Figura III.18*). Aquest grup posseeix diferents modes de vibració, però els més rellevants són els anomenats **Amida I** i **Amida II**. L'Amida I correspon majoritàriament a la vibració de tensió de l'enllaç C=O, que absorbeix en la regió 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ; en canvi, l'Amida II correspon en un 60% a la vibració de doblegament de l'enllaç N-H i en un 40% a l'estirament de l'enllaç C-N, originant una absorció a la regió entre 1600-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Altres zones d'interès biològic són la regió 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  on es produeix l'absorció de la vibració d'estirament dels enllaços C-H de les cadenes d'àcid gras dels fosfolípids i la regió compresa entre 1750-1700  $\text{cm}^{-1}$  en la que es produeix l'absorció de grups carboxílics de les cadenes laterals d'aminoàcids i grups C=O del cap polar dels fosfolípids (Goormaghtigh *i col.*, 1994a; Goormaghtigh *i col.*, 1994b; Goormaghtigh *i col.*, 1994c).



**Figura III.18.** Representació de l'enllaç amida. El quadrat puntejat representa els àtoms que formen part de l'enllaç amida.

### III. 5. 1. iii) Els Espectres d'IR

Un espectre d'IR consisteix en una representació de l'absorbància (o la transmitància) en funció de la freqüència, expressada normalment com a número d'ones per cm ( $\text{cm}^{-1}$ ), com ja s'ha indicat abans. Existeixen dos tipus d'espectròmetres que permeten l'enregistrament d'espectres d'IR: els dispersius i els espectròmetres amb Transformada de Fourier (FTIR).

Els espectròmetres dispersius consisteixen en un prisma o reixeta de difracció que descomposa la llum policromàtica en les diferents freqüències que la formen. Després de passar per una escletxa estreta, que determina la resolució espacial del feix, cada freqüència passa de manera seqüencial per la mostra, degut a un canvi continu de l'angle que forma la reixeta de difracció amb l'angle incident, fins arribar al detector.

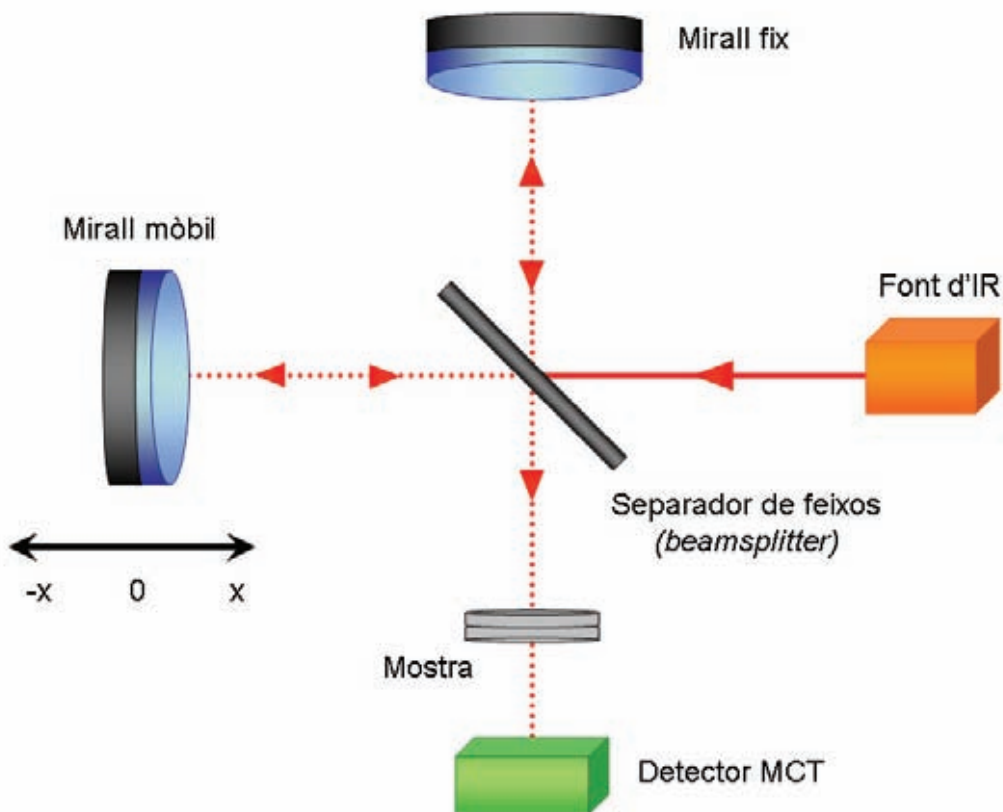
A diferència dels dispersius, els espectròmetres d'IR amb transformada de Fourier (FTIR), utilitzen en lloc d'un monocromador, variants de l'interferòmetre de Michelson, que es descriu a continuació.

### *III. 5. 1. iv) L'Interferòmetre de Michelson i l'Obtenció dels Espectres d'IR*

**L'interferòmetre de Michelson** (Figura III.19) consisteix bàsicament en dos miralls situats perpendicularment, un dels quals és mou a una velocitat constant (**mirall mòbil**) i l'altre és manté estàtic (**mirall fix**). Entre aquests dos miralls hi ha un separador de feixos (**beamsplitter**) el qual reflecteix el 50% de la radiació infraroja incident que prové de la font i deixa passar l'altre 50% d'aquesta radiació. La radiació reflectida incideix en el mirall fix mentre que la radiació transmesa incideix al mirall mòbil. Un cop reflectits els dos feixos en els dos miralls, viatgen una altra vegada cap al separador de feixos on es recombinen. Després de la recombinació, un 50% de la radiació viatjarà cap a la font de radiació, mentre que l'altre 50% de la radiació anirà cap al detector. La recombinació dels dos feixos provinents dels miralls produirà un senyal en el detector que dependrà del nombre d'ones que estiguin en fase (interferència constructiva) o en oposició de fase (interferència destructiva).

La interferència d'aquestes ones depèn de la posició del mirall mòbil. Com més gran sigui el recorregut del mirall mòbil més resolució tindrà l'espectre, però més temps trigarà en adquirir-se. D'aquesta manera s'obté un interferòmetre que dóna una relació entre la intensitat del senyal i la distància del mirall mòbil. Per obtenir una relació entre la intensitat i cada número d'ona s'aplica la transformada de Fourier. En una situació ideal en la qual el mirall mòbil es pogués moure fins a una distància infinita, la transformada de Fourier de l'interferograma resultant donaria lloc a un espectre on cada número d'ona estaria ben definit. Degut a que el mirall mòbil només es pot moure una certa distància, l'espectre resultant correspon a l'aplicació

sobre l'interferòmetre d'una funció boxcar. Això dóna lloc a un espectre amb una banda central flanquejada pels dos costats per uns lòbuls. Per tal de minimitzar aquests lòbuls laterals de l'espectre s'aplica una funció d'apodització a l'interferograma que, en el nostre cas, és la funció triangle que és la més utilitzada per l'espectroscòpia de FTIR per a mostres biològiques. La transformada de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat ens dóna l'espectre d'absorció.



**Figura III.19.** Esquema de l'interferòmetre de Michelson. Al llarg d'un escombratge, l'interferòmetre opera de la següent manera: el feix d'IR provinent de la font de radiació es divideix en dos feixos mitjançant el separador de feixos; el camí òptic d'un dels feixos es fa variar mitjançant el mirall mòbil; a continuació en el separador de feixos es recombinen per una banda el feix provinent del mirall mòbil i per l'altra el que prové del mirall fix. Finalment el feix passa a través de la mostra i arriba al detector.

L'FTIR presenta diversos avantatges respecte les tècniques dispersives. Pel que fa a l'estudi estructural de proteïnes, l'alta sensibilitat que permeten els espectròmetres FTIR fa possible l'adquisició a partir de mostres en solució aquosa.

A més, també s'obté una millor relació senyal/soroll ja que es pot augmentar fàcilment el nombre d'escombrats, qual cosa pot ser possible gràcies al fet que totes les freqüències arriben a la vegada al detector, obtenint-se un espectre en pocs



segons. Aquesta elevada relació senyal/soroll també permet l'aplicació de funcions matemàtiques, com per exemple la deconvolució, per a la resolució de bandes amples en bandes subcomponents, fet que permet l'obtenció de resultats quantitativus.

### ***III. 5. 2. Adquisició dels Espectres d'IR dels Pèptids de Fusió en DMSO***

Els espectres d'infraroig dels pèptids dissolts en DMSO es van adquirir amb un espectròmetre Mattson Polaris equipat amb un detector MCT (mercuri-cadmi-tel·luri) a una resolució nominal de  $2\text{ cm}^{-1}$ . L'espectròmetre va ser sotmès a una purga contínua d'aire sec (punt de condensació inferior a  $-60^{\circ}\text{C}$ ) i la mostra es va mantenir a una temperatura constant de  $20^{\circ}\text{C}$  mitjançant una cel·la termostetitzada per un bany Julabo Fp 50.

Els diferents pèptids de fusió dissolts en DMSO a una determinada concentració final es van dipositar entre 2 finestres de  $\text{CaF}_2$  utilitzant un espaiador de tefló de  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Per obtenir els espectres dels pèptids purs dissolts en DMSO es van acumular 400 escombrats de cadascun dels pèptids utilitzant una llançadora que compensa les bandes de vapor d'aigua residual. A continuació els espectres es van apoditzar amb una funció triangle i finalment es va realitzar la Transformada de Fourier. Seguidament es va adquirir un espectre de DMSO pur en les mateixes condicions en que es van adquirir els espectres dels pèptids. Finalment es va procedir a la resta digital de l'espectre del DMSO pur de l'espectre dels pèptids en DMSO. El criteri emprat va ser l'obtenció d'una línia base plana entre  $1900$  i  $1750\text{ cm}^{-1}$ , eliminant així les bandes de pròpies del DMSO i que absorbeixen a  $1830$  i  $1768\text{ cm}^{-1}$ .

### ***III. 5. 3. Mesures de FTIR Resoltes en el Temps***

#### ***III. 5. 3. i) Tria del Tampó***

El tampó que es va triar per formar els LUVs que posteriorment es van utilitzar en els experiments de FTIR va ser tampó deuterat  $10\text{ mM HEPES pD }7.5$ . Aquest fet es deu a que la vibració de l'enllaç O-H de l'aigua absorbeix fortament en la regió de  $3400\text{ cm}^{-1}$  i a la regió de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , regió en la qual també absorbeix l'enllaç amida. Degut al fet que l'absorció de l'aigua és molt més intensa que l'absorció de l'enllaç

amida, aquesta última queda emmascarada per l'absorció de la primera i fa molt difícil obtenir informació de l'estructura secundària dels pèptids de fusió.

Com s'ha comentat anteriorment, l'absorció d'un enllaç depèn de l'entorn en el qual es troba i de la massa reduïda dels àtoms que el formen, de manera que al substituir l'hidrogen de l'aigua per un deuteri, més pesat, la vibració de l'enllaç es desplaça cap a números d'ona menors (segons l'Eq. 9), concretament la regió  $3400\text{ cm}^{-1}$  passa a absorbir al voltant de  $2500\text{ cm}^{-1}$  i la zona de  $1650\text{ cm}^{-1}$  absorbeix al voltant de  $1200\text{ cm}^{-1}$ . D'aquesta manera la banda d'absorció a la regió de l'amida I corresponent a l'estructura secundària dels pèptids de fusió queda desemmascarada.

### *III. 5. 3. ii) Adquisició dels Espectres FTIR dels Pèptids de Fusió Resolts en el Temps*

Els espectres d'infraroig dels pèptids de fusió resolts en el temps es van adquirir amb un espectròmetre Mattson Polaris equipat amb un detector MCT (mercuri-cadmi-tel·luri) a una resolució nominal de  $2\text{ cm}^{-1}$ . L'espectròmetre va ser sotmès a una purga contínua d'aire sec (punt de condensació inferior a  $-60\text{ °C}$ ) i la mostra es va mantenir a una temperatura constant de  $20\text{ °C}$  mitjançant una cel·la termostetitzada per un bany Julabo Fp 50.

Els diferents pèptids de fusió dissolts en DMSO es van barrejar amb els LUVs de diferent composició lipídica preparats en tampó  $10\text{ mM HEPES pD } 7.5$ . La mostra es va dipositar entre 2 finestres de  $\text{CaF}_2$  utilitzant un espaiador de tefló de  $50\text{ }\mu\text{m}$  i es van acumular espectres en funció del temps utilitzant una llançadora. Es va adquirir un espectre en les mateixes condicions de la mostra però en absència de pèptid per a cadascun dels liposomes emprats (aquesta mostra contenia LUVs, DMSO i tampó  $10\text{ mM HEPES pD } 7.5$ : espectre de referència) i finalment es va procedir a la resta digital de l'espectre dels pèptids barrejats amb LUVs de l'espectre de referència. El criteri utilitzat va ser l'obtenció d'una línia base recta entre  $1900$  i  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*III. 5. 3. iii) Tractament dels Espectres de FTIR*

Els espectres de FTIR van ser adquirits amb el programa WinFirst i seguidament es van analitzar amb el programa de tractaments d'espectres Grams 32 Spectral Notebase. Cada espectre de FTIR va sofrir una sèrie de correccions: primerament es va restar la contribució del tampó i dels lípids utilitzant un espectre de referència que contenia els mateixos components que la mostra excepte pèptid de fusió. Seguidament es va restar la contribució del vapor atmosfèric residual i finalment els espectres es van suavitzar matemàticament.

### III. 6. Ajust Matemàtic dels Experiments Cinètics

Les traces de fluorescència en funció del temps resultants dels experiments d'unió a membranes i de barreja de lípids, així com les dades obtingudes per FTIR en funció del temps del canvi conformacional van ser ajustades amb el programa de tractament de dades Origin™ a les següents equacions exponencials:

$$y = y_0 - A_1 e^{-k_{app1} t} \quad (Eq. 10)$$

$$y = y_0 - A_1 e^{-k_{app1} t} - A_2 e^{-k_{app2} t} \quad (Eq. 11)$$

### III. 7. Experiments de Dispersió de la Llum

#### III. 7. 1. *Fonaments Teòrics*

Quan una molècula és irradiada per energia electromagnètica es poden produir diferents processos, com ja s'ha comentat anteriorment: absorció, fluorescència i fosforescència. Un altre procés que pot tenir lloc és la **dispersió o scattering** de la radiació incident en totes les direccions de l'espai per part de les molècules presents a la mostra, un procés que és independent de l'absorció.

Aquesta dispersió de la radiació incident depèn, entre d'altres factors, de la mida de les partícules presents a la mostra. L'anàlisi de la grandària dels liposomes, en presència de pèptid de fusió es va utilitzar per seguir l'agregació dels liposomes, un pas imprescindible perquè la fusió tingui lloc.

#### III. 7. 2. *Condicions Experimentals*

Els experiments de dispersió de la radiació incident es van realitzar amb un lector de plaques Victor<sup>V3</sup> Wallac 1440 (Perkin Elmer) a una temperatura constant de 20°C. En plaques de 96 pous es van afegir liposomes a una concentració final de 300 µM als quals es va afegir el pèptid de fusió dissolt en DMSO a diferents concentracions finals. La mostra es va deixar en agitació 1 hora perquè la fusió tingués lloc i a continuació es va mesurar la densitat òptica de cada pou a 405 nm. Totes les mostres es van corregir per la dispersió inicial de la suspensió de liposomes i per la dispersió provocada pel pèptid de fusió en absència de liposomes.

### III. 8. Experiments de Microscòpia Electrònica de Transmissió

#### III. 8. 1. *Fonaments Teòrics*

La microscòpia electrònica de transmissió (MET) es basa en irradiar la mostra amb un feix d'electrons amb un voltatge uniforme. Una part d'aquests electrons travessen la mostra, una altra part són dispersats per la mostra i finalment una altra part dóna lloc a diferents tipus d'interaccions entre els electrons i la mostra, les quals produeixen diferents fenòmens, com poden ser l'emissió de llum, l'emissió d'electrons secundaris o l'emissió de raigs X. En el cas concret de la MET s'utilitza la transmissió/dispersió d'electrons per a formar una imatge de la mostra.

La resolució màxima d'aquesta tècnica ve determinada per la longitud d'ona dels electrons amb els quals s'irradia la mostra.

Segons la dualitat ona-partícula descrita per DeBroglie, els electrons presenten també propietats d'ona i de partícula. Així doncs, un feix d'electrons pot, en determinades circumstàncies, comportar-se com una partícula o com una ona la longitud d'ona de la qual dependrà de la seva energia, segons:

$$E = h\nu \quad (\text{Eq. 12})$$

on E és la energia, h és la constant de Planck i  $\nu$  és la freqüència. La freqüència és la inversa a la longitud d'ona segons:

$$\nu = 1 / \lambda \quad (\text{Eq. 13})$$

on  $\lambda$  és la longitud d'ona. D'aquesta manera, es pot modular la longitud d'ona dels electrons variant la seva energia. Aquesta modulació de l'energia dels electrons es realitza aplicant un camp elèctric a aquest feix d'electrons ja que són partícules amb càrrega negativa.

Per tal d'accentuar l'estructura de la mostra, aquesta es tenyeix amb metalls pesants, els quals no deixen passar els electrons degut a la seva elevada densitat, per tal de donar contrast a la mostra.

### ***III. 8. 2. Condicions Experimentals***

La tècnica de tinció utilitzada en els experiments de MET va ser la **tinció negativa**. Les diferents mostres es van dipositar sobre reixetes de coure recobertes amb una capa de carboni. Aproximadament 10 µl de cada mostra es van dipositar sobre les reixetes de coure, cada mostra es va deixar 2 minuts a temperatura ambient i es va eliminar l'excés de mostra per capil·laritat amb paper de filtre. A continuació es va tenyir cada mostra amb una solució d'acetat d'uranil al 2% durant 2 minuts (també es va dipositar 10 µl de solució tenyidora) i transcorregut aquest temps es va eliminar l'excés d'acetat d'uranil per capil·laritat amb un paper de filtre.

Les mostres van ser visualitzades amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000 aplicant un voltatge constant de 75000 V.



# RESULTATS



## **IV. RESULTATS**

### **IV. 1. Interacció dels Pèptids de Fusió de la Proteïna gp41 del VIH amb Membranes Model: Unió a Membranes, Barreja de Lípids i Estudi Estructural Resolt en el Temps**

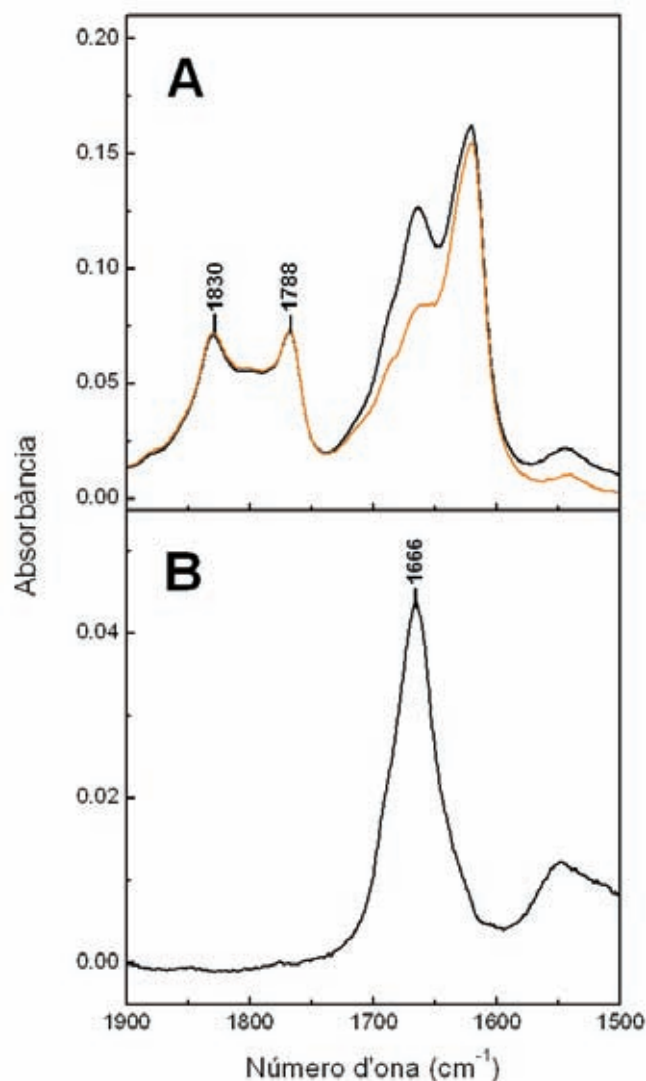
#### *IV. 1. 1. Estat d'Aggregació i Estructura Secundària dels Pèptids de Fusió en DMSO*

Tal i com s'ha comentat a la introducció, els pèptids de fusió són segments d'una proteïna de fusió vírica localitzats normalment en el seu extrem amino terminal, molt hidrofòbics i rics en residus de glicina i alanina. Aquests pèptids quan es dispersen en tampó aquós s'agreguen molt ràpidament. Així doncs, el primer que cal tenir en compte quan s'inicia un estudi amb aquest tipus de pèptids és escollir el solvent en el qual s'han de resuspendre.

Per tal de resoldre el problema de l'agregació dels pèptids de fusió en tampó aquós, una de les estratègies emprada ha estat dissoldre'ls en alcohols halogenats, com poden ser el trifluoroetanol (TFE) o l'hexafluoroisopropanol (HFIP). Utilitzar aquests alcohols com a dissolvents presenta dos inconvenients. El primer és que aquests alcohols són extremadament volàtils, la qual cosa provoca variacions en la concentració de pèptid. El segon inconvenient i el més important és que aquests alcohols halogenats indueixen la formació d'estructures helicoïdals (Dwyer, 1999).

L'altra estratègia utilitzada per tal d'evitar el problema de l'agregació ha estat dissoldre els pèptids de fusió en dimetilsulfòxid (DMSO). Tot i que en la majoria de treballs els pèptids de fusió es troben inicialment dissolts en DMSO, no existeixen dades definitives ni de l'estat d'agregació, ni de l'estructura que adoptarien els pèptids de fusió en aquest solvent. Únicament existeix un treball a la literatura realitzat per Martin i col. (1996) en el qual es descriu que el pèptid de fusió de 16 residus dissolt en DMSO estaria estructurat en forma de fulla  $\beta$  agregada tot i que aquest resultat podria ser un artefacte de la mesura.

Per tant, ens vàrem proposar la caracterització estructural dels pèptids de fusió dissolts en DMSO mitjançant espectroscòpia d'IR (*Figura IV.1*). La *Figura IV.1 B* mostra l'espectre d'IR del pèptid de fusió FP16 dissolt en DMSO.



**Figura IV.1.** Espectre de FTIR del FP16 en DMSO. **(A)** Espectre del DMSO pur (taronja) i espectre FTIR del pèptid dissolt en DMSO (negre). Es mostra la regió de l'amida I i de l'amida II. Les bandes corresponents al DMSO pur, a  $1830\text{ cm}^{-1}$  i  $1788\text{ cm}^{-1}$ , es van fer servir com a referència per a la resta. **(B)** Espectre FTIR del FP16 dissolt en DMSO després de realitzar la resta del DMSO. La concentració final del FP16 va ser de 1 mM. La temperatura va ser  $20^{\circ}\text{C}$ .

L'espectre d'IR del pèptid de fusió FP16 dissolt en DMSO presentà un màxim d'absorció a  $1666\text{ cm}^{-1}$ . Segons un estudi realitzat per Jackson i Mantsch (1991) sobre l'estructura de pèptids i proteïnes dissoltes en DMSO, aquest màxim és característic d'una estructura monomèrica i no-ordenada. En DMSO, els grups N-H de l'enllaç amida tindrien més tendència a formar ponts d'hidrogen amb els grups S=O del solvent que no pas amb els grups carbonils d'altres enllaços peptídics. Aquesta influència del solvent afavoriria l'estat monomèric.

Els pèptids de fusió FP23-Ac i FP23-H van presentar uns espectres de FTIR amb un màxim centrat al voltant de  $1666\text{ cm}^{-1}$ , indicant que quan es troben dissolts en DMSO també presenten una estructura no-ordenada i monomèrica.

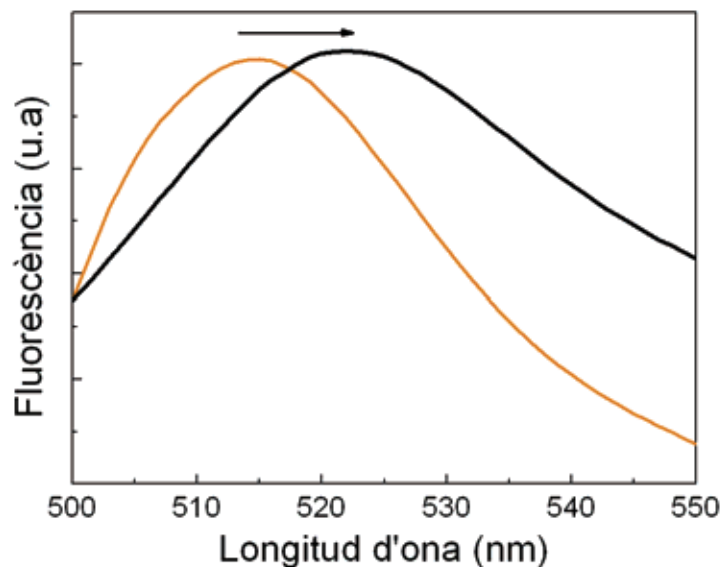
#### *IV. 1. 2. Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model*

És sabut que els pèptids de fusió del VIH interaccionen amb membranes model i cel·lulars (Cladera *i col.*, 2001). En el present treball, ens proposarem realitzar un estudi comparatiu de les tres seqüències peptídiques més àmpliament descrites a la literatura (FP16, FP23-Ac i FP23-H) utilitzant un únic sistema de membranes model constituïdes per PC i PE.

La unió dels pèptids de fusió a membranes model formades de PC/PE (1:1) es va monitorar utilitzant la sonda fluorescent FPE (a una concentració final de 0.25 mol%). Aquesta sonda, com s'ha descrit anteriorment (*Mètodes Experimentals III. 4. 2. i*) és sensible al potencial electrostàtic de superfície de manera que variacions en la magnitud d'aquest potencial com a conseqüència, per exemple, de la interacció de càrregues amb la superfície de la membrana, produeixen una variació en la seva fluorescència.

#### *IV. 1. 2. i) Inserció de la Sonda FPE a Membranes Model*

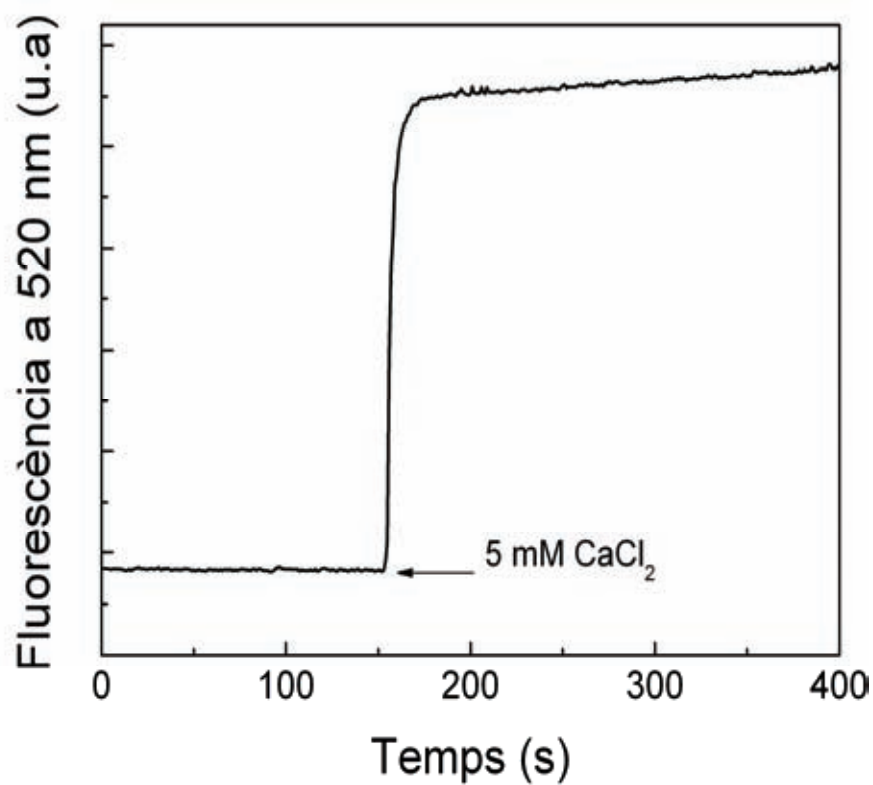
Tal i com passa amb tots els fluoròfors, la fluorescència de la sonda FPE depèn de l'entorn en la qual es troba, de manera que al passar d'un entorn polar a un entorn més apolar es produeix un desplaçament de l'espectre d'emissió cap al vermell, és a dir, cap a longituds d'ona més grans. La *Figura IV.2* mostra l'espectre d'emissió de la fluoresceïna en solució aquosa i l'espectre d'emissió de la FPE incorporada a la membrana dels LUVs. La fluoresceïna en solució va presentar el màxim del seu espectre d'emissió a 515 nm mentre que el màxim d'emissió de la FPE incorporada als LUVs va ser de 523 nm. Aquest desplaçament cap al vermell de l'espectre d'emissió de la fluoresceïna indica que la FPE s'ha incorporat a la membrana dels LUVs.



**Figura IV.2.** Espectre d'emissió de la fluoresceïna en solució aquosa (línia taronja) i de la FPE incorporada a LUVs formats de PC/PE (1:1) (línia negra). La concentració final de LUVs va ser 300  $\mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

#### IV. 1. 2. ii) Control de la Resposta de la FPE a Variacions del Potencial Electrostàtic de Superfície

La sonda FPE respon a variacions del potencial electrostàtic de superfície. Concretament, la interacció de càrregues positives, que fan el potencial de superfície més electropositiu, produeixen un augment en la fluorescència de la FPE. La *Figura IV.3* mostra l'augment en la fluorescència de la sonda FPE en funció del temps al afegir  $\text{CaCl}_2$ , a una concentració final de 5 mM, a una suspensió de liposomes marcats amb FPE. Els cations  $\text{Ca}^{2+}$  s'uneixen a la superfície de la membrana fent el potencial de superfície més electropositiu i, per tant, la fluorescència de la FPE augmenta. Així doncs, l'addició de cations  $\text{Ca}^{2+}$  serveix de control per demostrar que els LUVs marcats amb FPE responen a la unió de molècules amb càrrega positiva a les membranes.

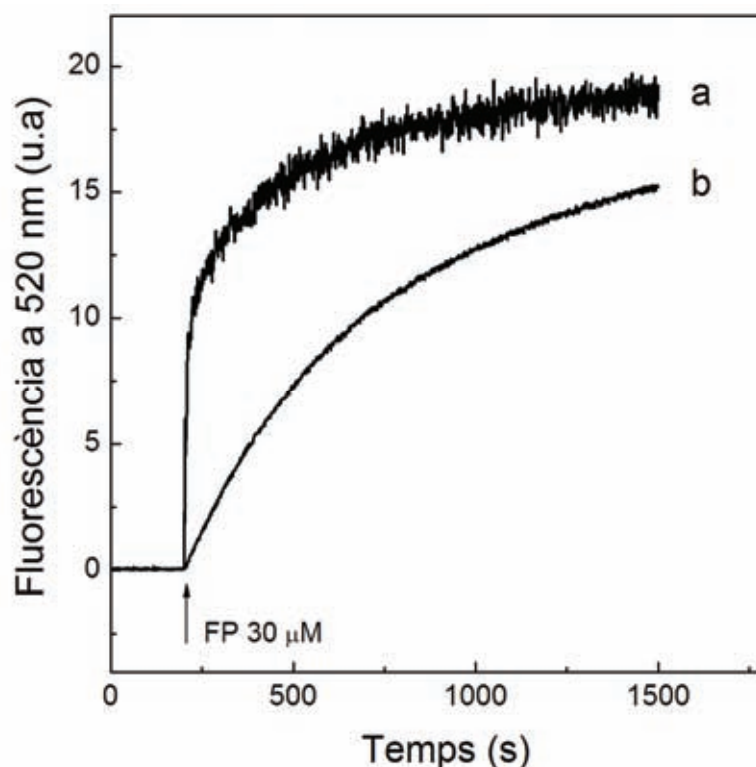


**Figura IV.3.** Augment en la fluorescència de la sonda FPE a 520 nm en funció del temps al afegir CaCl<sub>2</sub>, a una concentració final de 5 mM, a LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb FPE. La concentració final de LUVs va ser 300 μM en tampó TRIS 10 mM pH 7.5. La temperatura va ser 20°C

IV. 1. 2. iii) Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model

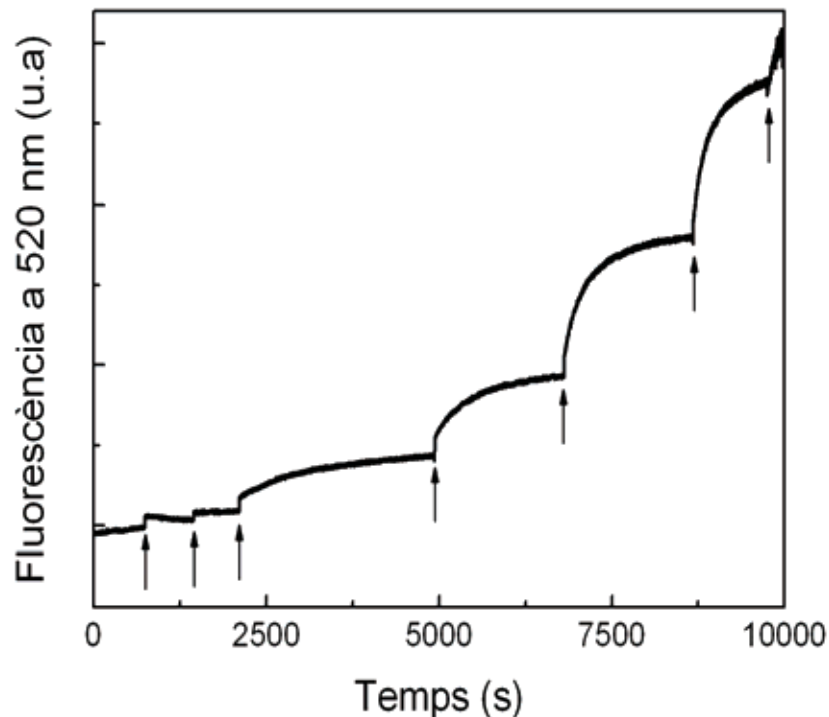
La *Figura IV.4* mostra la variació de la fluorescència de la FPE que es produeix en afegir 30  $\mu\text{M}$  del pèptid de fusió a una suspensió de liposomes de PC/PE (1:1) marcats amb la sonda fluorescent FPE a una concentració final de 300  $\mu\text{M}$  de lípid.

Tal i com passava en el cas dels ions  $\text{Ca}^{2+}$ , al addicionar el pèptid de fusió a la suspensió de LUVs marcats amb FPE, es produeix un augment en la fluorescència de la sonda degut a la interacció dels pèptids amb les membranes les quals varien el seu potencial de superfície. Aquesta variació del potencial de superfície es produeix, segons el pèptid afegit, a les càrregues positives, bé de l'extrem amino terminal (FP16 i FP23-H), o bé als residus d'arginina de la posició 22 (FP23-Ac i FP23-H). La fluorescència de la FPE augmenta fins a assolir un *plateau*. Per tal de calcular les constants cinètiques aparents de les diferents cinètiques d'unió obtingudes, les dades van ser ajustades a una funció exponencial simple o doble depenent del pèptid de fusió (*Eq. 10* i *Eq. 11*), descrites anteriorment (*Mètodes Experimentals III. 6.*). Les constants obtingudes dels ajustos es presenten a la *Taula 4*.



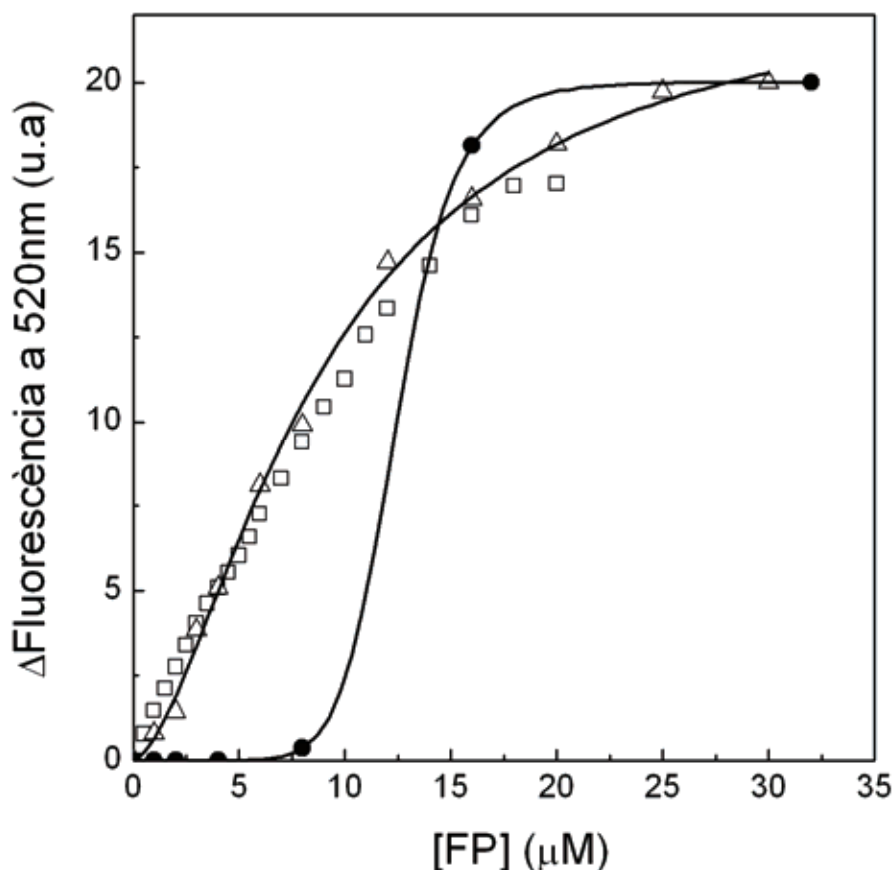
**Figura IV.4.** Unió dels FP a LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb FPE. Variació de fluorescència en funció del temps després de l'addició dels FP a una concentració final de 30  $\mu\text{M}$  (a) FP23-Ac (el pèptid de fusió FP16 va donar una cinètica molt similar al FP23-Ac). (b) FP23-H. La concentració final de LUVs va ser 300  $\mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

La *Figura IV.5* mostra la variació de la fluorescència en funció del temps, en afegir concentracions creixents de pèptids de fusió.



**Figura IV.5.** Variació de la fluorescència de la sonda FPE en funció del temps al·l'afegir concentracions creixents del FP23-H (indicat per les fletxes) a una suspensió de LUVs formats de PC/PE (1:1). La concentració final de LUVs va ser 300  $\mu$ M en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

La representació de la variació de la fluorescència de la FPE acumulada en funció de la concentració de pèptid de fusió afegit permet obtenir les corbes d'unió d'aquests pèptids a membranes model (*Figura IV.6*). Tal i com s'ha descrit anteriorment (*Mètodes Experimentals III. 4. 2. i. c*), aquestes corbes es poden ajustar a dos models diferents d'unió, i de l'ajust de les dades se'n pot deduir la constant de dissociació del procés ( $K_d$ ) que dona informació de l'afinitat dels pèptids de fusió per a les membranes.



**Figura IV.6.** Unió dels pèptids de fusió a LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb FPE. Els canvis en la variació de fluorescència acumulada en funció de la concentració de pèptid de fusió addicionat es van utilitzar per a obtenir les corbes d'unió: FP16 (triangles blancs), FP23-Ac (quadrats blancs) i FP23-H (cercles negres). Les línies representen l'ajust matemàtic utilitzant l'Eq. 5 per al FP16 i per al FP23-Ac i l'Eq. 6 per al FP23-H. La concentració de LUVs va ser 300 μM en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

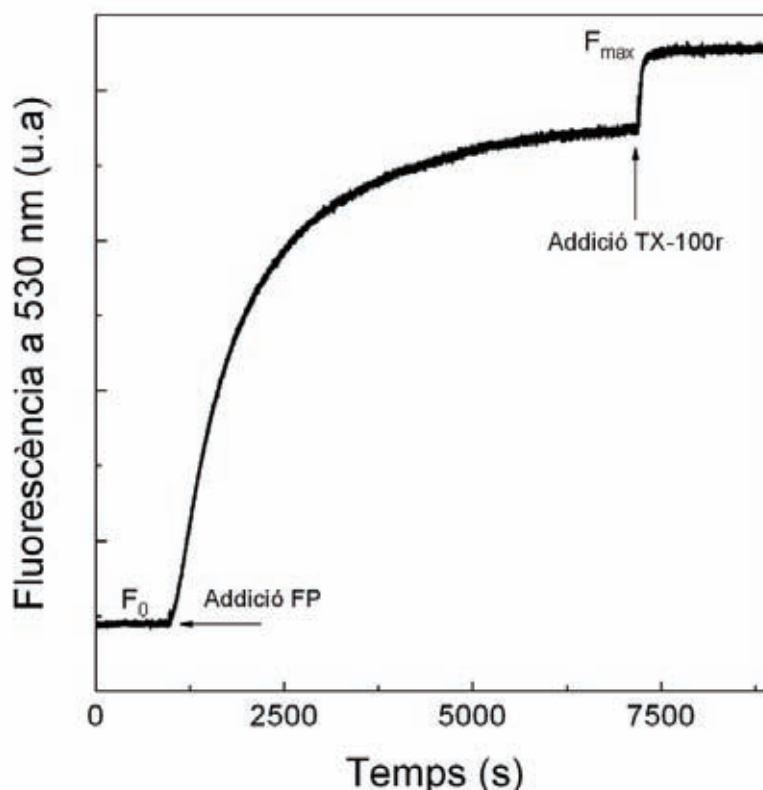
La corba d'unió del FP16 va ser consistent amb una corba d'unió del mateix pèptid publicada prèviament utilitzant la mateixa tècnica (Cladera *i col.*, 2001). Els resultats mostren una clara interacció d'aquest pèptid amb la superfície de la membrana, amb una constant de dissociació de 10 μM. La corba d'unió del FP23-Ac va mostrar un patró molt similar. En els dos casos les corbes d'unió presenten un marcat caràcter hiperbòlic (Eq. 5) i no presenten cap mena de cooperativitat. En canvi, la corba d'unió del FP23-H és clarament sigmoïdal (Eq. 6), presentant una constant de dissociació de 12 μM i un coeficient de Hill de 9. Aquest coeficient podria relacionar-se amb la formació de trímers de trímers o nonàmers de pèptid de fusió, els quals interaccionen amb les membranes.



### IV. 1. 3. Barreja de Lípids Induïda pels Pèptids de Fusió

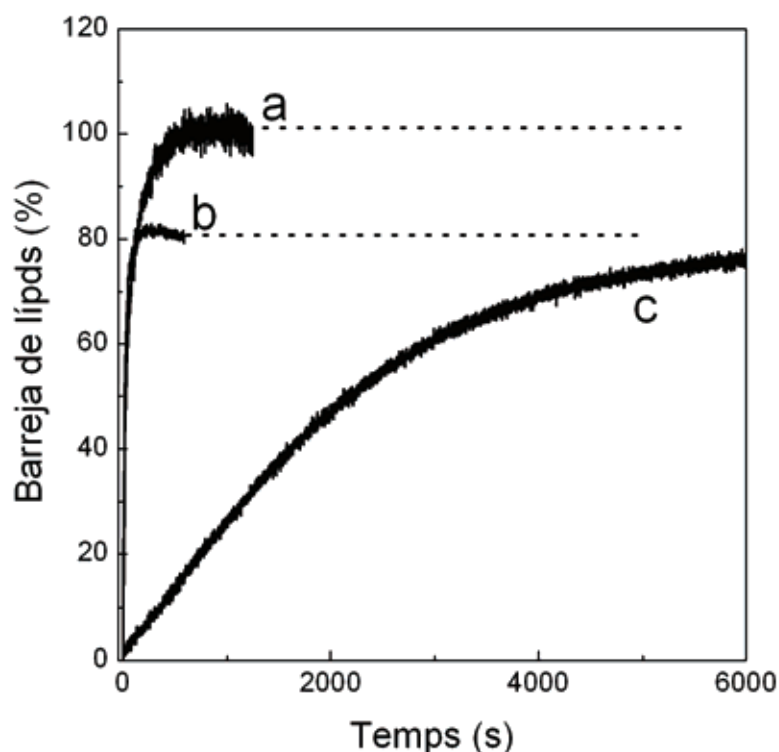
Un cop caracteritzada la unió d'aquests pèptids a les membranes model, es va procedir a l'estudi de la seva capacitat per induir barreja de lípids en una suspensió de membranes. Aquests experiments es fonamenten en la transferència d'energia per ressonància de fluorescència (FRET) (Mètodes Experimentals III. 4. 3. ).

La Figura IV.7 mostra l'increment de fluorescència de la sonda NBD-PE com a conseqüència de la disminució de la transferència d'energia cap a la sonda Rh-PE. Aquesta disminució de la transferència d'energia es produeix degut a la dilució de les sondes en barrejar-se les bicapes lipídiques, com a conseqüència de l'addició del pèptid de fusió. Un cop assolit el *plateau*, on la barreja de lípids ha assolit el seu màxim, s'addiciona a la suspensió TX100 reduït, que solubilitza els liposomes obtenint-se el màxim de fluorescència possible. Un cop obtingudes les dades per als tres pèptids de fusió es van transformar (Eq. 7) per tal d'obtenir les cinètiques de la barreja de lípids expressades com a percentatge.



**Figura IV.7.** Experiment de la FRET de LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb NBD-PE/Rh-PE . La concentració de LUVs va ser 300  $\mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C. Les fletxes indiquen l'addició de pèptid de fusió FP23-H a una concentració final de 30  $\mu\text{M}$  i de TX100 reduït a una concentració final de 0.1% (v/v).  $F_{max}$  indica la fluorescència després de l'addició del FP i del TX100 i  $F_0$  representa la fluorescència inicial dels LUVs marcats amb NBD-PE/Rh-PE.

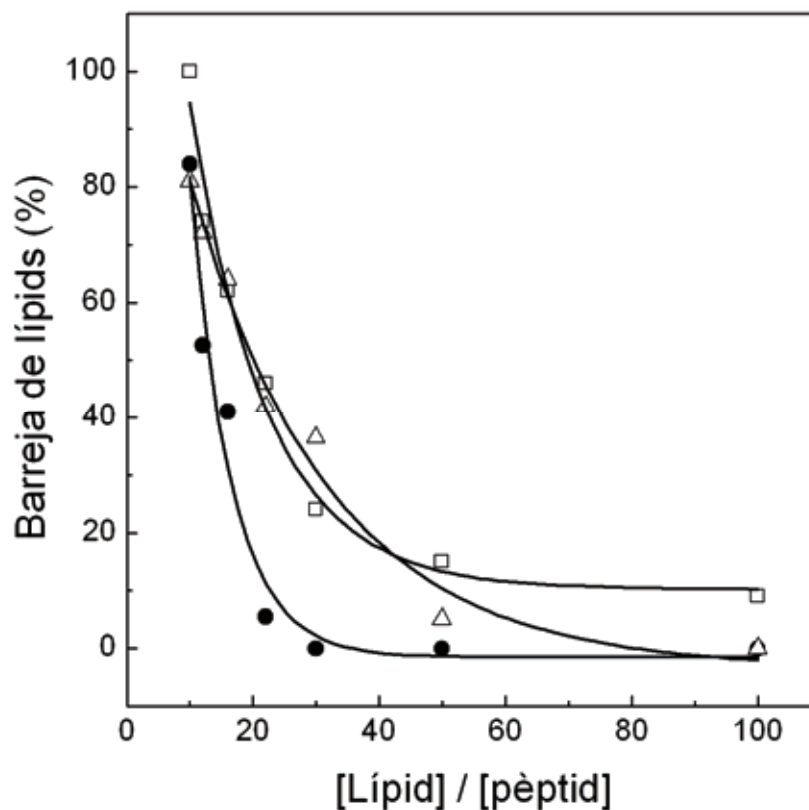
La *Figura IV.8* mostra la cinètica del procés de barreja de lípids per als tres pèptids de fusió afegits, a una concentració final de  $30 \mu\text{M}$ , a una suspensió de liposomes els quals es trobaven a una concentració final de lípid de  $300 \mu\text{M}$ . Les cinètiques obtingudes per al FP16 i per al FP23-Ac van ser molt similars. En canvi, el FP23-H presentà una cinètica en la barreja de lípids molt més lenta que els altres dos pèptids.



**Figura IV.8.** Barreja de lípids en funció del temps provocada per l'addició de  $30 \mu\text{M}$  de pèptid de fusió (a) FP23-Ac, (b) FP16 i (c) FP23-H a una suspensió de LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb NBD-PE/Rh-PE. La concentració final de LUVs va ser  $300 \mu\text{M}$  en tampó  $10 \text{ mM TRIS pH } 7.5$ . La temperatura va ser  $20^\circ\text{C}$ .

Les cinètiques de la barreja de lípids també es van ajustar a les funcions exponencials, simple o doble (*Eq. 10* i *Eq. 11*) descrites anteriorment (*Mètodes Experimentals III. 6.*) segons el pèptid de fusió, tal i com ja s'havia realitzat per a les cinètiques d'unió. Les constants obtingudes dels ajustos es presenten també a la *Taula 4*.

La *Figura IV.9* mostra els resultats de la barreja de lípids en funció de la relació molar lípid/pèptid, observant-se que a relacions a les quals el FP23-H no induïx barreja de lípids ( $>20$ ) sí que ho fan el FP23-Ac i el FP16.

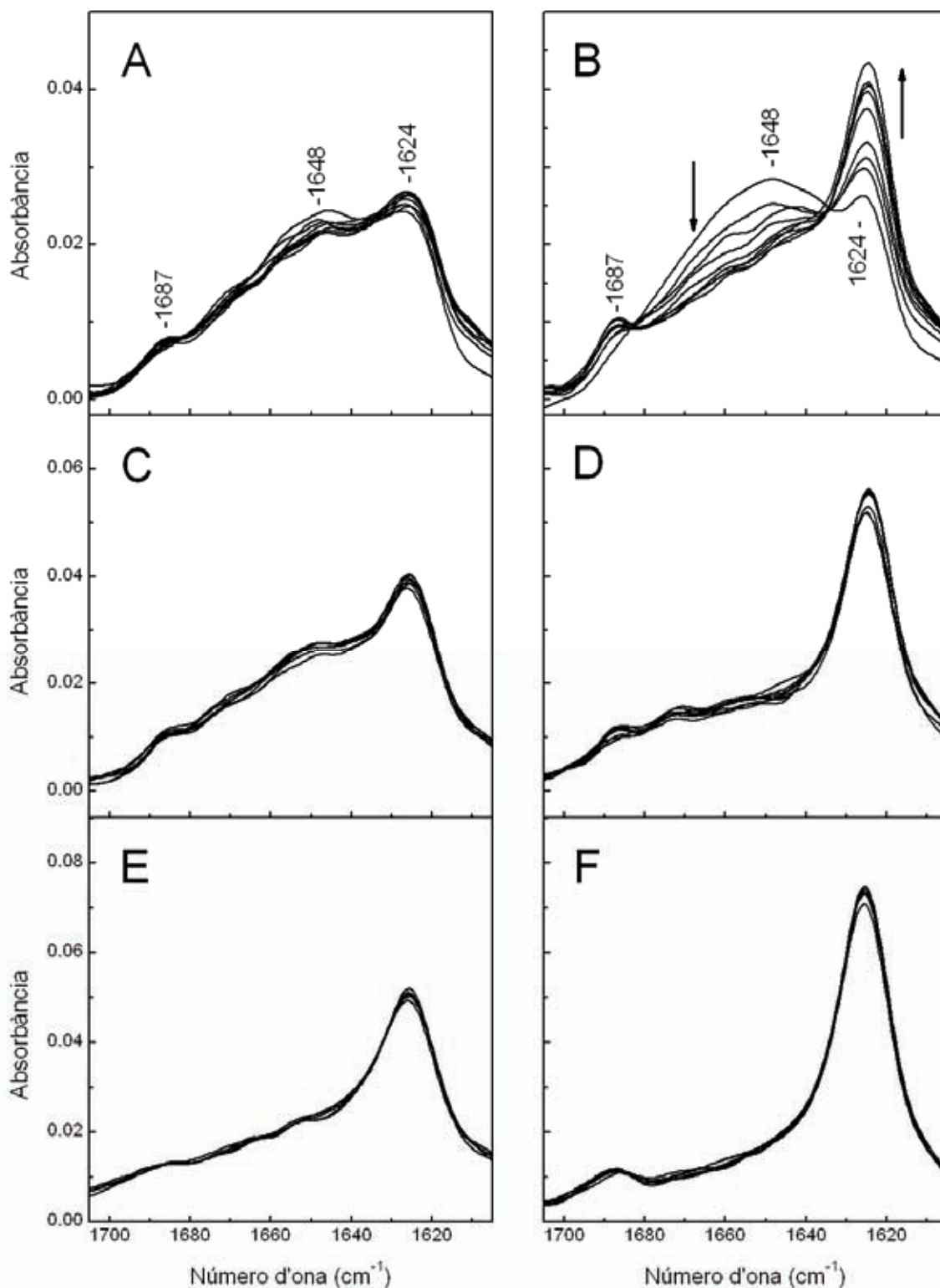


**Figura IV.9.** Percentatge de barreja de lípids en funció de la relació molar lípid/pèptid provocada per l'addició a diferents concentracions finals de pèptid de fusió: FP16 (triangles blancs), FP23-Ac (quadrats blancs) i FP23-H (cercles negres). La concentració de LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb NBD-PE/Rh-PE va ser 300  $\mu$ M en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

#### *IV. 1. 4. Canvis Estructurals dels Pèptids de Fusió Deguts a la Interacció amb les Membranes Model*

Un cop realitzats els estudis funcionals d'unió i de barreja de lípids, es va procedir a l'estudi de l'estructura secundària dels diferents pèptids de fusió tant en presència com en absència de membranes model mitjançant espectroscòpia d'IR.

La *Figura IV.10* mostra els espectres d'IR en funció del temps dels diferents pèptids de fusió en tampó deuterat, en absència i presència de membranes.



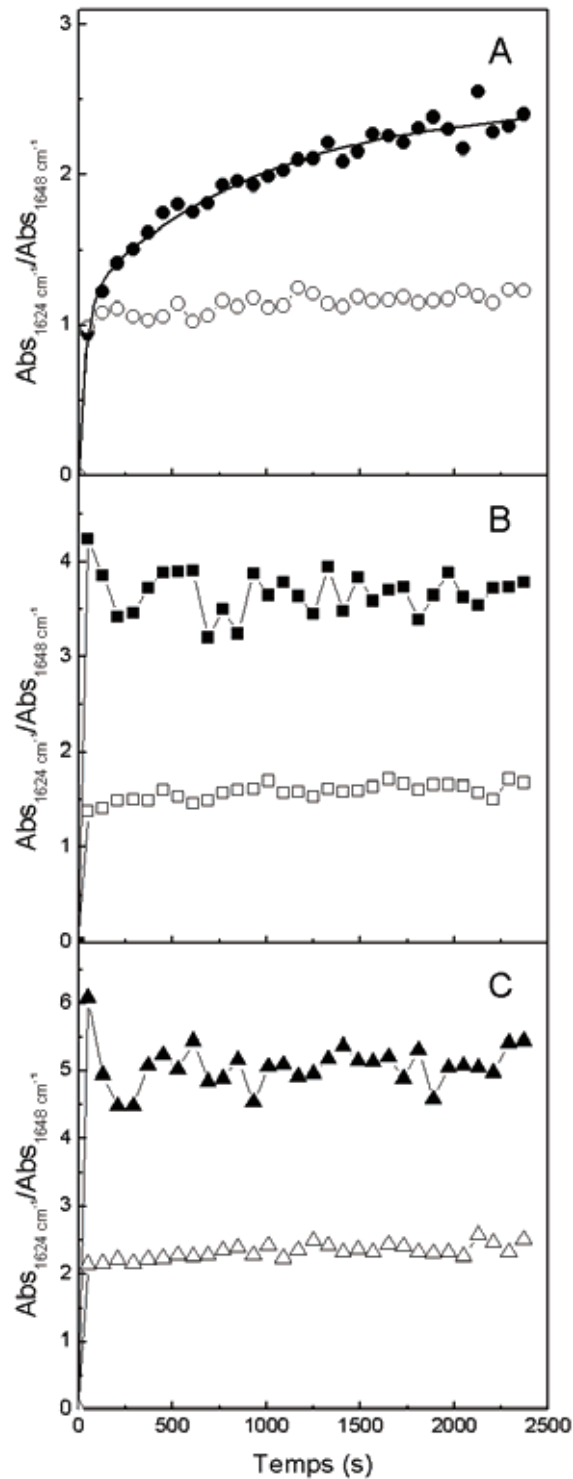
**Figura IV.10.** Efecte de l'addició de pèptid de fusió (a una concentració final de 1mM) en tampó 10mM HEPES deuterat pD 7.5 (**A, C, E**) i a suspensions de LUVs formats de PC/PE (1:1) (a una concentració final de 10 mM) en el mateix tampó (**B, D, F**) mesurats mitjançant FTIR. Els espectres van ser adquirits en funció del temps per als diferents pèptids de fusió: (**A, B**) FP23-H. (**C, D**) FP23-Ac. (**E, F**) FP16. Cadascun dels espectres és la mitjana de 10 espectres. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. Es va adquirir un espectre cada 80 segons. La temperatura va ser 20°C. El temps mort de l'experiment va ser de 50s. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

Els espectres corresponents al FP23-H en tampó (*Figura IV.10 A*) presenten dos components principals: una banda centrada cap a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , la qual pot ser assignada a estructura  $\beta$  agregada intermolecular i una altra banda ampla amb un màxim entre  $1645$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  assignable, segons la literatura, a una barreja d'estructura helicoïdal (hèlix  $\alpha$  i hèlix de poliprolines de tipus II) i no-ordenada (Byler i Susi, 1986; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2001; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2003). La successió dels espectres consecutius mostra que la barreja d'estructures no-ordenades, helicoïdals i  $\beta$  agregades intermoleculars no varia significativament al llarg del temps.

En dissoldre el FP23-Ac en tampó deuterat (*Figura IV.10 C*), els espectres d'infraroig revelen els mateixos components estructurals que en el cas del FP23-H, però amb una quantitat d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada reduïda en favor de l'estructura  $\beta$  agregada intermolecular. Aquest mateix efecte es fa més evident en el cas del FP16 dissolt en tampó (*Figura IV.10 E*). En aquest cas la característica que domina els espectres és una banda intensa centrada a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , mentre que només hi ha un component residual a  $1645$ - $1650\text{ cm}^{-1}$ . En aquests dos últims casos la intensitat de les bandes tampoc va canviar al llarg del temps.

D'altra banda, quan els pèptids dissolts en DMSO es barregen amb una suspensió de membranes formades de PC/PE (1:1) (*Figura IV.10 B, D, F*) es forma més estructura  $\beta$  agregada que quan en els pèptids es dissolen en tampó aquós a la mateixa concentració final. En el cas del FP23-H (*Figura IV.10 B*) es detecta clarament l'augment d'intensitat de la banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$  (estructures  $\beta$  agregades) i una disminució d'intensitat de la banda a  $1648\text{ cm}^{-1}$  (estructures helicoïdals i no-ordenades). En el cas del FP23-Ac (*Figura IV.10 D*) i del FP16 (*Figura IV.10 F*), les seqüències dels espectres de FTIR mesurats mostren que la formació d'estructura  $\beta$  agregada en presència de membranes és un procés que té lloc abans dels 50 primers segons (temps mort del sistema de mesura).

Per tal de comparar millor les cinètiques de formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular, es va representar la relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  (corresponent a estructura  $\beta$  agregada intermolecular) i  $1648\text{ cm}^{-1}$  (corresponent a estructura helicoïdal més estructura no-ordenada) en funció del temps. Els resultats obtinguts es mostren a la *Figura IV.11*.



**Figura IV.11.** Representació de la relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  obtingudes a partir de la *Figura IV.10* en funció del temps per a cadascun dels pèptids de fusió estudiats en funció del temps. **(A)** FP23-H. **(B)** FP23-Ac. **(C)** FP16. Els símbols negres representen la interacció dels pèptids de fusió (1mM concentració final) amb LUVs formats de PC/PE (1:1) a una concentració final de 10 mM (L/P = 10); i els símbols blancs representen la cinètica de l'addició dels pèptids de fusió a tampó deuterat 10 mM HEPES pD 7.5. Els símbols negres de la *Figura IV.11 A* van ser ajustats a una funció exponencial doble (Eq. 11). La temperatura va ser  $20^{\circ}\text{C}$ . El temps mort de l'experiment va ser de 50 s.

Per al pèptid FP23-H (*Figura IV.11 A*), els punts experimentals corresponents al pèptid barrejat amb membranes poden ser ajustats a un procés exponencial doble (*Eq. 11*). Les constants calculades a partir dels ajustos es presenten també a la *Taula 4*. Sembla clar a partir de les dades experimentals que en presència de membranes es produeix primer un procés ràpid, coincidint amb la formació d'agregats peptídics en el tampó aquós, seguit d'un procés més lent en el qual es forma més estructura  $\beta$  agregada intermolecular.

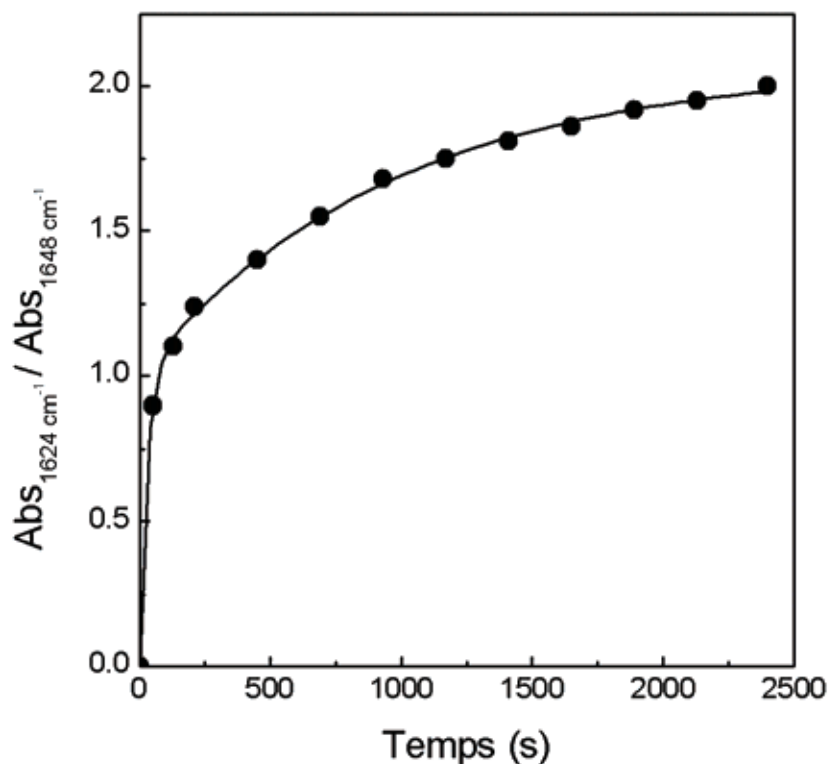
Les dades mostren que, en tots els casos, la formació d'estructures  $\beta$  respecte els altres tipus d'estructures és més del doble quan els pèptids es troben barrejats amb membranes que quan es troben en tampó deuterat sol. A més, els resultats també indiquen clarament que la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular és un procés molt ràpid que es completa dins del temps mort del sistema de detecció (primers 50 segons) per al FP16 (*Figura IV.11 B*) i al FP23-Ac (*Figura IV.11 C*) quan es barregen amb membranes formades de PC/PE (1:1).

#### ***IV. 1. 5. Efecte de la Variació de la Relació Molar Lípid/Pèptid en les Constants Cinètiques Derivades dels Estudis de FTIR***

Un dels problemes més grans a l'hora de comparar les dades cinètiques d'estudis estructurals obtingudes a partir dels estudis de FTIR (*Figura IV.11*) amb les dades funcionals obtingudes dels estudis de fluorescència (en aquest cas, unió a membranes model i barreja de lípids, *Figura IV.4* i *Figura IV.8*, respectivament) és la diferència de concentracions en les que es realitzen els dos tipus d'experiments.

En el present treball la concentració de lípid i de pèptid utilitzada en els estudis estructurals per espectroscòpia d'IR va ser 33 vegades superior a les concentracions emprades en els estudis de fluorescència. Per tractar de resoldre aquest conflicte de concentracions es va mantenir constant la relació molar lípid/pèptid ( $L/P = 10$ ) en totes les mesures realitzades i poder així realitzar un estudi comparatiu de les cinètiques obtingudes en els tres tipus d'experiments. Aquesta aproximació assumeix que la diferència de concentracions no afectarà els paràmetres cinètics si es manté constant la relació molar lípid/pèptid. Per tal de provar la validesa de l'aproximació, es va mesurar el canvi conformacional del pèptid de fusió FP23-H barrejat amb membranes model a una concentració de pèptid 10 vegades menor però mantenint constant la relació molar lípid/pèptid i es van calcular les constants

aparents del procés (Figura IV.12). Tal i com es descriu al peu de figura, les constants cinètiques derivades de l'ajust utilitzant l'Eq. 11 van ser molt similars a les obtingudes anteriorment per al FP23-H a major concentració.



**Figura IV.12.** Representació de la relació d'intensitats a 1624 cm<sup>-1</sup> i 1648 cm<sup>-1</sup> del pèptid de fusió FP23-H (0.1 mM concentració final) quan es barreja amb LUVs formats de PC/PE (1:1) a una concentració final de 1 mM (L/P = 10). Les dades experimentals van ser ajustades a una funció exponencial doble (Eq. 11). Les constants aparents derivades de l'ajust van ser  $k_{app1} = 3.7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{app2} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Les condicions experimentals van ser les mateixes que les de la Figura IV.10.

#### IV. 1. 6. Comparació dels Processos d'Unió a Membranes, Barreja de Lípids i Formació d'Estructura $\beta$

El càlcul de les constants cinètiques aparents a partir dels ajustos de les cinètiques d'unió, barreja de lípids i canvi estructural a equacions exponencials (Taula 4) permet comparar aquests tres processos i determinar la seqüència d'esdeveniments que porta a la fusió de membranes.



	$k_{app1}, k_{app2} (s^{-1})$		
	Unió a membranes	$\rightarrow \beta^a$	Barreja de lípids
FP23-H	$2.5 \times 10^{-3}$ $4.2 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-2}$ $1.03 \times 10^{-3}$	$1.87 \times 10^{-4}$
FP16	$2 \times 10^{-2}$ $7.6 \times 10^{-3}$	nd <sup>b</sup>	$5 \times 10^{-2}$ $8.55 \times 10^{-3}$
FP23-Ac	$10^{-1}$ $3 \times 10^{-3}$	nd <sup>b</sup>	$5 \times 10^{-2}$ $6.25 \times 10^{-3}$

**Taula 4.** Constants aparents ( $k_{app}$ ) calculades a partir dels ajustos matemàtics de les traces cinètiques de les figures d'unió (*Figura IV.4*), de canvi estructural (*Figura IV.11 A*) i de barreja de lípids (*Figura IV.8*) a funcions exponencials (*Eq. 10* i *Eq. 11*). <sup>a</sup>canvi estructural: d'estructura helicoïdal i no-ordenada a estructura  $\beta$  agregada. <sup>b</sup>no determinat.

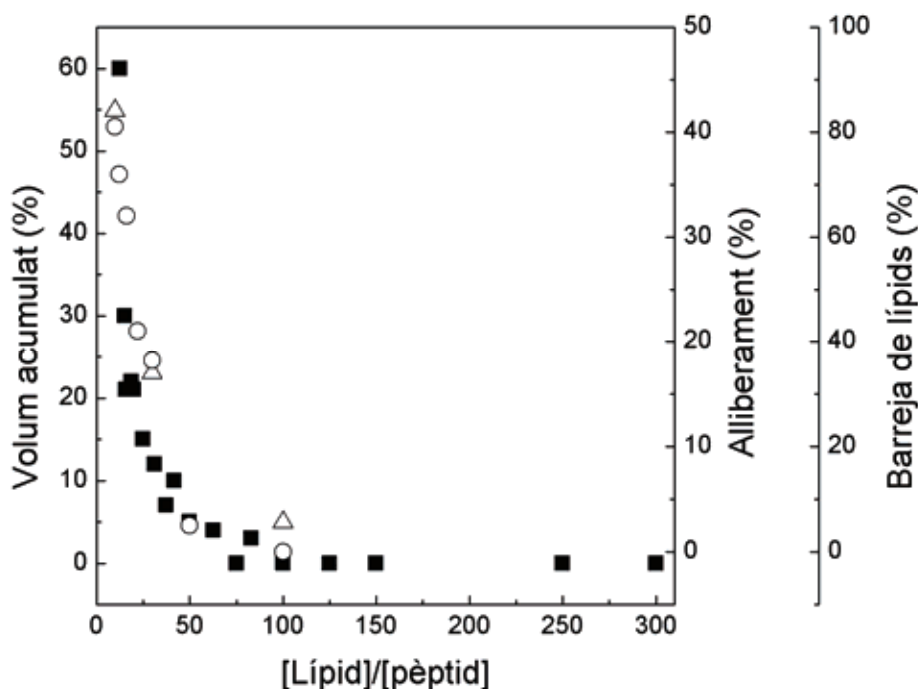
De l'ajust de les dades de FTIR del pèptid FP23-H se'n deriven dues constants aparents ( $k_{app1}$  i  $k_{app2}$ ): la primera constant ( $2.6 \times 10^{-2} s^{-1}$ ) és consistent amb la formació d'agregats en tampó HEPES tal i com es mostra a la *Figura IV.11 A* (cercles negres); la segona constant ( $1.03 \times 10^{-3} s^{-1}$ ) representa un procés més lent que coincideix amb la constant més ràpida del procés d'unió,  $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ . Finalment, la barreja de lípids va presentar una constant aparent de  $1.87 \times 10^{-4} s^{-1}$ , un valor molt similar a la constant més lenta del procés d'unió,  $4.2 \times 10^{-4} s^{-1}$ . Els canvis lents en la fluorescència de la FPE podrien reflectir l'efecte de la barreja de lípids en la fluorescència d'aquesta sonda, incloent potser la reorganització del pèptid en la superfície de la membrana. Les dades cinètiques obtingudes semblen indicar que primer es produiria la formació d'estructura  $\beta$  agregada en tampó. A continuació, el pèptid interaccionaria amb les membranes produint-se més estructura  $\beta$  i un cop s'hagués produït aquest canvi conformacional, tindria lloc la barreja de lípids.

D'altra banda, les dades experimentals de la formació d'estructura  $\beta$  agregada corresponents als pèptids FP16 i FP23-Ac no es poden ajustar a les equacions exponencials degut a l'absència de dades en els 50 primers segons (temps mort de les mesures). Tot i això, a partir dels resultats obtinguts, es pot concloure que la constant cinètica del canvi estructural associat a la interacció amb les membranes ha de ser més gran o com a màxim igual que la constant de temps calculada per la primera constant del procés d'unió (el canvi estructural associat a membranes no es pot donar abans de la unió del pèptid a les mateixes). Es pot assumir, doncs, que també en aquest cas les molècules de pèptid adopten una estructura  $\beta$  agregada

quan s'uneixen a les membranes. A més, ambdós pèptids, FP16 i FP23-Ac, presenten constants cinètiques aparents molt similars per als processos d'unió i de barreja de lípids, a diferència del FP23-H, en el qual la barreja de lípids era un procés més lent que la unió. Tot sembla indicar que la barreja de lípids es produiria al mateix temps que la unió a les membranes i a la formació d'estructura  $\beta$  agregada.

#### ***IV. 1. 7. Fusió de Membranes, Agregació de Liposomes i Alliberament de Continguts Induïts pels Pèptids de Fusió***

Segons alguns treballs anteriors (Nir i Nieva, 2000) la inducció de fusió de membranes per part dels pèptids de fusió és concomitant amb un procés d'agregació de vesícules i de desestabilització de l'estructura de la bicapa que comporta l'alliberament (*leakage*) al medi del contingut de les vesícules. Per aquest motiu, ens plantejarem comparar les dades de barreja de lípids i de permeabilitat de membrana i aquestes dues amb la mesura de la mida de les vesícules en funció de la relació molar lípid/pèptid (*Figura IV.13*). Els resultats mostren que quan disminueix la relació molar lípid/pèptid, s'incrementa el percentatge de liposomes amb un diàmetre major respecte el total de liposomes. Aquest fet indicaria que l'agregació de liposomes aniria acompanyada d'una desestabilització de la membrana, tal i com mostren els resultats d'alliberament.

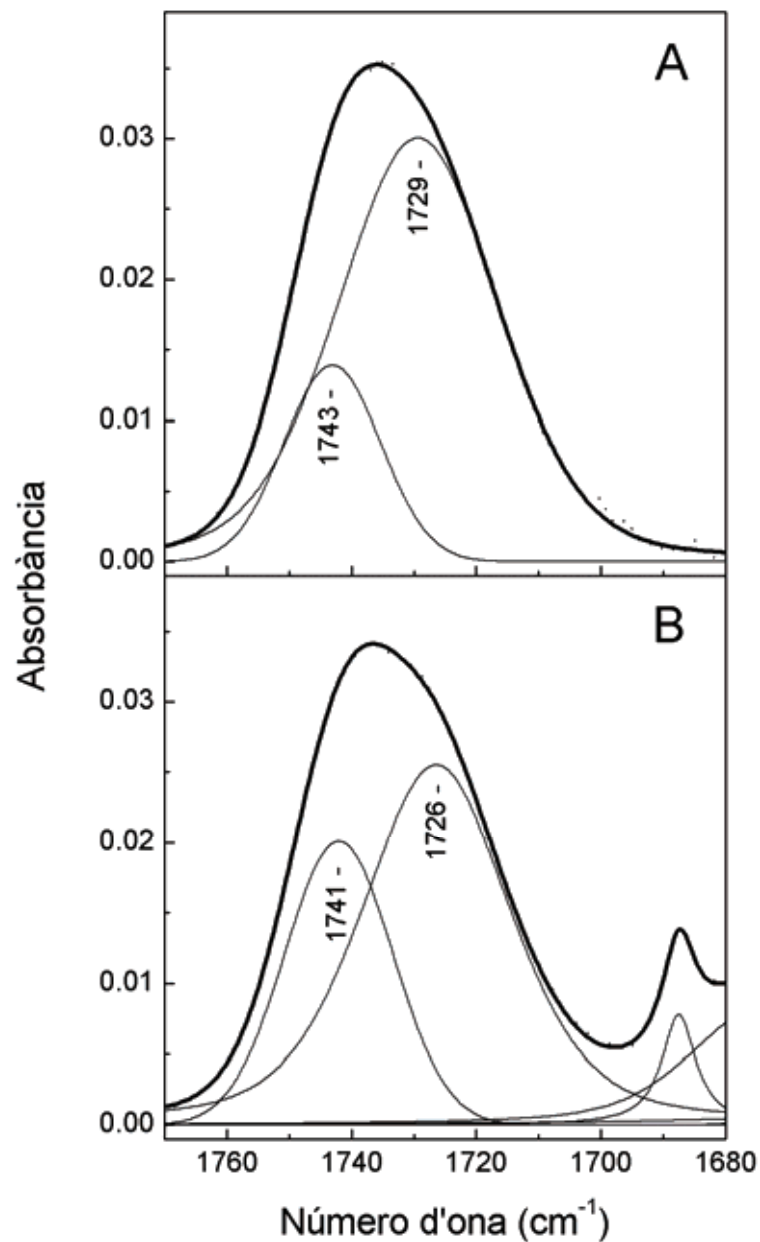


**Figura IV.13.** Canvis de la mida dels liposomes en funció de la relació molar lípid/pèptid (quadrats negres) comparat amb l'alliberament de continguts (triangles blancs) i amb la barreja de lípids (cercles blancs) del pèptid de fusió FP16. Els canvis de mida dels liposomes van ser expressats com a % de volum acumulat, el qual és el percentatge corresponent a una població de partícules amb un diàmetre comprès entre 1 i 10  $\mu\text{m}$  en volum en relació al volum total de tots els liposomes presents a la mostra (el diàmetre inicial dels liposomes van ser de 100 nm). Les condicions van ser iguals que les de la Figura IV.10.

#### IV. 1. 8. Efecte de la Unió dels Pèptids de Fusió en l'Estat d'Hidratació del Grup Èster del Cap Polar dels Fosfolípids

Per tal d'obtenir informació sobre l'efecte del pèptid sobre la interfície aigua-lípid de les membranes, es va analitzar la regió de l'espectre d'IR corresponent a la vibració d'estirament de l'enllaç carbonil del grup èster dels fosfolípids ( $1770\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ), tal i com es mostra a la Figura IV.14. Coincidint amb el que està descrit a la literatura (Aranda *i col.*, 2003; Mantsch i McElhaney, 1991; Nir i Nieva, 2000), aquesta regió de l'espectre d'IR va presentar dues bandes principals: una banda centrada al voltant de  $1742\text{ cm}^{-1}$ , la qual correspon als enllaços carbonil que no es troben formant ponts d'hidrogen amb les molècules d'aigua de la interfície aigua-lípid (anomenats carbonils deshidratats), i una altra banda centrada aproximadament a  $1727\text{ cm}^{-1}$  corresponent als grups carbonil que formen ponts d'hidrogen amb molècules d'aigua (carbonils hidratats). Aquests mateixos resultats van ser obtinguts amb els altres dos pèptids de fusió estudiats (FP16 i FP23-Ac). La figura mostra

clarament que la interacció del pèptid de fusió amb les membranes model incrementa el valor de l'àrea corresponent a la banda assignada als carbonils deshidratats en detriment de la banda corresponent als carbonils hidratats. Així doncs, les dades suggereixen que la interacció del pèptid de fusió amb les membranes pot tenir un efecte deshidratant de la interfície aigua-lípid, fet que podria afavorir la barreja de lípids (un procés en el qual cal vèncer la pressió d'hydratació associada a les membranes).



**Figura IV.14.** (A) Regió de l'espectre d'IR corresponent a la vibració de l'enllaç carbonil del grup èster de LUVs formats de PC/PE (1:1) a una concentració final 10 mM. (B) Regió de l'espectre d'IR corresponent a la vibració de l'enllaç carbonil del grup èster de LUVs formats de PC/PE (1:1) als quals se'ls ha afegit el FP23-H a una concentració final 1 mM.

Les dades dels ajustos de les bandes de l'enllaç carbonil en presència i absència de pèptid de fusió es mostren a la *Taula 5*.

	Carbonil Deshidratat		Carbonil Hidratat	
	Àrea (%)	Màxim (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Màxim (cm <sup>-1</sup> )
PC/PE (1:1)	21	1743	79	1729
PC/PE (1:1) + FP23-H	34	1741	66	1726

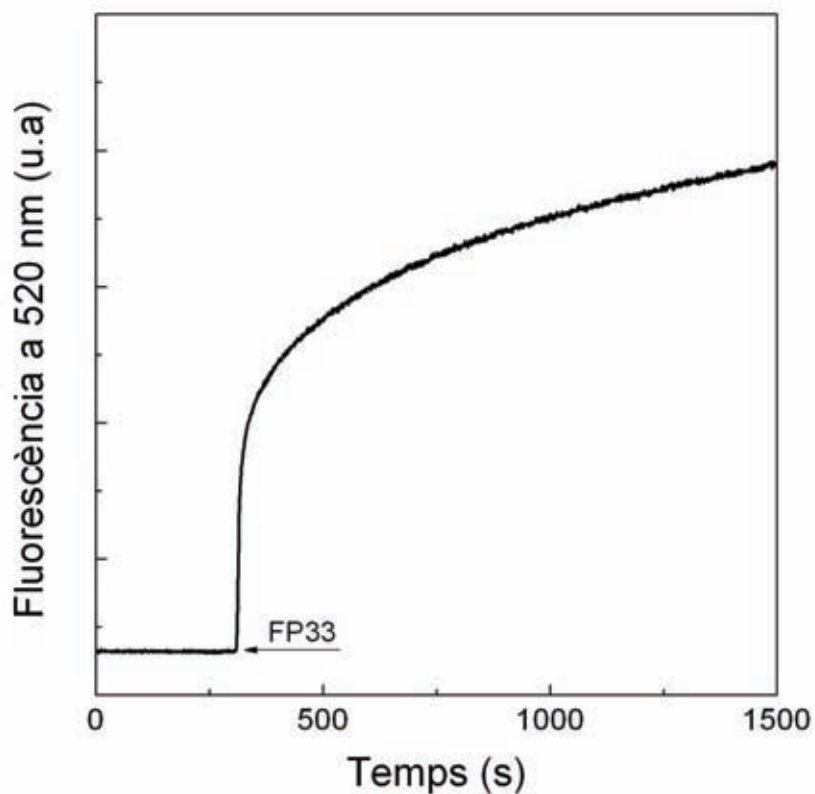
**Taula 5.** Taula resum mostrant les dades obtingudes de l'ajust de les bandes de l'enllaç carbonil en presència i en absència de pèptid de fusió per al pèptid FP23-H.

## **IV. 2. Influència del Segment 24-33 del Pèptid de Fusió de la Proteïna gp41 del VIH en la Interacció amb Membranes Model**

### *IV. 2. 1. Unió del Pèptid de Fusió FP33 a Membranes Model*

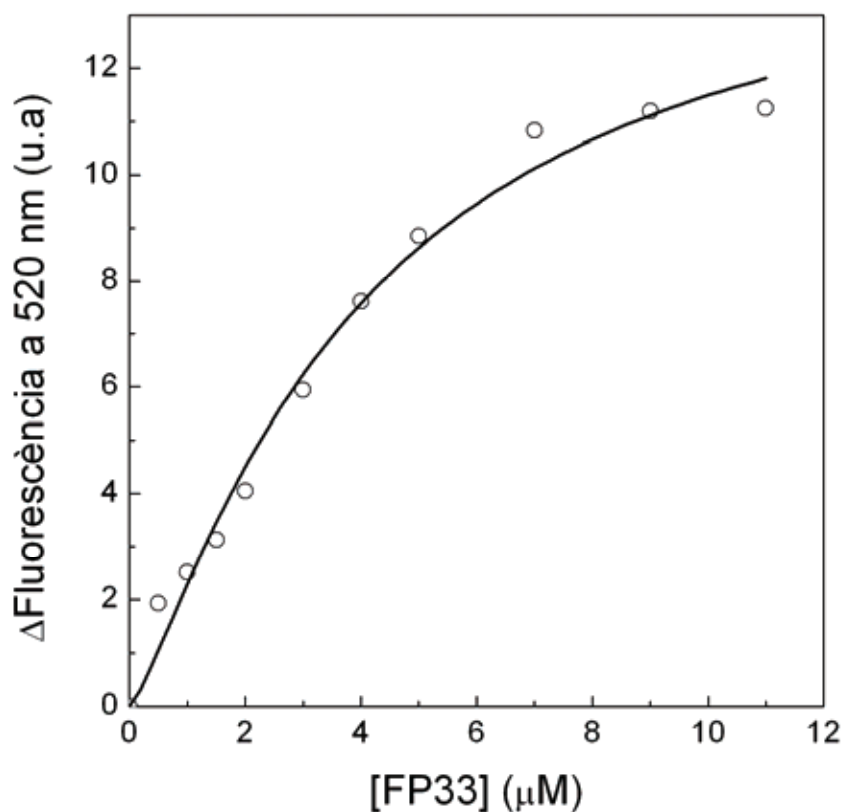
La importància del segment 24-33 del pèptid de fusió de la proteïna gp41 en la interacció amb membranes model ja havia estat descrita en alguns treballs previs (Peisajovich *i col.*, 2000a). En el nostre cas, volíem determinar la importància d'aquest segment (més polar que els segments 1-16 i 1-23) mitjançant la utilització del pèptid de fusió FP33 i analitzar la seva interacció amb membranes model formades de PC/PE (1:1) seguint la mateixa aproximació que per als pèptids FP16, FP23-H i FP23-Ac.

Primerament, es va analitzar la cinètica d'unió del pèptid de fusió FP33 a liposomes formats de PC/PE (1:1) utilitzant la sonda fluorescent FPE, la qual és sensible al potencial electrostàtic de superfície. La interacció de càrregues positives amb la superfície de la membrana provoca un augment de la fluorescència de la sonda FPE, tal i com mostra la *Figura IV.15*, el qual correspon a un augment del potencial de superfície. Aquesta cinètica d'unió es va ajustar a una funció exponencial doble (*Eq. 11*). Les constants cinètiques aparents obtingudes d'aquest ajust es presenten a la *Taula 6*.



**Figura IV.15.** Unió dels FP33 a LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb FPE. Variació de fluorescència en funció del temps després de l'addició del FP33 a una concentració final de 25  $\mu\text{M}$ . La concentració final de LUVs va ser 300  $\mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

A partir de la valoració d'una suspensió de membranes marcades amb FPE amb concentracions creixents del pèptid, s'obtingué la corba d'unió per a aquest pèptid (*Figura IV.16*). La corba d'unió mostra com el pèptid de fusió FP33 va presentar una interacció amb les membranes amb un fort caràcter hiperbòlic, de la qual se'n dedueix una constant de dissociació de 4  $\mu\text{M}$ , segons l'Eq. 5.

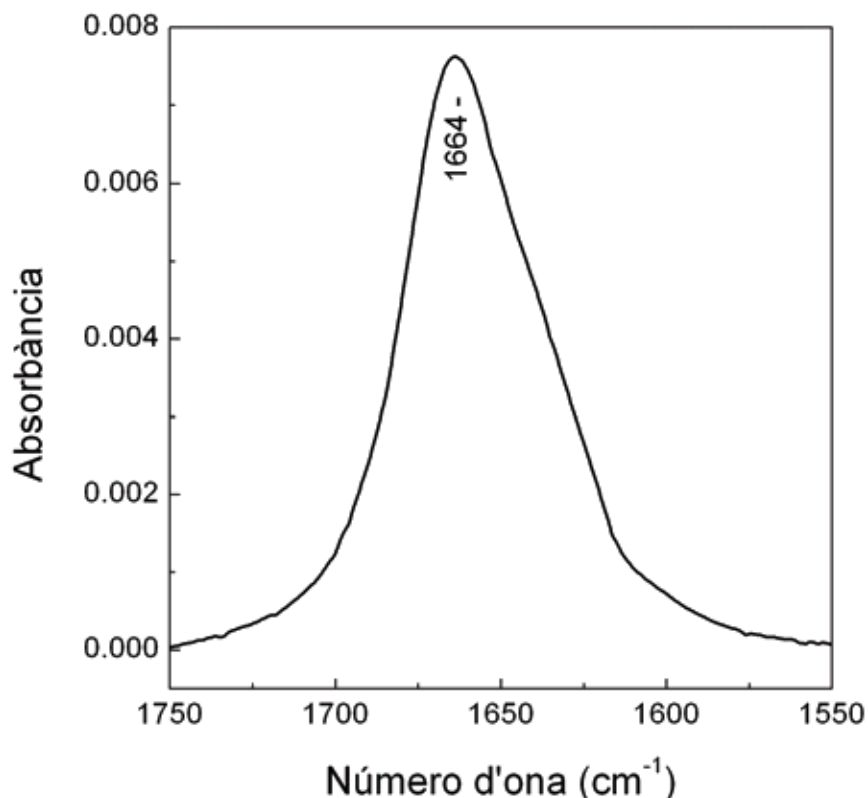


**Figura IV.16.** Unió del pèptid de fusió FP33 a LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb FPE. Els canvis en la variació de fluorescència acumulada en funció de la concentració de pèptid de fusió addicionat es van utilitzar per a obtenir la corba d'unió. La línia representa l'ajust matemàtic utilitzant l'Eq. 5. La concentració de LUVs va ser 300 μM en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

#### *IV. 2. 2. Canvis Estructurals del FP33 Deguts a la Interacció amb les Membranes Model*

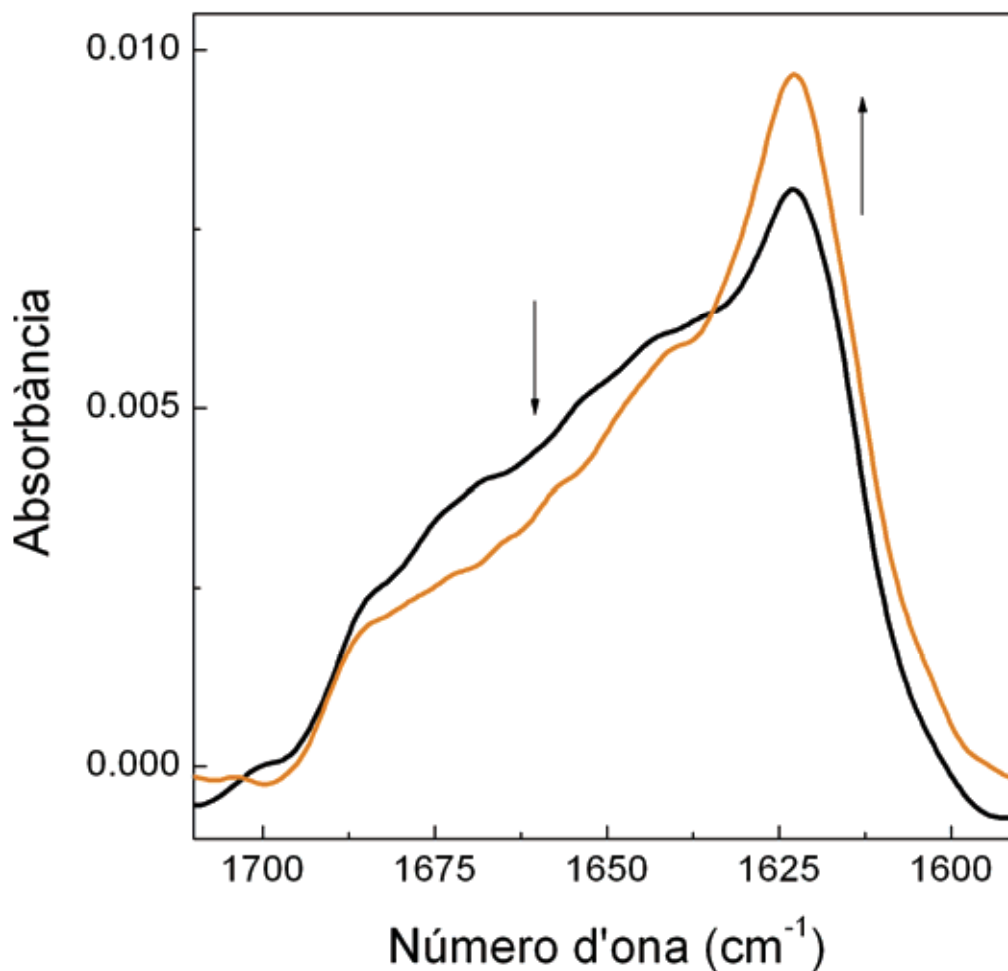
La *Figura IV.17* mostra l'estructura secundària del pèptid de fusió FP33 dissolt en DMSO mitjançant FTIR de transmissió. L'espectre, un cop eliminada la contribució del DMSO, presenta un únic màxim d'absorció centrat al voltant de 1664  $\text{cm}^{-1}$ , que tal i com s'ha descrit en el capítol anterior (*Resultats IV. 1. 1.*), correspondria a una estructura no-ordenada i monomèrica.





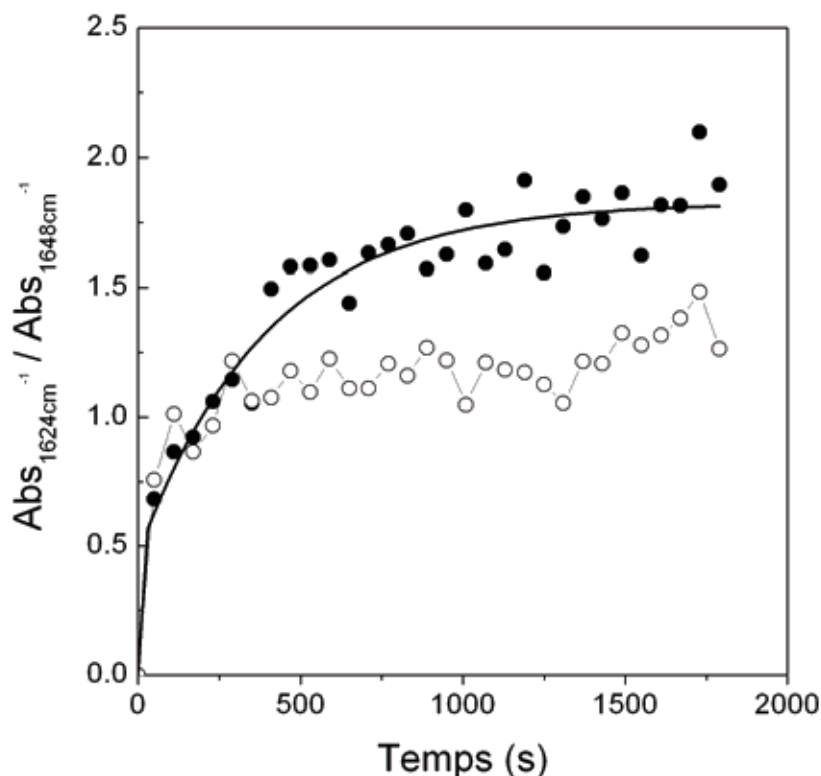
**Figura IV.17.** Espectre de FTIR del FP33 dissolt en DMSO. Es mostra la regió de l'amida I. La concentració de pèptid va ser 0.1 mM i la temperatura es va mantenir constant a 20°C.

A continuació, es va procedir a l'estudi cinètic dels canvis conformacionals que tenen lloc durant la interacció del pèptid de fusió FP33 amb membranes model de PC/PE (1:1) mitjançant espectroscòpia de FTIR. La *Figura IV.18* mostra els espectres finals del pèptid de fusió FP33 dissolt en tampó deuterat (línia negra) o barrejat amb membranes (línia taronja). Els espectres van presentar dos components principals: una banda centrada cap a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , la qual pot ser assignada a estructures  $\beta$  agregades intermoleculares i una altra banda amb un màxim entre  $1645$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  assignable, segons la literatura, a una barreja d'estructura helicoïdal i no-ordenada (Byler i Susi, 1986; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2001; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2003). A partir de les intensitats relatives d'aquestes dues bandes, es pot estimar que quan el FP33 es troba dissolt en tampó, aquest presenta una barreja d'agregats intermoleculares i una barreja d'estructura helicoïdal i no-ordenada. D'altra banda, quan el pèptid dissolt en DMSO es barreja amb una suspensió de membranes formades de PC/PE (1:1) es forma més estructura agregada que quan el pèptid està dissolt en tampó aquós, per a una mateixa concentració final de pèptid.



**Figura IV.18.** Espectres de FTIR finals de les cinètiques de canvi estructural del FP33 en absència de LUVs (línia negra) i en presència de LUVs (línia taronja) formats de PC/PE (1:1) en tampó 10 mM HEPES deuterat a pD 7.5. Les concentracions finals de pèptid de fusió i de LUVs van ser 0.1 mM i 1.2 mM, respectivament. La temperatura es va mantenir constant a 20°C. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

La relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  (Figura IV.19) mostra que el pèptid de fusió afegit al tampó forma una barreja d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular i una barreja d'estructura helicoïdal i no-ordenada que es manté constant al llarg del temps. En canvi, la presència de membranes incrementa la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular en favor de l'estructura helicoïdal i no-ordenada. La cinètica del canvi conformacional es va ajustar a una funció exponencial doble i les constants obtingudes es mostren a la Taula 6.

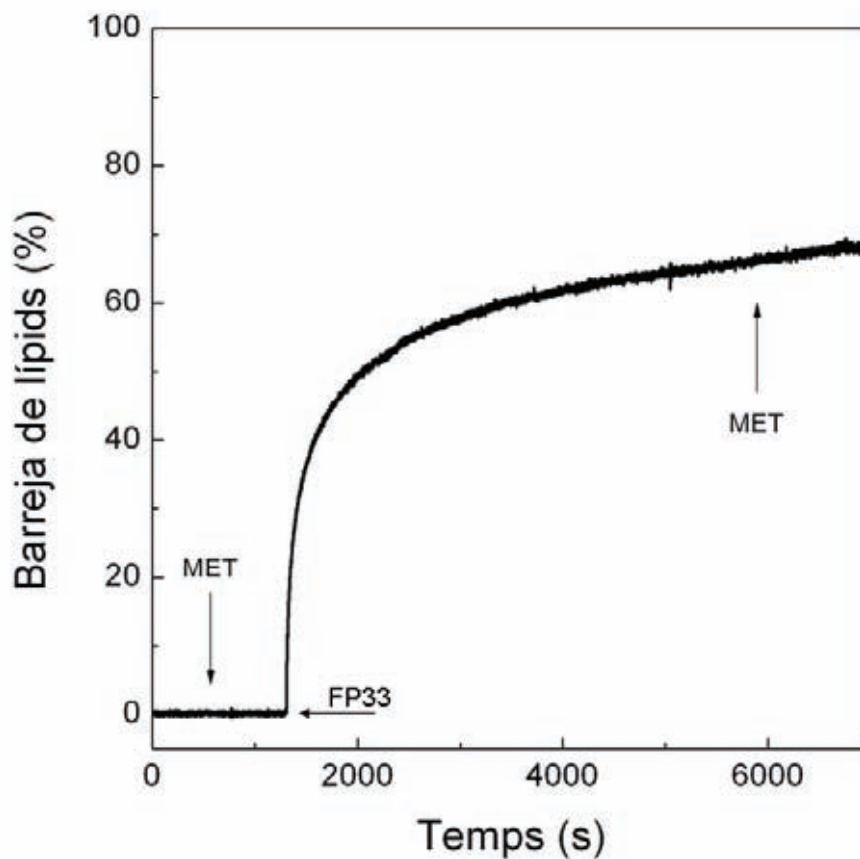


**Figura IV.19.** Representació de la relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  del pèptid de fusió FP33. Els símbols negres representen la interacció del FP33 ( $0.1\text{ mM}$  concentració final) amb LUVs formats de PC/PE (1:1) a una concentració final de  $1.2\text{ mM}$  ( $L/P = 12$ ); i els símbols blancs representen la cinètica de l'addició del FP33 a tampó deuterat  $10\text{ mM}$  HEPES pD 7.5. Els símbols negres van ser ajustats a una funció exponencial de doble (Eq. 11). La temperatura va ser  $20^\circ\text{C}$ . El temps mort de l'experiment va ser de  $50\text{ s}$ .

#### IV. 2. 3. Barreja de Lípids Induïda pel FP33

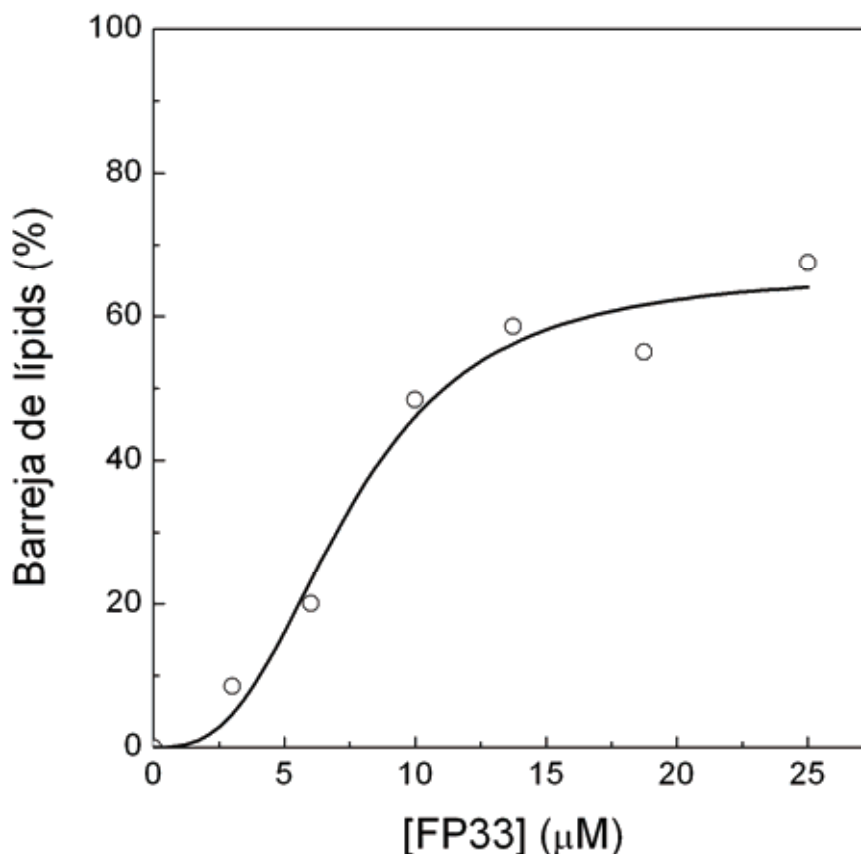
La *Figura IV.20* mostra l'augment de la fluorescència de la sonda NBD-PE (disminució de la transferència d'energia) degut a l'addició de pèptid de fusió FP33 a una relació  $L/P = 12$ , essent les concentracions  $300\text{ }\mu\text{M}$  i  $25\text{ }\mu\text{M}$  de lípid i pèptid, respectivament, la qual cosa és indicativa de la fusió de membranes.

Les dades es van ajustar a una funció exponencial doble (Eq. 11) per tal d'obtenir informació sobre la cinètica d'aquest procés i es presenten a la *Taula 6*. A més, per tal d'analitzar la morfologia dels lípids i del pèptid durant el procés de barreja de lípids, es van prendre dues alíquotes directament de la cubeta de fluorescència (indicat a la figura per les fletxes) per tal de visualitzar-les per microscòpia electrònica de transmissió (MET): una corresponent a la mostra en absència de pèptid de fusió i l'altre corresponent a l'estat final del procés de barreja de lípids (un cop s'ha assolit el nivell màxim de fluorescència corresponent al *plateau* del procés) i que correspon aproximadament a una  $70\%$  de barreja de lípids.



**Figura IV.20.** Barreja de lípids en funció del temps provocada per l'addició de FP33 a una concentració final de  $25 \mu\text{M}$  a una suspensió de LUVs formats de PC/PE (1:1) a una concentració final de  $300 \mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser  $20^\circ\text{C}$ . Les fletxes indiquen els punts on es van prendre alíquotes per analitzar-les morfològicament per MET.

La *Figura IV.21* mostra la barreja de lípids en funció de la concentració de pèptid de fusió addicionat. Els resultats mostren que el FP33 indueix la barreja d'un 70% dels lípids presents i que aquesta barreja de lípids es produeix a la vegada que el pèptid de fusió s'uneix a les membranes.

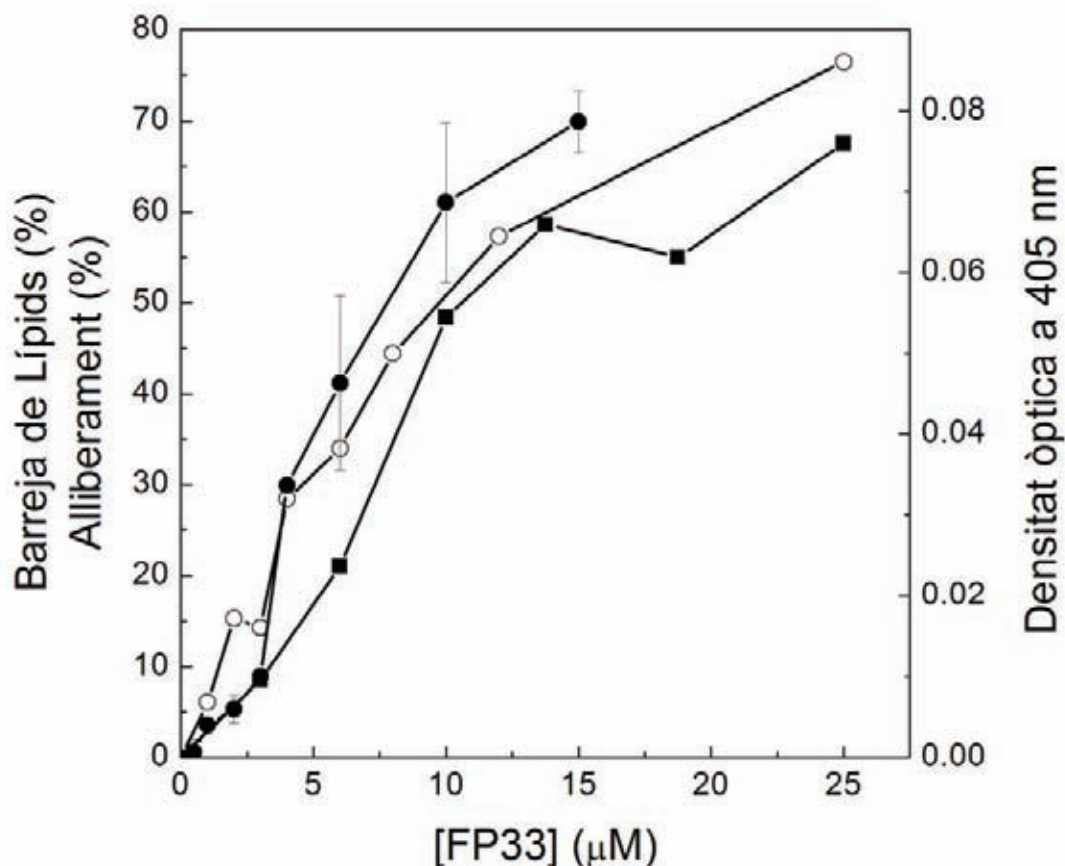


**Figura IV.21.** Percentatge de la barreja de lípids induïda per l'addició de FP33 a una suspensió de LUVs formats de PC/PE (1:1) i marcats amb NBD-PE/Rh-PE en funció de la concentració de pèptid de fusió. La concentració final de LUVs va ser 300 μM en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

#### *IV. 2. 4. Fusió de Membranes, Agregació de Liposomes i Alliberament de Continguts Induïts pel FP33*

Per tal de comparar els esdeveniments que tenen lloc durant la fusió de membranes es van realitzar també mesures d'agregació de liposomes i d'alliberament de continguts (*leakage*). D'aquesta manera, es van poder relacionar aquests dos processos amb el procés de barreja de lípids, ja que ha estat descrit que aquest últim hauria de comportar una agregació de liposomes i possiblement un alliberament de continguts al medi (Nir i Nieva, 2000). La *Figura IV.22* mostra les dades obtingudes de la barreja de lípids, de l'agregació de liposomes i de l'alliberament de la carboxifluoresceïna (CF) encapsulada en el seu interior en funció de la concentració de FP33 afegit. Al augmentar la concentració de pèptid, es produeix un increment de la dispersió de la llum per part de la suspensió de liposomes, fet que indica la formació d'agregats. Aquesta formació d'agregats va

acompanyada d'una desestabilització de la membrana, tal i com mostren els resultats d'alliberament de CF. Finalment, cal destacar que aquest augment de la dispersió de la llum i de l'alliberament de CF es dona alhora que la barreja de lípids.



**Figura IV.22.** Canvis en l'estat d'agregació dels LUVs (cercles negres), en l'alliberament de CF encapsulada en el seu interior (cercles blancs) i de la barreja de lípids (quadrats negres) en funció de la concentració de FP33. En tots els casos els LUVs estaven formats de PC/PE (1:1) en tampó TRIS pH 7.5 a una concentració final de 300 µM. La temperatura en tots els casos va ser 20°C.

#### IV. 2. 5. Comparació dels Processos d'Unió, Barreja de Lípids i Formació d'Estructura $\beta$

Un cop obtingudes les dades cinètiques de la unió, de la barreja de lípids i del canvi estructural, es van dur a terme els diferents ajustos aplicant una equació exponencial doble (Eq. 11) a les dades experimentals obtingudes. Les constants cinètiques aparents d'aquests processos per al pèptid de fusió FP33 es presenten a la Taula 6:

	Unió a membranes	→ $\beta^a$	Barreja de lípids
$k_{app1}$ ( $s^{-1}$ )	$8 \times 10^{-2}$	1.25	$6 \times 10^{-3}$
$k_{app2}$ ( $s^{-1}$ )	$1.8 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-4}$

**Taula 6.** Constants aparents ( $k_{app}$ ) calculades a partir dels ajustos matemàtics de les traces cinètiques per al FP33 de les figures d'unió (*Figura IV.15*), de canvi estructural (*Figura IV.19*) i de barreja de lípids (*Figura IV.20*) a una funció exponencial doble (Eq. 11). <sup>a</sup>canvi estructural: d'estructura helicoïdal i no-ordenada a estructura  $\beta$  agregada.

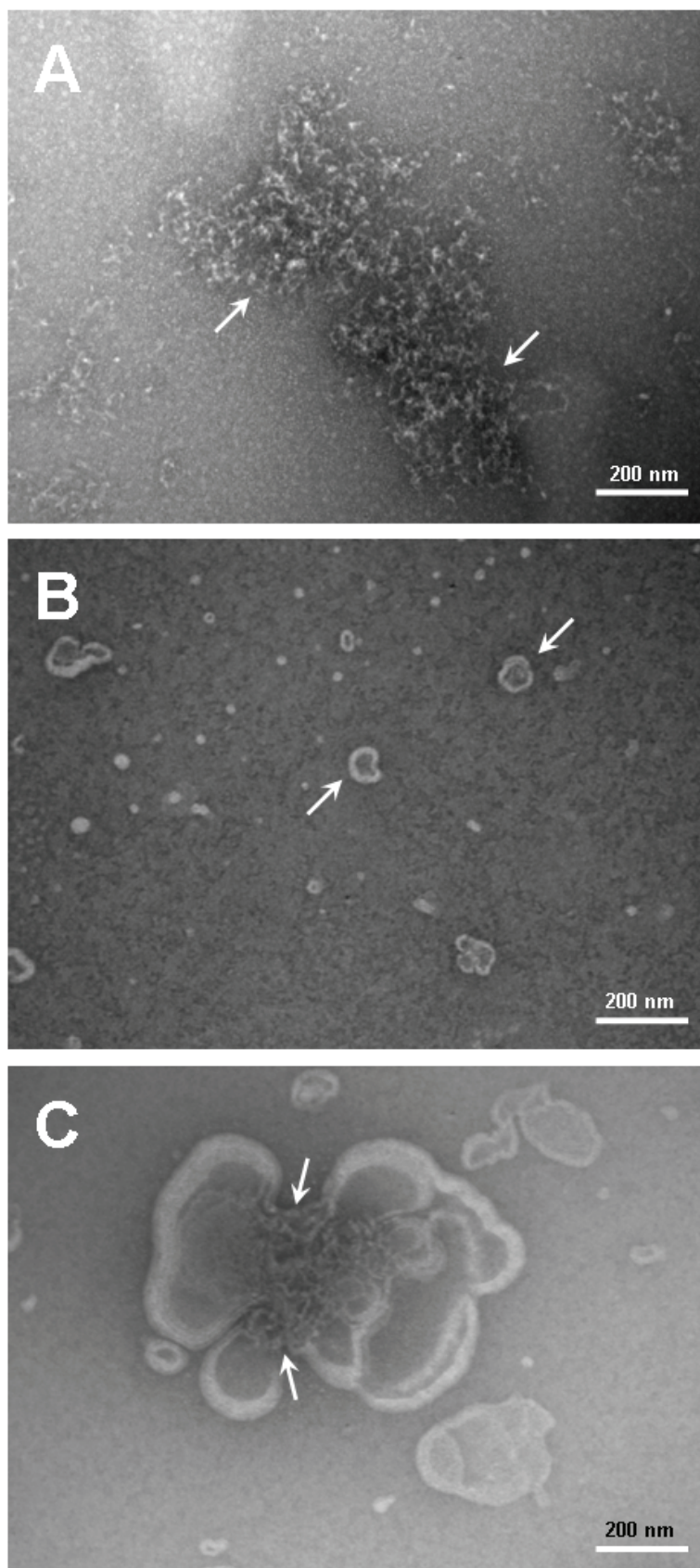
Quan el pèptid de fusió FP33 es va barrejar amb membranes, les dades de la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular es van ajustar a una funció exponencial doble (Eq. 11) i es van calcular les dues constants aparents ( $k_{app1}$  i  $k_{app2}$ ): la primera constant és consistent amb la formació d'agregats en tampó HEPES i té un valor de  $1.25 s^{-1}$ ; la segona constant reflecteix un procés més lent amb una constant aparent de  $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ , la qual concordaria amb la constant més lenta del procés d'unió,  $1.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ . El procés d'unió té una constant més ràpida ( $8 \times 10^{-2} s^{-1}$ ), la qual pot correspondre a la unió dels agregats formats en tampó HEPES amb les membranes. Finalment, el procés més ràpid de la barreja de lípids va presentar una constant aparent de  $6 \times 10^{-3} s^{-1}$ , un valor molt semblant a la constant més lenta del procés d'unió ( $1.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ ) i a la constant més lenta del canvi conformacional ( $2.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ). A més, la barreja de lípids presenta una segona constant més lenta ( $4 \times 10^{-4} s^{-1}$ ) la qual podria ser una conseqüència de la relocalització de les sondes durant el procés de la barreja de lípids. Les dades cinètiques obtingudes semblen indicar que primer es produiria la formació d'estructura  $\beta$  agregada en tampó. A continuació, el pèptid interaccionaria amb les membranes produint-se més estructura  $\beta$  i un cop s'hagués produït aquest canvi conformacional, tindria lloc la barreja de lípids, tal i com ja s'havia descrit anteriorment per als pèptids FP16, FP23-H i FP23-Ac.

#### *IV. 2. 6. Microscòpia Electrònica de Transmissió del FP33*

La morfologia dels liposomes en absència i en presència de pèptid de fusió es va estudiar mitjançant MET. Les mostres utilitzades van ser preses directament de la cubeta de fluorescència abans d'afegir el pèptid de fusió i en l'estat final de la barreja de lípids (*plateau* de la corba) a una relació L/P = 12. El moment en el qual es van prendre les mostres està indicat amb unes fletxes a la *Figura IV.20*. Com a control es va visualitzar una preparació del pèptid de fusió dissolt en tampó a la mateixa concentració que a l'experiment de la barreja de lípids.

La *Figura IV.23 A* mostra les micrografies electròniques corresponents al pèptid de fusió dissolt en tampó a la mateixa concentració que en els experiments de barreja de lípids. El pèptid de fusió FP33 en aquestes condicions es presenta com un agregat amorf sense una estructura definida quan s'observa per MET. Tot i això, tal i com ja s'ha comentat, els espectres de FTIR del pèptid dissolt en tampó mostren una barreja d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular i d'estructura helicoïdal i no-ordenada. La *Figura IV.23 B* mostra la barreja de lípids abans d'addicionar el pèptid observant-se els liposomes esfèrics amb un diàmetre aproximat de 100 nm, la qual cosa va ser confirmada per mesures de dispersió de llum. En canvi, la mostra presa a l'estat final de la barreja de lípids, *Figura IV.23 C*, presenta un aspecte totalment diferent, ja que, tot i observar-se alguns liposomes esfèrics d'aproximadament 100 nm, la majoria de liposomes són molt més grossos i s'observa multilamel·laritat en les membranes. També s'observen zones (indicades per les fletxes) on aquests liposomes es fusionen. El fet destacat d'aquesta observació és que per primer cop s'observen processos de fusió entre liposomes induïts per aquest pèptid.

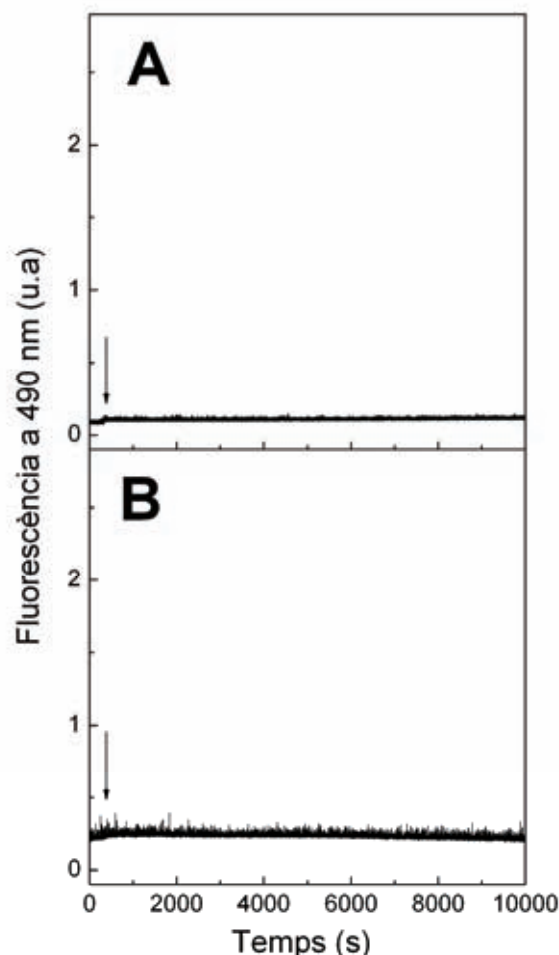




**Figura IV.23.** Micrografies electròniques de transmissió. **(A)** FP33 dissolt en tampó. **(B)** LUVs formats de PC/PE (1:1) de l'experiment de la barreja de lípids abans d'addicionar el pèptid de fusió FP33. **(C)** LUVs després d'addicionar el pèptid de fusió FP33 al final del procés de la barreja de lípids. Les fletxes blanques indiquen zones on els liposomes es fusionen.

#### IV. 2. 7. Naturalesa No Fibril·lar dels Agregats del FP33

Tot i que mitjançant MET no s'observen fibres amiloidogèniques, les bandes d'agregació que s'observen per IR quan els pèptids de fusió es dissolen en tampó aquós o quan interaccionen amb membranes, són iguals que les que es detecten en els processos d'agregació de pèptids amiloides. La confirmació de la naturalesa no fibril·lar dels agregats es va realitzar mitjançant espectroscòpia de fluorescència utilitzant la sonda tioflavina T (ThT), una sonda la fluorescència de la qual depèn de la formació de fibres amiloides. La figura mostra l'addició de pèptid a una suspensió de tampó amb ThT (*Figura IV.24 A*) i a una suspensió de ThT amb membranes model (*Figura IV.24 B*). En cap dels casos es va observar un augment de seva fluorescència la qual cosa indica que no es formen fibres amiloidogèniques.



**Figura IV.24.** Fluorescència de la sonda ThT en funció del temps. **(A)** FP33 a una concentració final de 25  $\mu\text{M}$  en absència de LUVs. **(B)** Addició de FP33 a una concentració final de 25  $\mu\text{M}$  a una suspensió de LUVs formats de PC/PE (1:1) en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La concentració de LUVs va ser 300  $\mu\text{M}$  i la temperatura 20°C. La concentració final de ThT va ser 35  $\mu\text{M}$ . Les fletxes indiquen l'addició de FP33.

### **IV. 3. Efecte del Colesterol en la Interacció del Pèptid de Fusió de la Proteïna gp41 del VIH amb Membranes Model: Importància del Potencial Dipolar de Membrana**

La composició lipídica és un factor que cal tenir en compte quan s'estudia la interacció entre els pèptids de fusió i les membranes. Tal i com ja s'ha descrit en la introducció, l'envolta viral presenta un elevat contingut de colesterol (Aloia *i col.*, 1988; Aloia *i col.*, 1993). Aquest elevat percentatge de colesterol afecta segurament la fluïdesa de membrana, un fenomen àmpliament descrit. Tot i això, el colesterol també pot afectar un altre paràmetre físic de les membranes: el potencial dipolar de membrana.

La importància d'aquest potencial electrostàtic, generat pels dipols moleculars presents a les macromolècules que constitueixen la bicapa lipídica, en processos biològics relacionats amb les membranes s'està posant de manifest en els últims anys (Alakoskela i Kinnunen, 2001; Alakoskela *i col.*, 2004; Antonenko *i col.*, 1999; Asawakarn *i col.*, 2001; Cladera i O'Shea, 1998; Cladera *i col.*, 1999; Cladera *i col.*, 2003;; Hristova *i col.*, 2001; Rokitskaya *i col.*, 1997; Rokitskaya *i col.*, 2002; Schagina *i col.*, 2003; Voglino *i col.*, 1998; Zhang *i col.*, 2001).

#### ***IV. 3. 1. Modulació del Potencial Dipolar de Membrana dels LUVs pel Colesterol i el 6-cetocolestanol***

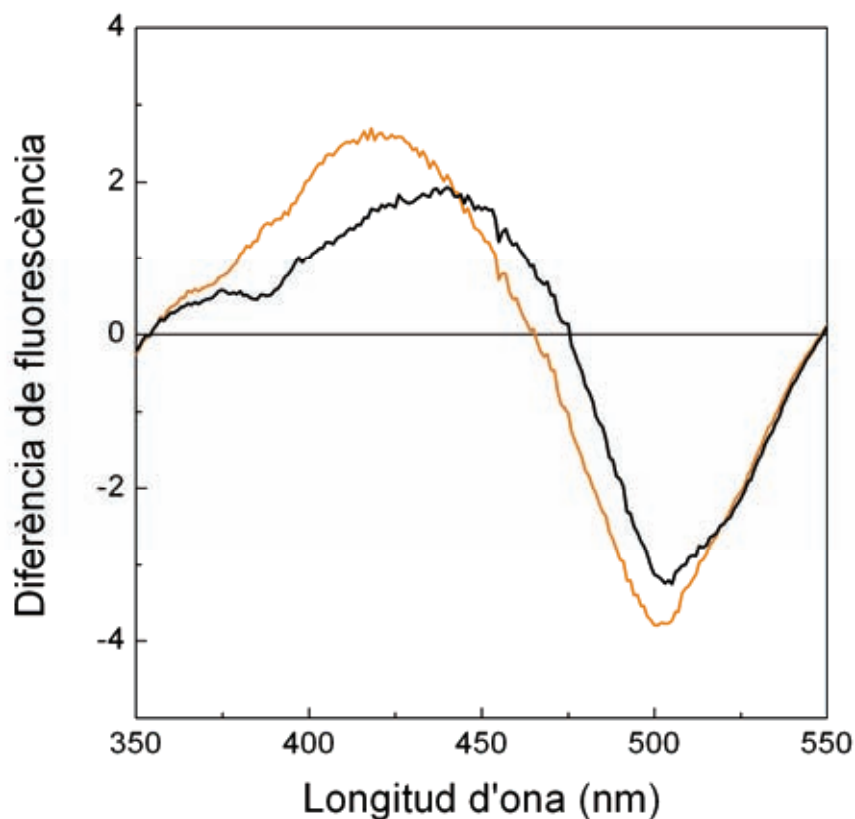
El potencial dipolar de membrana és un potencial electrostàtic associat a les membranes biològiques originat pels dipols moleculars presents a les molècules que les formen. La magnitud del potencial dipolar es pot augmentar o disminuir incorporant a les membranes substàncies amb un moment dipolar diferent de zero. Així per exemple, el colesterol o 6-KC s'insereixen a la membrana de manera que augmenta el moment dipolar total de la bicapa, augmentant així la magnitud del potencial dipolar. D'altra banda, existeixen molècules, com és el cas de la floretina, que el disminueixen (Gross *i col.*, 1994).

En el present estudi, per tal d'avaluar la influència del colesterol en la interacció dels pèptids de fusió amb les membranes i quina part d'aquesta influència podria ser deguda a l'efecte del colesterol sobre el potencial dipolar, es van preparar membranes amb colesterol i amb 6-KC. Aquesta última molècula es va triar perquè

igual que el colesterol, augmenta la magnitud del potencial dipolar, però té un efecte oposat sobre la fluïdesa de la membrana.

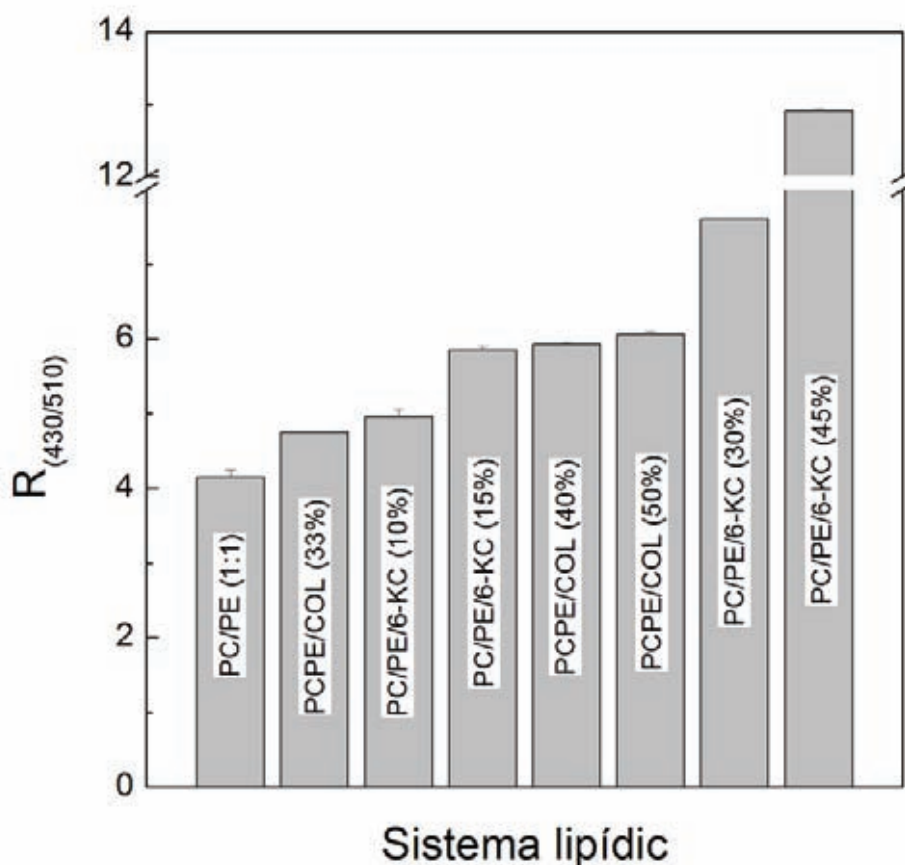
Per tal d'estudiar l'efecte del colesterol i del 6-KC sobre aquest potencial, es van preparar liposomes amb diferents concentracions d'aquestes dues molècules i es van marcar amb la sonda fluorescent Di-8-ANEPPS, la qual és sensible a canvis en el potencial dipolar de membrana.

L'efecte sobre el potencial dipolar de membrana per part del colesterol i del 6-KC es mostra a la *Figura IV.25*. Aquesta figura mostra els espectres de diferència de fluorescència obtinguts al restar l'espectre d'excitació normalitzat d'una suspensió de liposomes formats de PC/PE (1:1) amb 15 mol% de 6-KC o amb 50 mol% de colesterol, de l'espectre d'excitació normalitzat d'una suspensió de liposomes de PC/PE (1:1). Els espectres de diferència presenten un màxim al voltat de 430-450 nm i un mínim entorn els 510 nm. Aquest fet és provocat per un desplaçament cap al blau de l'espectre d'excitació de la sonda fluorescent Di-8-ANEPPS quan el potencial dipolar es fa més positiu cap al centre de la membrana, i reflecteix, per tant, un augment en la magnitud d'aquest potencial. Il·luminant una mostra alternativament a les longituds d'ona del màxim i del mínim de l'espectre de diferència (430 i 510 nm, respectivament) i llegint la fluorescència en el màxim d'emissió de la sonda Di-8-ANEPPS (580 nm), s'obté el paràmetre  $R_{(430/510)}$ , el qual augmenta o disminueix segons ho fa la magnitud del potencial dipolar.



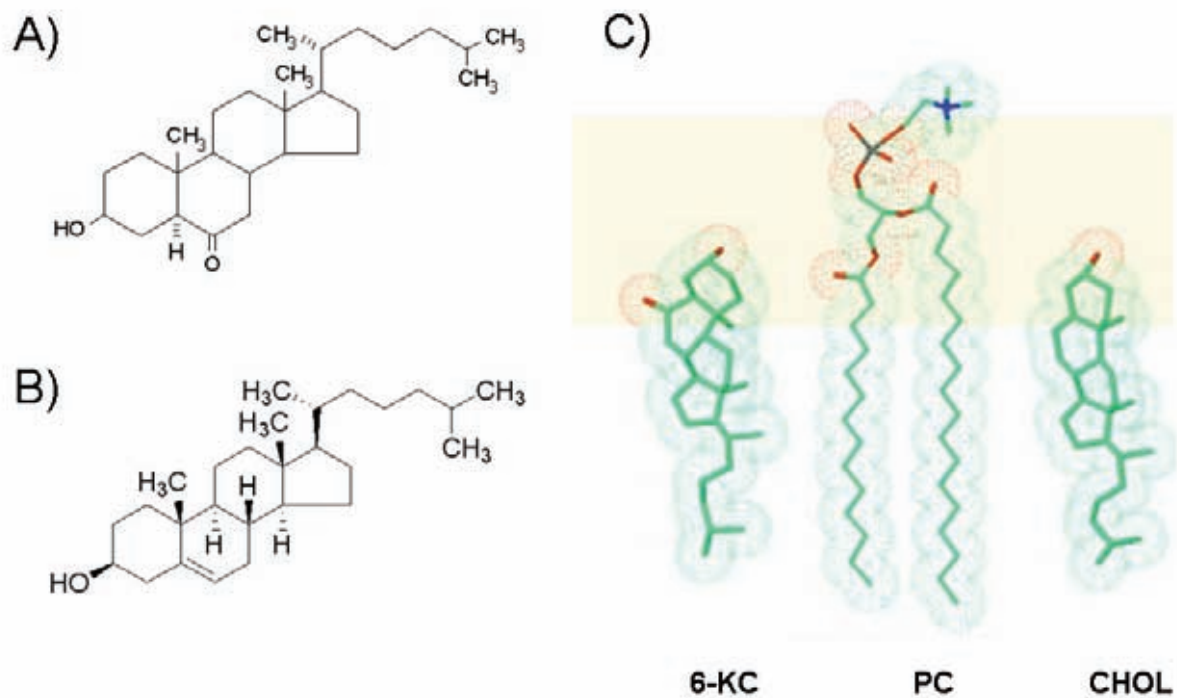
**Figura IV.25.** Espectres de diferència obtinguts a partir de restar l'espectre d'excitació de LUVs marcats amb Di-8-ANEPPS formats de PC/PE (1:1) amb 15 mol% de 6-KC de l'espectre d'excitació de LUVs de PC/PE (1:1) sense 6-KC (línia taronja) o l'espectre d'excitació de LUVs formats de PC/PE (1:1) amb 50 mol% de colesterol de espectre d'excitació de LUVs sense colesterol (línia negra).

El valor de  $R_{(430/510)}$  per a cadascuna de les composicions lipídiques estudiades es va obtenir mitjançant un mètode ratiomètric de doble longitud d'ona (**Mètodes Experimentals III. 4. 2. ii. a**). Aquest mètode es basa en excitar la mostra a dues longituds d'ona (430 nm i 510 nm, corresponents al màxim i al mínim de l'espectre de diferència, respectivament) recollint la fluorescència emesa a 580 nm (Asawakarn *i col.*, 2001). Els diferents valors de  $R_{(430/510)}$  obtinguts es mostren a la *Figura IV.26*. A partir dels valors de  $R_{(430/510)}$  obtinguts per les diferents composicions lipídiques, es pot concloure que tant el 6-KC com el colesterol augmenten la magnitud del potencial dipolar de membrana i que aquest efecte és dependent de la concentració tal i com ja havia estat descrit anteriorment (Clarke, 1997; Franklin i Cafiso, 1993; Gross *i col.*, 1994). A més, el 6-KC té un efecte major sobre el potencial dipolar de membrana que el colesterol.



**Figura IV.26.** Dependència de la magnitud del potencial dipolar de membrana en relació a la composició lipídica, expressada com la relació de fluorescència  $R_{(430/510)}$ .

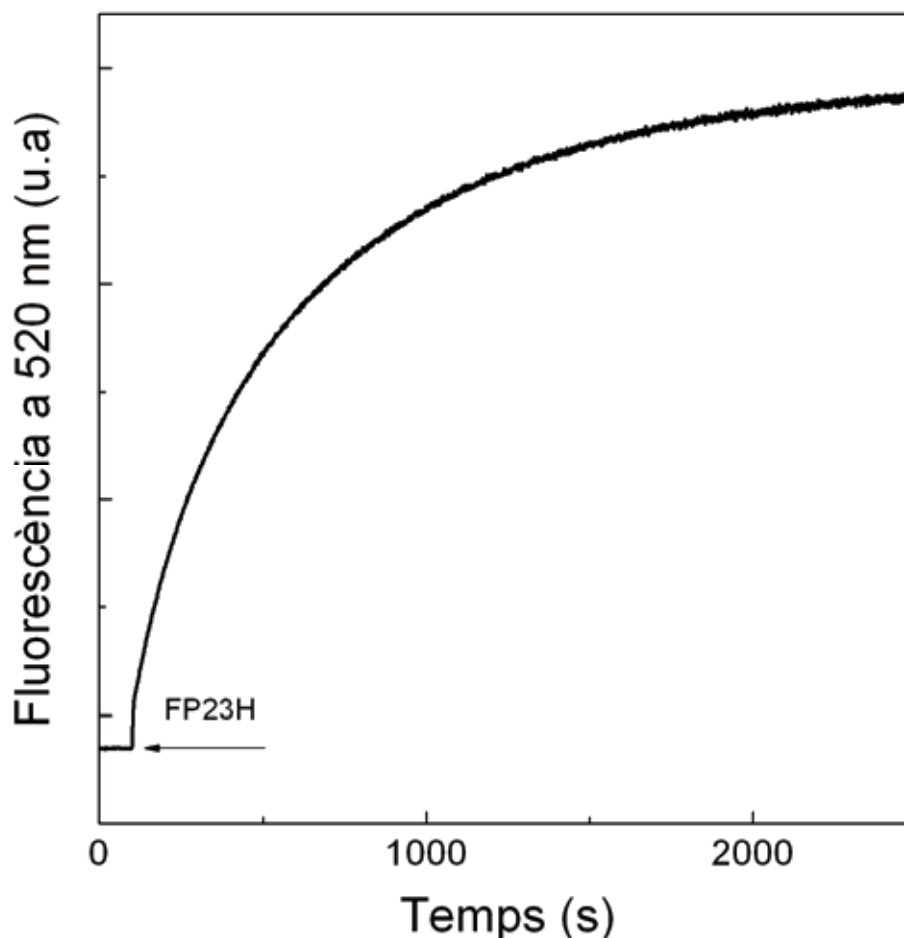
El fet que el 6-KC tingui un efecte major sobre el potencial dipolar de membrana podria ser degut a que aquesta molècula presenta un grup ceto addicional que es posiciona a la interfície aigua-lípid. La *Figura IV.27 C* mostra una molècula de colesterol, una de 6-KC i una molècula de PC, en les quals s'observen en vermell els oxígens, corresponents als grups alcohols i ceto. En taronja també s'indica la zona d'interfície aigua-lípid, regió en la qual es manifesta el potencial dipolar de membrana.



**Figura IV.27.** (A) Esquema molecular del 6-KC. (B) Esquema molecular del colesterol. (C) Representació en bastons del 6-KC, del colesterol i de la PC. En vermell es representen els àtoms d'oxigen. En taronja es representa la zona de la interfície aigua-lípid [modificat de (Li *i col.*, 2003)].

#### *IV. 3. 2. Efecte del Colesterol i del 6-cetocolestanol en la Unió del Pèptid de Fusió a les Membranes Model*

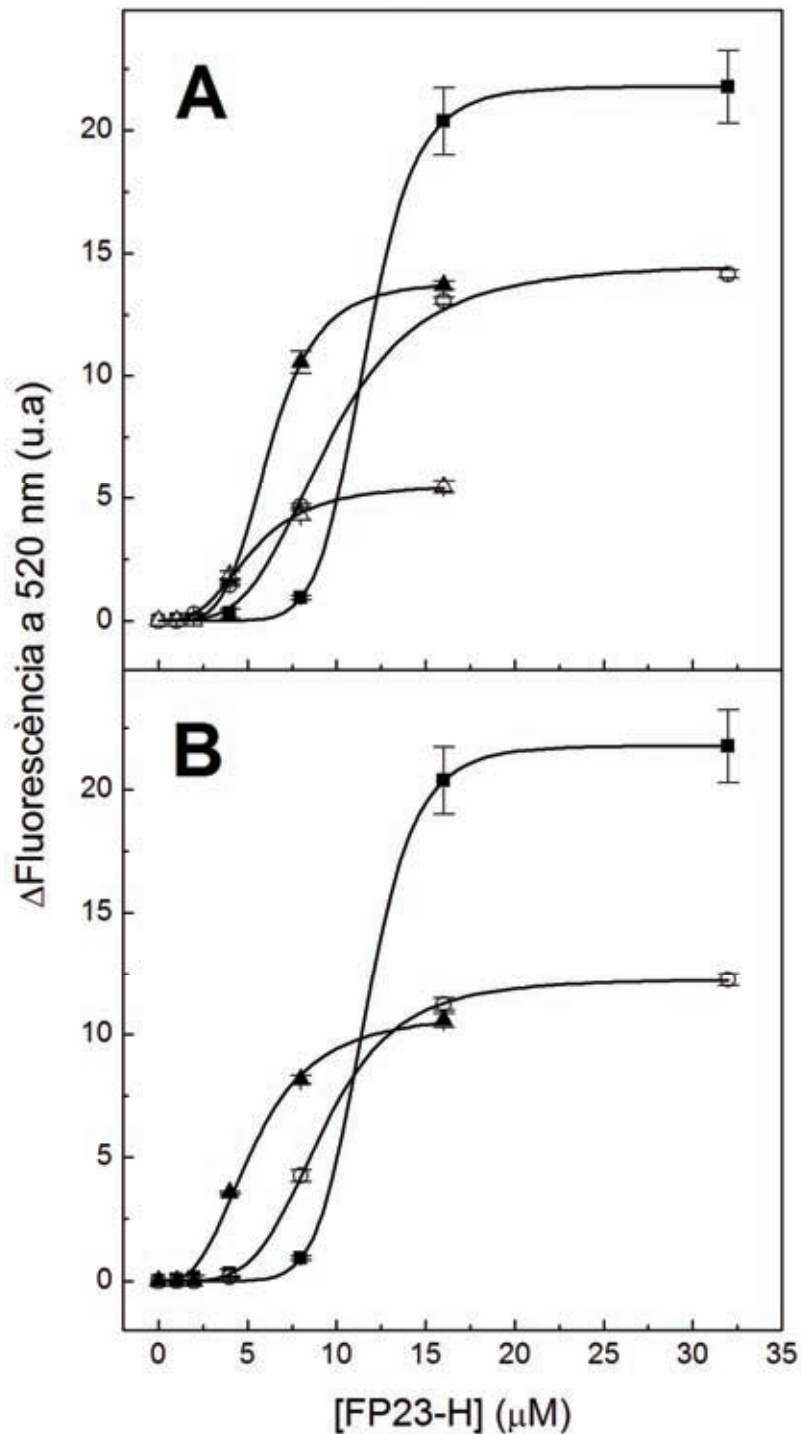
La unió del pèptid de fusió FP23-H a liposomes de diferent composició lipídica es va analitzar utilitzant la sonda fluorescent FPE, la qual és sensible al potencial electrostàtic de superfície (Golding *i col.*, 1996). La interacció de càrregues positives amb la superfície de la membrana provoca un augment de la fluorescència de la sonda FPE. La *Figura IV.28* mostra la interacció del pèptid de fusió FP23-H amb membranes formades per PC/PE (1:1) amb 30 mol% de 6-KC, observant-se l'augment de la fluorescència esmentat anteriorment.



**Figura IV.28.** Unió del FP23-H a LUVs formats de PC/PE (1:1) amb 30 mol% de 6-KC i marcats amb FPE. Variació de fluorescència en funció del temps després de l'addició del FP23-H a una concentració final de 30  $\mu$ M. La concentració final de LUVs va ser 300  $\mu$ M en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C

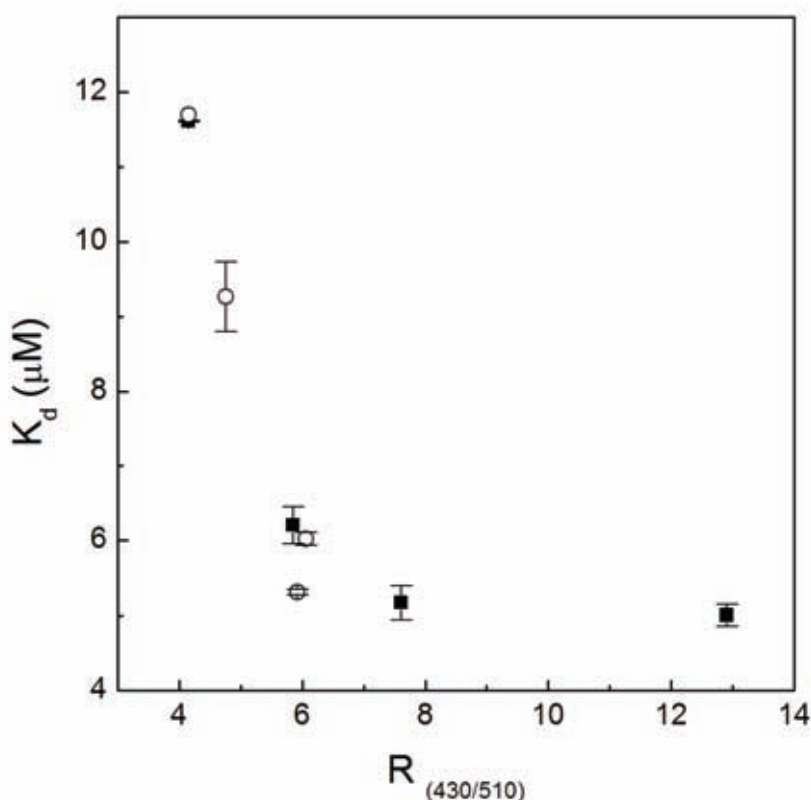
Els successius increments en la fluorescència acumulats deguts a l'addició de peptid de fusió a diferents concentracions finals ens va permetre calcular les corbes d'unió del FP23-H a liposomes formats de PC/PE (1:1) amb 6-KC (*Figura IV.29 A*) o amb colesterol (*Figura IV.29 B*) a diferents proporcions. Totes les corbes obtingudes es van ajustar a un model d'unió sigmoïdal utilitzant l'Eq. 6. Les corbes mostren dues particularitats: en primer lloc existeixen diferències en la intensitat final de fluorescència i aquestes diferències depenen del contingut en esteroles. Aquestes diferències podrien ser degudes a la diferent capacitat del peptid de fusió per unir-se a les diferents membranes (nombre de molècules de peptid unides per molècula de lípid) tot i que canvis en la conformació del peptid unit també podrien contribuir a les diferències de fluorescència observades.





**Figura IV.29.** Unió del FP23-H a LUVs marcats amb FPE. Les corbes d'unió es van obtenir a partir dels increments de fluorescència provocats per l'addició successiva del FP23-H a diferents concentracions finals a una suspensió de LUVs formats de: **(A)** PC/PE (1:1) amb 6-KC a diferents proporcions (PC/PE (1:1) (quadrats negres), 10 mol% de 6-KC (cercles blancs), 15 mol% de 6-KC (triangles negres), 30 mol% de 6-KC (triangles blancs)). **(B)** PC/PE (1:1) amb colesterol a diferents proporcions (PC/PE (1:1) (quadrats negres), 33 mol% de colesterol (cercles blancs), 40 mol% de colesterol (triangles negres)). La concentració final de LUVs va ser 300 μM en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

En segon lloc, les corbes d'unió revelen un efecte inequívoc del contingut d'esterols en l'afinitat del pèptid de fusió per les membranes, ja que tant el colesterol com el 6-KC provoquen una disminució de la constant de dissociació. Aquest augment de l'afinitat podria ser degut a l'augment en el potencial dipolar de membrana provocat pels esterols. A més, aquest augment de l'afinitat va ser més potent en el cas del 6-KC que en el del colesterol. Per tal d'analitzar la possible relació entre el potencial dipolar de membrana i l'augment de l'afinitat del pèptid per la membrana, es va representar la constant de dissociació ( $K_d$ ) derivada de l'ajust de les corbes de la *Figura IV.29* a l'*Eq. 6* en funció de la magnitud del potencial dipolar de membrana ( $R_{(430/510)}$ ), tal i com mostra la *Figura IV.30*.



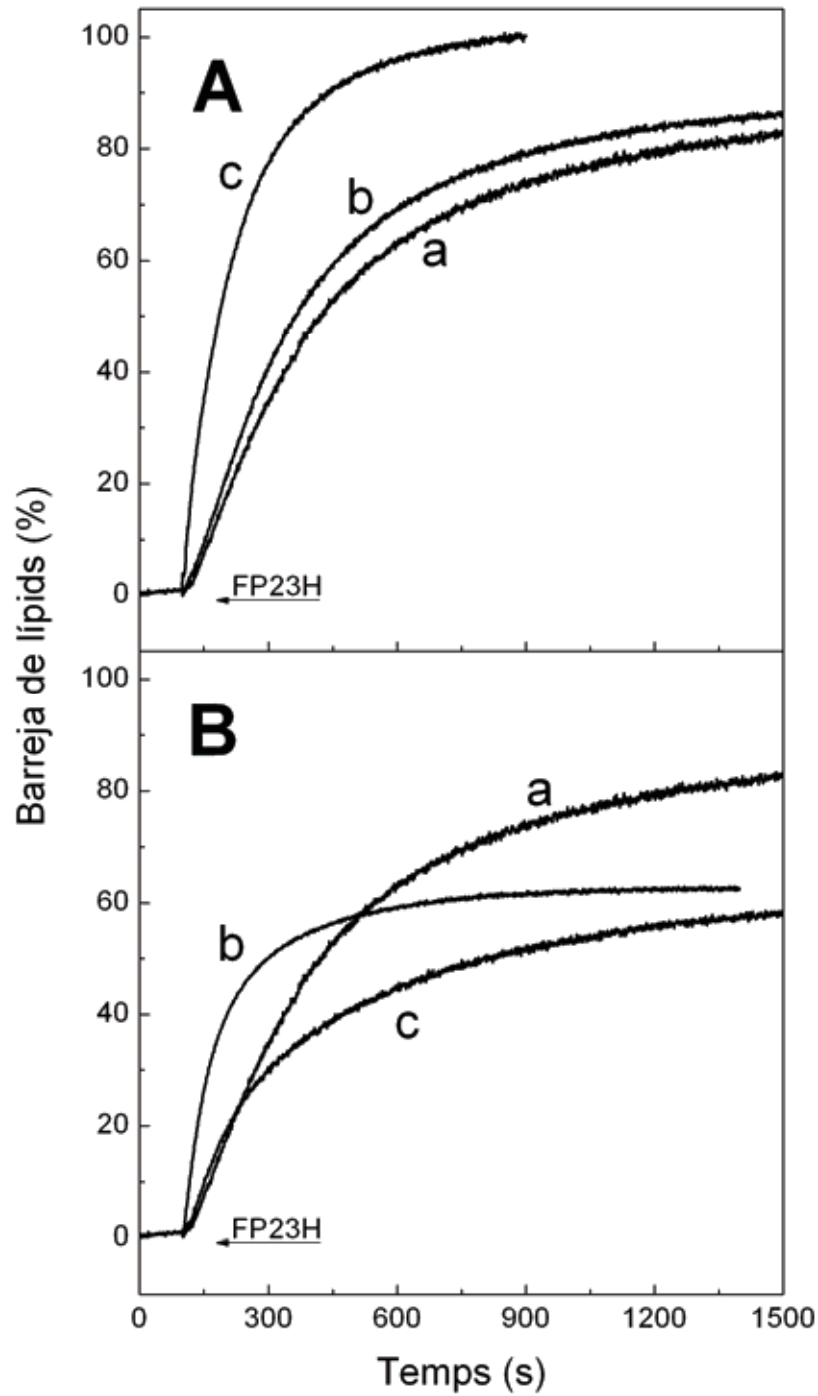
**Figura IV.30.** Relació entre la magnitud del potencial dipolar de membrana i les constants de dissociació del pèptid de fusió FP23-H a LUVs formats de PC/PE (1:1) amb 6-KC (quadrats negres) o amb colesterol (cercles blancs). El valor de  $R_{(430/510)}$  deriva de la *Figura IV.26* i els valors de  $K_d$  deriven de la *Figura IV.29*.

Els resultats mostren com existeix una relació entre l'afinitat del pèptid de fusió per les membranes a valors de  $R_{(430/510)}$  inferiors a 8.

### *IV. 3. 3. Efecte del Colesterol i del 6-cetocolestanol en la Barreja de Lípids Induïda pel Pèptid de Fusió*

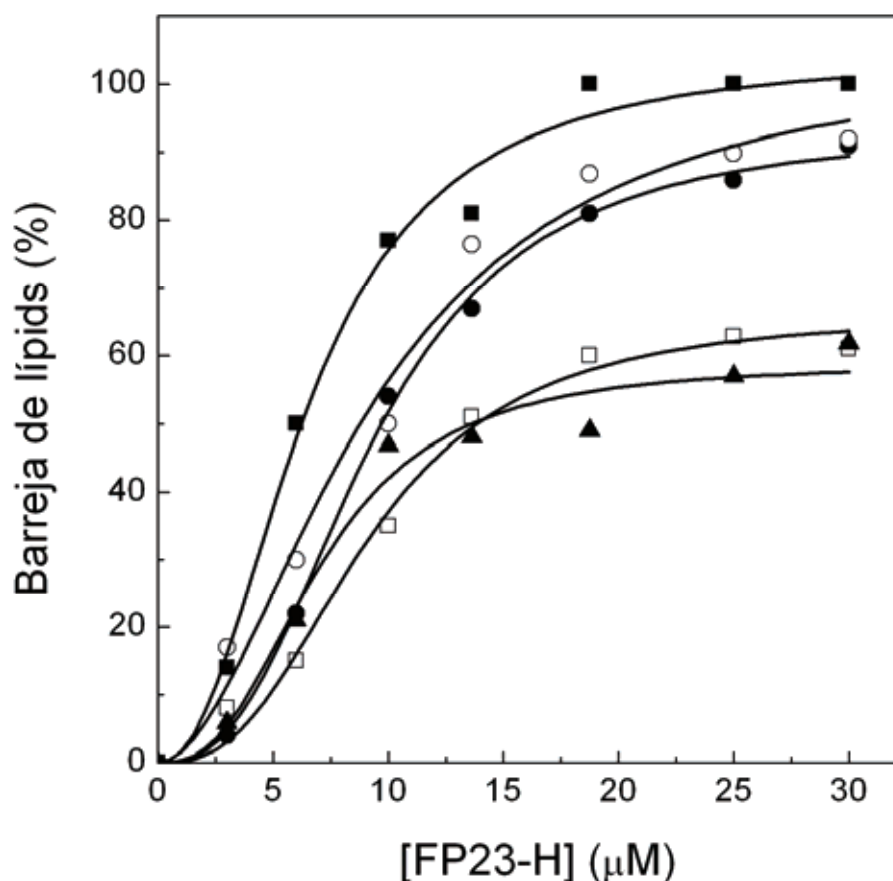
La *Figura IV.31* mostra l'augment de la fluorescència de la sonda NBD-PE (disminució de la transferència d'energia) degut a l'addició de pèptid de fusió en els diferents tipus de membrana a una relació molar lípid/pèptid de 10, indicatiu de la fusió de membranes. A partir de la figura es pot deduir que el 6-KC augmenta tant la velocitat de la barreja de lípids com l'extensió d'aquest procés quan es compara amb les membranes formades per PC/PE (1:1) (*Figura IV.31 A*). En canvi el colesterol disminueix l'extensió de la barreja de lípids, però el seu efecte sobre la velocitat d'aquest procés és més complex ja que depèn del percentatge de colesterol present a la membrana. Així doncs, la velocitat de la barreja de lípids és més elevada en presència de 33 mol% de colesterol que en absència de colesterol. En canvi, quan les membranes model presenten un 50 mol% de colesterol, la velocitat disminueix i és similar a la velocitat de la barreja de lípids de les membranes de PC/PE (1:1) (*Figura IV.31 B*).

A partir d'aquestes dades, es pot deduir que l'efecte del colesterol i del 6-KC sobre la velocitat de la barreja de lípids és imputable a la variació del potencial dipolar, ja que ambdues substàncies augmenten la seva magnitud. En canvi, l'efecte contrari del colesterol i del 6-KC sobre l'extensió total del procés de barreja de lípids ha de ser degut a la influència d'aquestes substàncies sobre altres paràmetres, com la hidratació de la bicapa o la fluïdesa de la membrana, sobre els quals tenen un efecte contrari, com es comentarà amb més detall en l'apartat de Discussió.



**Figura IV.31.** Barreja de lípids en funció del temps provocada per l'addició de FP23-H a una concentració final de  $30 \mu\text{M}$  a una suspensió de LUVs formats de: **(A)** (a) PC/PE (1:1) o (b) amb 15 mol% de 6-KC o (c) amb 30 mol% de 6-KC. **(B)** (a) PC/PE (1:1) o (b) amb 33 mol% de colesterol o (c) amb 50 mol% de colesterol. La concentració de LUVs va ser  $300 \mu\text{M}$  en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser  $20^\circ\text{C}$ .

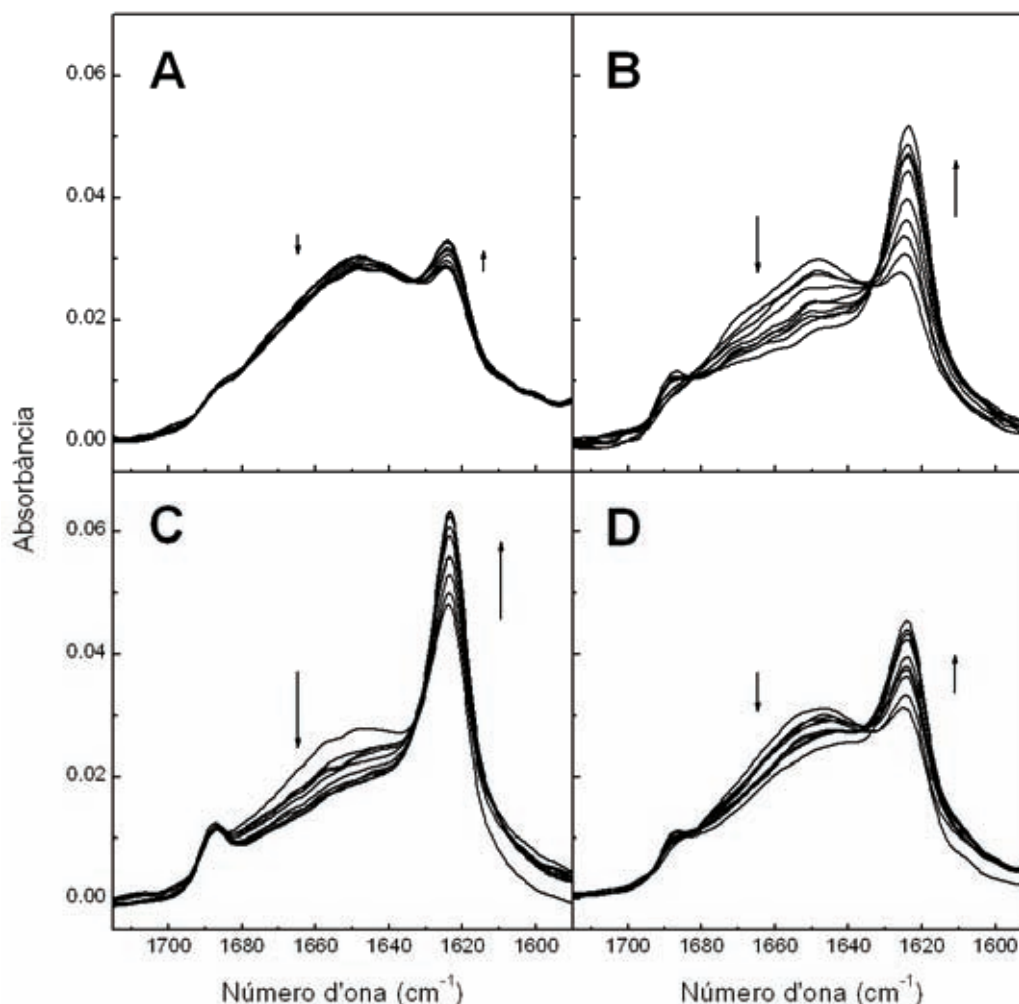
L'efecte diferent del colesterol i del 6-KC en la extensió de la barreja de lípids es presenta a la *Figura IV.32* on els valors finals de l'extensió de la barreja de lípids (*plateaus* de les cinètiques de barreja de lípids) es representen en funció de la concentració de FP23-H addicionat per a les diferents composicions lipídiques estudiades. Els resultats mostren clarament que la presència de 6-KC a les membranes model incrementa el percentatge de la barreja de lípids, mentre que el colesterol disminueix aquest percentatge quan es compara amb el percentatge de la barreja de lípids induïda pel FP23-H en liposomes formats de PC/PE (1:1). A més, si es comparen les corbes de la barreja de lípids amb les corbes d'unió (*Figura IV.29*), es veu com la barreja de lípids té lloc a la vegada que el pèptid s'uneix a les membranes.



**Figura IV.32.** Percentatge de la barreja de lípids induïda per l'addició de FP23-H a diferents concentracions finals a una suspensió de LUVs marcats amb NBD-PE/Rh-PE formats per PC/PE (1:1) (cercles negres) o amb 6-KC (15 mol% (cercles blancs) o 30 mol% (quadrats negres)) o amb colesterol (33 mol% (quadrats blancs) o 50 mol% (triangles negres)). La concentració de lípid va ser 300 μM en tampó 10 mM TRIS pH 7.5. La temperatura va ser 20°C.

#### IV. 3. 4. Efecte del Colesterol i del 6-cetocolestanol en la Conformació del Pèptid de Fusió al Interaccionar amb les Membranes Model

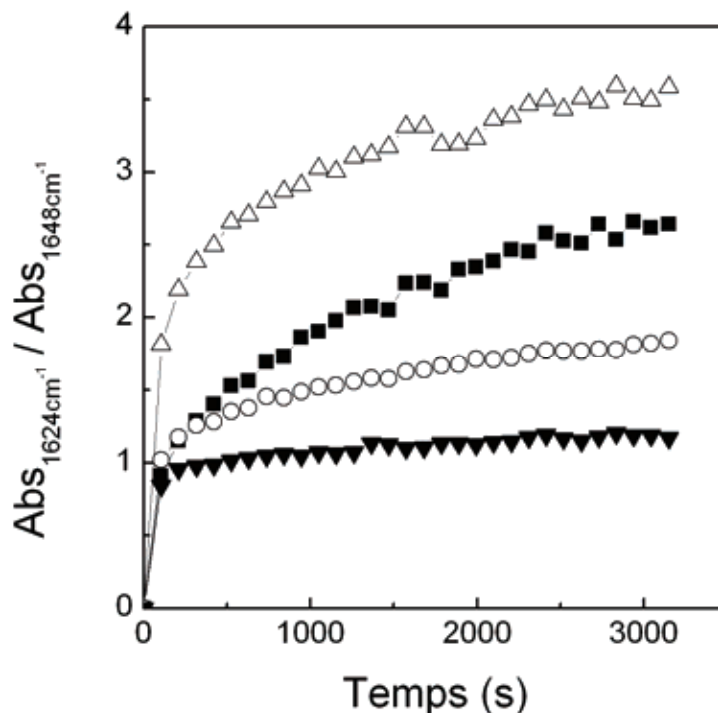
Per tal d'aprofundir en el coneixement dels canvis estructurals que es produeixen durant la interacció del FP23-H amb membranes, es van monitorar les variacions en l'estructura secundària del pèptid de fusió en funció del temps, tant en absència com en presència de membranes de diferent composició lipídica, mitjançant FTIR a una relació molar lípid/pèptid en la qual es produeix barreja de lípids i que no està influenciada per la diferent afinitat del pèptid de fusió per les membranes. Els resultats obtinguts es mostren a la *Figura IV.33*.



**Figura IV.33.** (A) FP23-H (a una concentració final de 1mM) en tampó 10 mM HEPES pD 7.5. FP23-H addicionat a una suspensió de LUVs a una concentració final de 10 mM formats de: (B) PC/PE (1:1), (C) 15 mol% de 6-KC i (D) 50 mol% de colesterol. Els espectres van ser adquirits en funció del temps cada 110 segons. Cada espectre és una mitjana de 20 espectres. Tots els espectres van ser corregits de la contribució del tampó i el vapor atmosfèric. La temperatura va ser 20°C. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

Els espectres del FP23-H en tampó 10 mM HEPES pD 7.5 deuterat (*Figura IV.33 A*), revelen dues bandes principals: una al voltant de  $1624\text{ cm}^{-1}$ , característica d'estructures  $\beta$  agregades intermoleculares i una altra banda ampla amb un màxim centrat al voltant  $1648\text{ cm}^{-1}$ , i que segons la literatura podria ser assignable a una barreja de estructura helicoïdal i estructura no-ordenada (Byler i Susi, 1986; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2001; Schweitzer-Stenner *i col.*, 2003). D'altra banda, quan el FP23-H s'addiciona a una suspensió de liposomes, es produeix un increment en la intensitat de la banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , la qual va acompanyada simultàniament d'una disminució de la intensitat de la banda a  $1648\text{ cm}^{-1}$ . Aquest fet podria ser interpretat com la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular a partir d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada, tal i com s'ha descrit al capítol anterior. A més, la figura mostra com la presència de 15 mol% de 6K-C (*Figura IV.33 C*) o de 50 mol% de colesterol (*Figura IV.33 D*) als liposomes augmenta i disminueix respectivament la intensitat de la banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$  en relació als liposomes formats de PC/PE (1:1).

Per tal de visualitzar aquestes diferències, es va representar la relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  (*Figura V.34*) a partir dels espectres de la *Figura IV.33* en funció del temps. Aquesta representació mostra clarament que la presència dels liposomes en tots els casos potencia la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular. A més, en els liposomes amb 6-KC es produeix un augment en la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular en relació als liposomes formats de PC/PE (1:1), mentre que la presència de colesterol als liposomes disminueix la formació d'aquest tipus d'estructura. A més, aquests resultats coincideixen amb els resultats obtinguts de la barreja de lípids, en els quals la presència de 6-KC augmentava l'extensió de la barreja de lípids mentre que la presència de colesterol als liposomes la disminuïa.

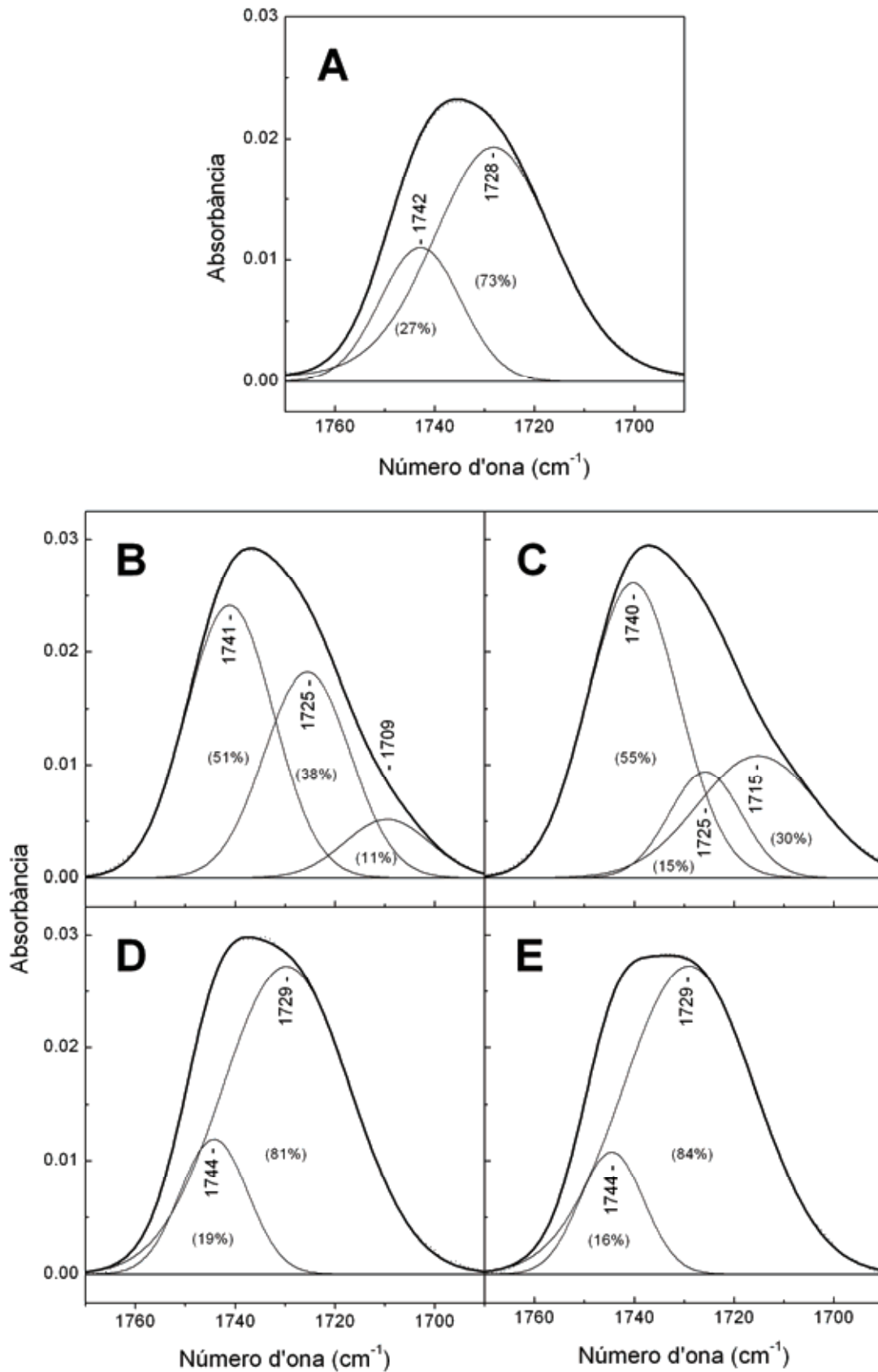


**Figura IV.34.** Representació de la relació d'intensitats a  $1624\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  del pèptid de fusió FP23-H en absència de LUVs (triangles negres invertits) o en presència de LUVs de diferent composició: (PC/PE (1:1) (quadrats negres), 15 mol% de 6-KC (triangles blancs), 50 mol% de colesterol (cercles blancs). La temperatura va ser  $20^{\circ}\text{C}$ . El temps mort de l'experiment va ser de 50 s. Les dades provenen de la *Figura IV.33*.

#### IV. 3. 5. Efecte del Colesterol i del 6-cetocolestanol en el Grau d'Hidratació de les Membranes Model

Es va analitzar l'efecte de la presència de colesterol i de 6-KC a les membranes sobre el seu grau d'hidratació. La *Figura IV.35* mostra la regió dels carbonils dels fosfolípids de l'espectre FTIR de membranes model formades de PC/PE (1:1) o amb colesterol, o 6-KC, a diferents proporcions. Els espectres de FTIR presenten tres bandes: una centrada al voltant de  $1739\text{-}1744\text{ cm}^{-1}$ , la qual pot ser assignada a la vibració dels carbonils dels fosfolípids deshidratats, una altra banda centrada al voltant de  $1720\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ , assignable als carbonils dels fosfolípids hidratats, i finalment una tercera banda al voltant de  $1710\text{ cm}^{-1}$  que s'assigna a la vibració dels carbonils dels fosfolípids dihidratats, és a dir, que formen ponts d'hidrogen amb dues molècules d'aigua (Aranda *i col.*, 2003; Mantsch i McElhaney, 1991; Nir i Nieva, 2000; Sáez-Cirió i Nieva, 2002). La figura mostra clarament com el 6-KC redueix el percentatge de grups carbonils que formen ponts d'hidrogen amb molècules d'aigua mentre que el colesterol incrementa el grau d'hidratació de les membranes.





**Figura IV.35.** Regió de l'espectre d'infraroig corresponent a la vibració de l'enllaç carbonil del grup èster de membranes formades per **(A)** PC/PE (1:1), **(B)** 15 mol% de 6-KC, **(C)** 30 mol% de 6-KC, **(D)** 33 mol% de colesterol i **(E)** 50 mol% de colesterol.

Els ajustos de les bandes corresponents a la vibració de l'enllaç carbonil del grup èster dels fosfolípids van ser únics i inequívocs. Independentment dels paràmetres inicials de cadascun dels ajustos, la solució va ser sempre única.

El resum de les dades dels ajustos de les bandes de l'enllaç carbonil en absència de pèptid es mostren a la taula següent (*Taula 7*):

	Carbonil Deshidratat		Carbonil Monohidratat		Carbonil Dihidratat	
	Àrea (%)	Màxim (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Màxim (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Màxim (cm <sup>-1</sup> )
PC/PE (1:1)	27	1742	73	1728	-	-
6-KC (15%)	51	1741	38	1725	11	1709
6-KC (30%)	55	1740	15	1725	30	1715
COL (33%)	19	1744	81	1729	-	-
COL (50%)	16	1744	84	1729	-	-

**Taula 7.** Taula resum mostrant les dades obtingudes de l'ajust de les bandes associades a l'enllaç carbonil en absència de pèptid de fusió a membranes de diferent composició lipídica.

**Discussió**

## V. DISCUSSIÓ

### V. 1. Fusió de Membranes Induïda pel Pèptid de Fusió de la Proteïna gp41 del VIH

En el present treball s'ha estudiat la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model. Quan hom revisa els diferents treballs presents a la literatura s'adona que, degut a les diferències en la seqüència i llargada del pèptid de fusió emprat, en les tècniques i condicions experimentals utilitzades o en la composició lipídica de les membranes model, existeixen interpretacions oposades sobre quin tipus d'estructura adopta el pèptid de fusió al interaccionar amb membranes i que desencadena la fusió.

Per aquest motiu, ens vàrem proposar l'estudi de la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model d'una manera sistemàtica aplicant un conjunt de tècniques biofísiques que poguessin informar sobre els diferents esdeveniments que tenen lloc durant aquesta interacció (unió a les membranes, canvis conformacionals i barreja de lípids) i que acaben amb la fusió de membranes. L'elucidació d'aquests esdeveniments havia de permetre posteriorment determinar com aquests podien veure's afectats, per una banda, per canvis en la seqüència peptídica i per l'altra per canvis en la composició físico-química de la membrana. Cal destacar que el present treball s'ha centrat especialment en l'obtenció de dades cinètiques que han fet possible una interpretació de la dinàmica dels processos moleculars estudiats.

#### *V. 1. 1. Estat d'Agregació i Estructura Secundària dels Pèptids de Fusió en DMSO*

La primera qüestió que vàrem abordar va ser l'elecció d'un dissolvent adient per resuspendre els pèptids de fusió. Degut a l'elevada hidrofobicitat dels diferents pèptids de fusió, no era adient resuspendre'ls en tampó aquós, ja que s'agreguen molt ràpidament. En determinats treballs es descriu la suspensió del pèptid de fusió en alcohols halogenats, com el trifluoroetanol (TFE) o el hexafluoroisopropanol (HFIP) (Gordon *i col.*, 2004; Gordon *i col.*, 2002; Mobley *i col.*, 1999). Aquesta opció va ser desestimada perquè segons Dwyer (1999) aquests tipus d'alcohols indueixen la formació d'hèlixs  $\alpha$  i podrien bloquejar el pèptid en aquesta estructura.

En altres treballs s'ha utilitzat el metanol (MeOH) o una barreja de metanol/cloroform (MeOH/CH<sub>3</sub>Cl) per dissoldre el pèptid de fusió, però només per realitzar experiments d'ATR-FTIR (Gerber *i col.*, 2004; Pritsker *i col.*, 1999; Shnaper *i col.*, 2004). Mitjançant aquest procediment es poden barrejar els lípids, també dissolts en aquesta barreja de dissolvents orgànics, amb el pèptid de fusió, per tal de, evaporant el dissolvent, obtenir un film sec adient per aquests tipus de mesures. L'inconvenient d'aquest mètode és, però, que aquesta barreja no és adient per als experiments de fluorescència, ja que el dissolvent per si mateix podria afectar la integritat de les membranes model.

Finalment, en molts treballs els pèptids de fusió són resuspendos en DMSO (Martin *i col.*, 1993a; Martin *i col.*, 1996; Nieva *i col.*, 1994; Pereira *i col.*, 1995; Pereira *i col.*, 1997b; Pereira *i col.*, 1999; Sáez-Cirión i Nieva, 2002). Aquest dissolvent semblava el més adequat, ja que es pot utilitzar tant en els experiments d'IR com en els de fluorescència sense alterar la integritat de les membranes model sempre i quan, la proporció de DMSO es mantingui per sota d'uns límits (Lu *i col.*, 1998). No quedava clar, però, a partir de l'anàlisi bibliogràfic, quin tipus d'estructura adoptaven els pèptids de fusió en aquest dissolvent, ni tampoc quin era el seu estat d'agregació. En la majoria dels treballs en els quals el pèptid de fusió es dissolia en DMSO no es presentava cap tipus d'informació que fes referència a l'estructura que adopta el pèptid de fusió en aquest dissolvent o al seu estat d'agregació. Només Martin *i col.* (1996) descriu l'estructura secundària del pèptid de fusió de 16 residus en DMSO mitjançant ATR-FTIR com una estructura  $\beta$  agregada un cop és exposat a un flux d'aire sec saturat de D<sub>2</sub>O. Aquestes condicions experimentals probablement provoquen que la relació DMSO/pèptid sigui menor que la que té aquest pèptid en la suspensió, degut a l'evaporació del DMSO durant la preparació de la mostra, la qual cosa explicaria l'agregació del pèptid observada.

Els estudis portats a terme en el present treball, mostren que per a tots els pèptids de fusió estudiats, els espectres d'IR són molt similars, mostrant clarament que els pèptids dissolts en DMSO no es troben agregats (absència de la banda característica a 1620 cm<sup>-1</sup>). D'altra banda, tots els espectres d'IR presenten un únic màxim centrat al voltant de 1666-1663 cm<sup>-1</sup>, la qual cosa indica, segons Jackson i Mantsch (1991), que els pèptids dissolts en DMSO adoptarien una estructura monomèrica i no-ordenada, molt probablement degut a que els grups S=O de la

molècula de DMSO competirien amb els grups C=O de l'enllaç peptídic per establir ponts d'hidrogen amb els grups N-H d'aquest mateix enllaç.

D'aquesta manera, hem pogut determinar l'estat inicial del pèptid de fusió en el nostre sistema en el moment de ser afegit a les suspensions de membranes amb les que ha d'interaccionar.

### ***V. 1. 2. Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model***

El primer esdeveniment en el procés d'interacció d'un pèptid amb una membrana biològica ha de ser, un cop el pèptid es troba en el medi que envolta la membrana, la unió d'aquest pèptid a la mateixa. En el nostre cas, hem estudiat la unió a membranes formades a partir d'una barreja equimolar de PC i PE.

L'elecció d'aquesta composició lipídica va ser deguda als següents criteris: en primer lloc, calia una composició lipídica bàsica per tal d'anar introduint posteriorment altres fosfolípids o compostos a les membranes model i observar el seu efecte sobre els diferents processos que tenen lloc durant la interacció del pèptid de fusió amb les membranes. En segon lloc, es va triar aquesta composició lipídica perquè està demostrat que la PE és un fosfolípid imprescindible perquè es produeixi la barreja de lípids (Martin *i col.*, 1993b; Martin i Ruyschaert, 1995), ja que aquest fosfolípid indueix la curvatura negativa de les membranes, fet necessari perquè tingui lloc, segons la hipòtesi de l'*stalk*, la fusió de membranes. (Chernomordik i Kozlov, 2005).

La unió dels pèptids de fusió estudiats en el present treball amb les membranes model formades de PC/PE (1:1) i marcades amb el sensor fluorescent de potencial de superfície FPE provoca en tots els casos increments en la fluorescència de la sonda, causats per la interacció de les càrregues positives dels pèptids (cadena lateral d'Arg i extrem amino terminal) amb la membrana. L'estudi d'aquestes variacions en la fluorescència de la sonda FPE ha permès determinar, d'una banda la cinètica del procés d'unió i per l'altra, i a partir d'estudis en funció de la concentració de pèptid de fusió, la termodinàmica d'aquest procés mitjançant les corbes d'unió.

### V. 1. 2. i) Cinètiques d'Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model

El marcatge de les membranes model amb la sonda fluorescent FPE permet seguir la variació en temps real del potencial de superfície de la membrana. L'increment de fluorescència provocat pels pèptids de fusió, carregats positivament, correspon a la unió dels mateixos a la superfície de la membrana. De l'ajust de les traces fluorescentes en funció del temps (*Figura IV.4 i Figura IV.15*) a processos exponencials n'hem extret les constants aparents de la unió (*Taula 4 i Taula 6*).

A partir de la comparació de les traces i de les constants, hem pogut constatar que, tot i que el FP23-H presenta una unió clarament més lenta, no és possible establir cap correspondència lògica entre les constants calculades i les característiques de les seqüències lineals dels pèptids (llargada de la seqüència, nombre de càrregues positives i proporció de residus hidrofòbics/hidrofílics). Això és probablement, perquè el que interacciona amb les membranes no són els monòmers de pèptids sinó, tal i com es discutirà amb detall més endavant (**Discussió V. 1. 5.**), els agregats peptídics que es formen en el medi aquós de manera molt ràpida, quan els pèptids són afegits a les suspensions de membranes.

### V. 1. 2. ii) Corbes d'Unió dels Pèptids de Fusió a Membranes Model

Les corbes d'unió obtingudes per als pèptids FP16, FP23-H i FP23-Ac mostren que els tres tenen una afinitat per les membranes model similar, presentant una constant de dissociació al voltant de 10  $\mu\text{M}$ . En el cas del FP16 aquest valor de la constant de dissociació és consistent amb la publicada prèviament utilitzant la mateixa tècnica (Cladera *i col.*, 2001). En canvi, el FP33 presenta una afinitat per les membranes model més gran que els altres tres pèptids, essent la constant de dissociació de 4  $\mu\text{M}$ . Cal mencionar, però, que per aquest pèptid s'han descrit altres corbes d'unió. En aquests casos, però, es marcava el pèptid de fusió amb la sonda fluorescent rodamina i s'addicionava a una suspensió de liposomes. Un cop el pèptid de fusió interacciona amb les membranes, es produeix un desplaçament en l'espectre d'excitació de la sonda fluorescent, el qual s'utilitza per a realitzar la corba d'unió. Els resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica varien significativament dels resultats presentats en aquest treball obtinguts amb la tècnica de marcatge de les membranes amb FPE. Aquestes diferències podrien ser provocades pel simple fet del marcatge del pèptid amb la sonda, que podria fer que no es comportés de la

mateixa manera que el pèptid de fusió no marcat, o bé degut a què la composició lipídica dels liposomes d'aquests experiments era diferent (Kliger *i col.*, 1997; Peisajovich *i col.*, 2000a; Pritsker *i col.*, 1999; Sackett i Shai, 2002).

En qualsevol cas queda clar a partir dels nostres experiments que la presència del segment 24-33 augmenta l'afinitat del pèptid de fusió per les membranes de PC/PE.

Les corbes d'unió també aporten informació sobre el grau de cooperativitat d'aquesta unió. Així, mentre que el FP16, el FP23-Ac i el FP33 van presentar unes corbes d'unió amb un fort caràcter hiperbòlic (sense cooperativitat), el FP23-H va presentar una corba d'unió amb un fort caràcter sigmoïdal, la qual cosa és indicativa d'un cert grau de cooperativitat. El coeficient de Hill obtingut a partir de l'ajust de les dades experimentals de la corba d'unió del pèptid de fusió FP23-H a l'Eq. 6 és de 9. Això demostra que, a diferència del que passa amb els pèptids FP16, el FP23-Ac i el FP33, la unió del FP23-H amb membranes model té lloc de manera cooperativa. Donat que la proteïna gp41 es troba a la membrana vírica en forma de trímers (Chan *i col.*, 1997; Tan *i col.*, 1997; Weissenhorn *i col.*, 1997) i que la fusió de membranes implica un agrupament de glicoproteïnes virals a la superfície de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste (Ugolini *i col.*, 1999), és temptador intentar relacionar aquest coeficient de Hill amb la formació de nonàmers o trímers de trímers un cop es produeix la unió a membranes d'aquest pèptid. El fet que el FP23-H sigui l'únic dels pèptids de fusió estudiats que presenta cooperativitat en la unió a membranes podria ser degut a la diferent solubilitat que presenten en solució aquosa. Arribats en aquest punt, però, és convenient mencionar que els coeficients de Hill derivats de les corbes d'unió del pèptid del virus de la grip, no són compatibles amb el model cinètic proposat per Bentz i Mittal (2003). Aquest model explica bé les dades cinètiques però no el coeficient de Hill. Cal, doncs, ésser molt prudent a l'hora de treure conclusions d'aquest coeficient. Els nostres resultats també mostren un comportament diferent entre el FP23 amb l'extrem amino terminal protonat o amb l'extrem amino terminal acetilat. L'oligomerització del FP23-H un cop ha interaccionat amb les membranes model ja ha estat també descrita prèviament mitjançant ss-NMR (Yang *i col.*, 2000; Yang *i col.*, 2001; Yang i Weliky, 2003).



### V. 1. 3. Barreja de Lípids Induïda pel Pèptid de Fusió

Les cinètiques de la barreja de lípids mesurades per FRET (*Figures IV.8 i IV.20*) van ser consistents amb les dades obtingudes per a les cinètiques d'unió, ja que segueixen el mateix ordre: el FP16 i el FP23-Ac són els que produeixen barreja de lípids d'una manera més ràpida. A continuació segueix el FP33 i, per últim, el més lent va ser el FP23-H. D'altra banda, les cinètiques de barreja de lípids van ser sempre més lentes que les cinètiques d'unió, la qual cosa indica que la barreja de lípids és un procés posterior a la unió del pèptid a les membranes.

Tal i com s'ha dit per al procés d'unió del pèptid de fusió a les membranes, en el cas de la barreja de lípids tampoc resulta possible relacionar les diferències observades en les constants cinètiques aparents derivades del procés amb cap característica físico-química que es dedueixi de la seqüència aminoacídica del pèptid. Una altra vegada hem d'assenyalar el fet que són els agregats peptídics que es formen en el medi aquós i sobre la superfície de la membrana i no els monòmers existents en DMSO, els responsables del desencadenament del procés de la barreja de lípids. La velocitat a la qual es produeix la barreja de lípids vindrà determinada per la velocitat d'unió dels agregats a la membrana i per la velocitat a la que tinguin lloc els canvis conformacionals en el sí d'aquests agregats quan interaccionen amb les membranes.

Les mesures de la barreja de lípids en funció de la concentració de pèptid de fusió han demostrat que les seqüències utilitzades són fusogèniques a baixes relacions molars lípid/pèptid, les quals són les que hem utilitzat per a realitzar els experiments estructurals d'IR. En canvi, la majoria de les dades estructurals d'IR presents a la literatura, han estat realitzades a relacions molars lípid/pèptid en que no es produeix la barreja de lípids.

#### V. 1. 4. *Canvis Estructurals dels Pèptids de Fusió Deguts a la Interacció amb les Membranes Model*

Tot i la gran quantitat de treballs sobre l'estructura secundària que adoptaria el pèptid de fusió degut a la interacció amb les membranes, encara ara existeix una forta controvèrsia sobre quina seria l'estructura responsable de desencadenar el procés de fusió. Una part de la literatura proposa que l'estructura responsable de desestabilitzar la membrana i de desencadenar la fusió podria ser una hèlix  $\alpha$  inserida obliquament a la membrana (Gordon *i col.*, 1992; Gordon *i col.*, 2004; Gordon *i col.*, 2002; Martin *i col.*, 1993a; Martin *i col.*, 1996; Mobley *i col.*, 1999), mentre que l'altra part proposa que l'estructura  $\beta$  agregada intermolecular seria la responsable d'induir la fusió (Buzón *i col.*, 2005; Gerber *i col.*, 2004; Kliger *i col.*, 1997; Nieva *i col.*, 1994; Peisajovich *i col.*, 2003; Pereira *i col.*, 1997b; Pritsker *i col.*, 1998; Pritsker *i col.*, 1999; Sackett i Shai, 2003; Sackett i Shai, 2005; Sáez-Cirió i Nieva, 2002; Shnaper *i col.*, 2004; Yang *i col.*, 2001; Yang *i col.*, 2004; Yang i Weliky, 2003).

Un altre aspecte a destacar de les dades estructurals existents sobre els pèptids de fusió en relació al mateix procés de la fusió de membranes és que reflecteixen l'estructura del pèptid de fusió al final del procés, o bé representen una mitjana de les estructures que es poden donar al llarg del procés. És per això que en el present treball ens plantejarem l'obtenció de dades sobre l'estructura secundària d'aquests pèptids en funció del temps, utilitzant espectroscòpia d'IR, per tal de determinar la cinètica dels canvis conformationals associats a la interacció dels pèptids de fusió amb les membranes.

Els espectres d'IR mostren que els pèptids de fusió en tampó aquós (en absència de membranes) formen més estructura  $\beta$  intermolecular agregada com més hidrofòbics són (ordenant-los de menor a major contingut en estructura  $\beta$  intermolecular: FP23-H < FP33 < FP23-Ac < FP16). L'espectre del FP23-H denota un cert grau d'agregació, ja que presenta una banda centrada a  $1624\text{ cm}^{-1}$  característica dels agregats, però aquesta banda d'agregació intermolecular no domina l'espectre. La banda que domina l'espectre és una banda ampla amb un màxim centrat al voltant de  $1648\text{ cm}^{-1}$  (barreja d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada) amb una intensitat similar de la banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$ . La intensitat relativa d'aquesta banda a  $1648\text{ cm}^{-1}$  respecte a la banda a  $1624\text{ cm}^{-1}$ , es troba molt reduïda en el cas del

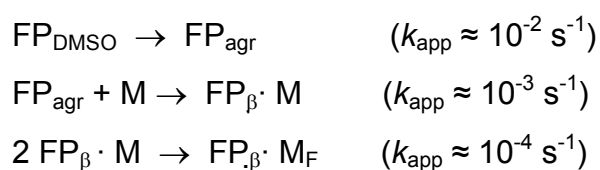
FP23-Ac (un pèptid més hidrofòbic que el FP23-H ja que presenta l'extrem amino terminal acetilat), essent molt similar a l'espectre del FP33 i gairebé ha desaparegut en el cas del FP16, un pèptid el qual no té la seqüència 17-23 que és bastant hidrofílica (*Figura IV.10* i *Figura IV.18*).

D'altra banda, si els pèptids es barregen amb les membranes, en tots els casos queda clar que la quantitat d'estructura  $\beta$  intermolecular formada és major que quan els pèptids es troben en tampó. Així doncs, les membranes promouen la formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular.

### V. 1. 5. Seqüència d'Esdeveniments Moleculars que Conduïxen a la Fusió de Membranes

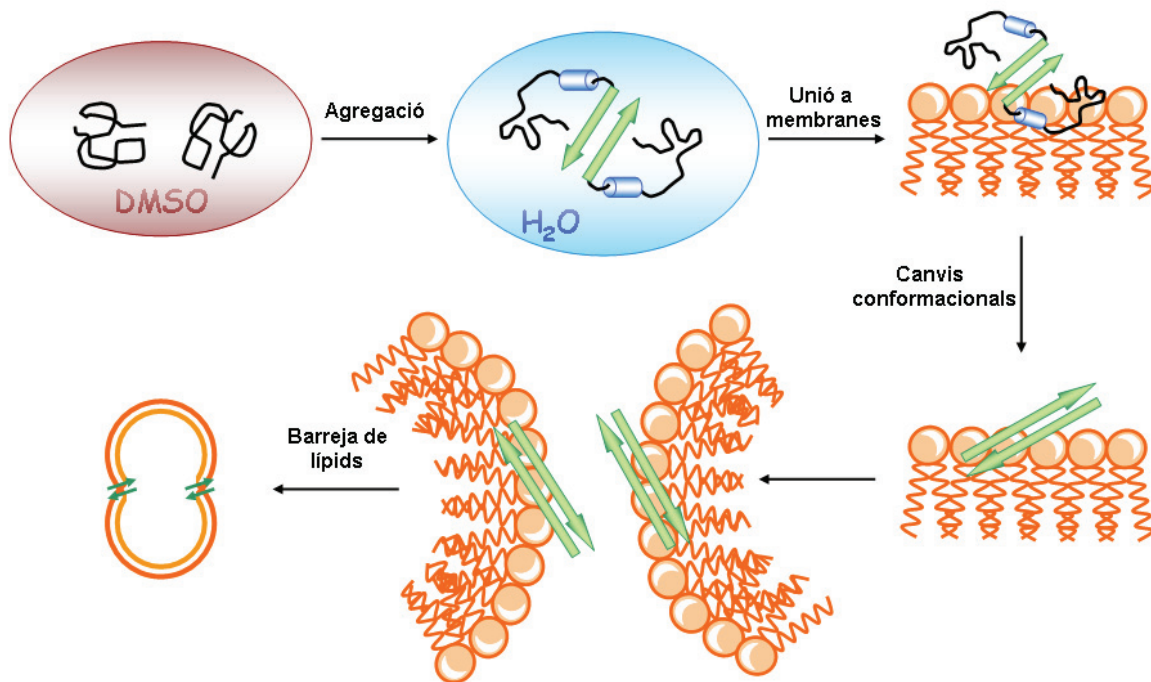
Els resultats obtinguts per als pèptids de fusió FP23-H i FP33 en presència de membranes (per als quals és mesurable el canvi conformacional que es produeix quan el pèptid interacciona amb la membrana) a partir dels espectres de FTIR en funció del temps, ens ha permès descriure per primera vegada una seqüència d'esdeveniments comparant de les dades cinètiques de la unió a membranes, de la barreja de lípids i del canvi conformacional. Segons la comparació d'aquestes dades cinètiques dels diferents processos que tenen lloc durant la fusió, primer es formarien ràpidament agregats en tampó aquós, els quals s'unirien a la membrana. Un cop units, aquests sofririen un canvi conformacional formant-se més estructura  $\beta$  agregada intermolecular, la qual finalment desencadenaria el procés de la fusió de membranes.

Aquesta seqüència d'esdeveniments es presenta en el següent esquema (les constants aparents fan referència a les constants obtingudes per al FP23-H). En el cas del FP33 les constants de la unió van ser més ràpides, però estarien d'acord amb el model proposat per al cas del FP23-H (*Taula 4*):



on  $FP_{DMSO}$  és el pèptid de fusió dissolt en DMSO (amb estructura secundària no-ordenada),  $FP_{agr}$  és el pèptid de fusió en medi aquós formant una barreja d'estructura helicoïdal, d'estructura no-ordenada i estructura  $\beta$  agregada intermolecular,  $M$  és la membrana,  $FP_{\beta} \cdot M$  és el complex format quan el pèptid de fusió agregat en aigua interacciona amb les membranes i  $FP_{\beta} \cdot M_F$  és el complex de pèptid de fusió formant una estructura  $\beta$  agregada i que desencadena el procés de fusió. Les dades cinètiques ens indiquen, doncs, que la barreja de lípids està precedida per un canvi conformacional en el qual es produeix la transformació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular a partir d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada i que aquest canvi conformacional es produeix un cop el pèptid ha interaccionat amb la membrana.

D'acord amb les dades cinètiques, el FP23-Ac i el FP16 presenten unes constants de temps diferents a les del FP23-H i del FP33. Per a les dues primeres seqüències, les constants de temps del canvi estructural no han pogut ser mesurades. Tot i això, es pot deduir que aquest podria ser un procés més ràpid o igual que el procés d'unió. D'altra banda, i a diferència de les cinètiques del FP23-H, les constants de temps derivades de la unió i de la barreja de lípids pel FP23-Ac i pel FP16 són molt similars. En el cas d'aquests dos pèptids per als quals no s'ha pogut determinar clarament (tal i com s'ha fet per al FP23-H i el FP33) que la barreja de lípids sigui més lenta que la unió, no es pot descartar un procés cinètic en el que la unió a les membranes seria el pas limitant. La següent figura mostra un esquema dels esdeveniments moleculars que condueixen a la fusió de membranes induïda pel pèptid de fusió FP23-H (*Figura V.1*).



**Figura V.1.** Model de la fusió de membranes deduït de les dades cinètiques de la unió, del canvi conformational i de la barreja de lípids del pèptid de fusió FP23-H. Aquest pèptid dissolt en DMSO presenta una estructura monomèrica i no-ordenada. Al passar al medi aquós el pèptid de fusió es transforma en una barreja d'estructura helicoidal, estructura no-ordenada i estructura  $\beta$  agregada intermolecular. Seguidament, aquest tipus d'agregats interaccionen amb les membranes, sofreixen un canvi conformational i es forma més estructura  $\beta$  agregada intermolecular, la qual finalment desencadena el procés de la barreja de lípids.

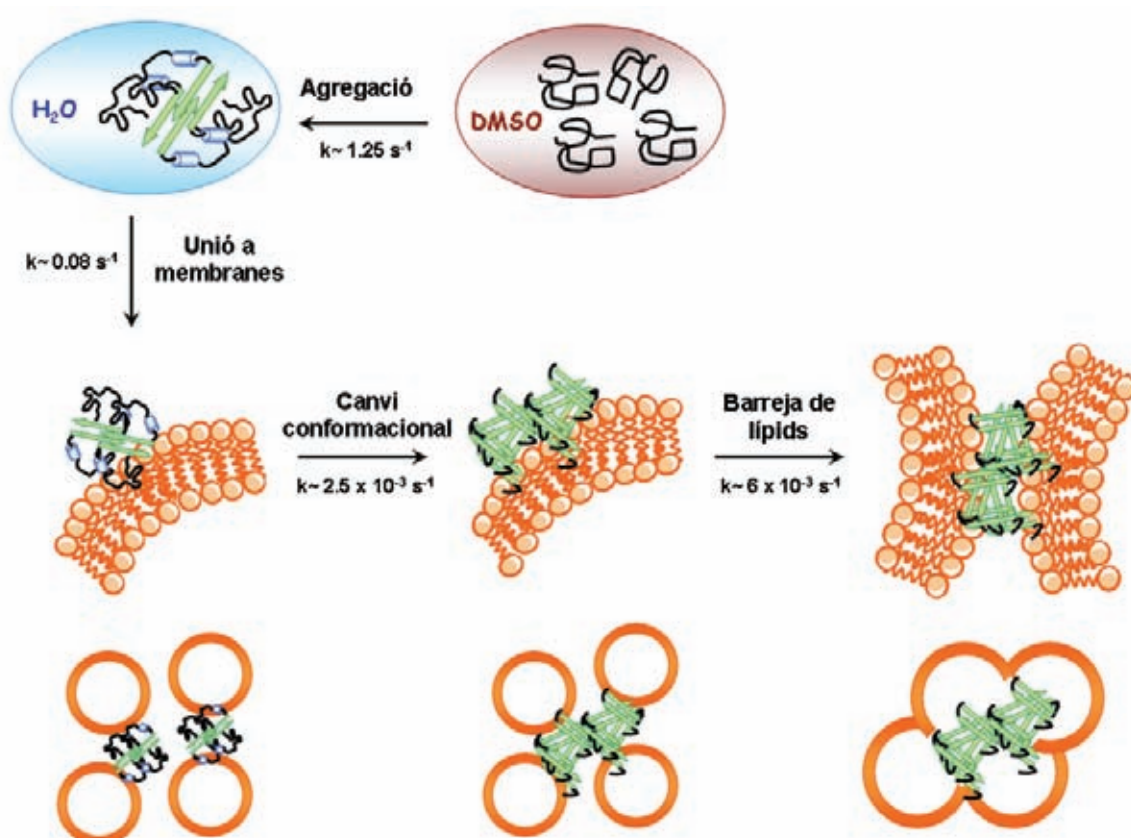
En aquest punt és important tenir en compte el fet que les concentracions de pèptid de fusió a les quals s'han portat a terme els experiments d'IR són molt diferents (unes 33 vegades superiors) de les concentracions utilitzades en els experiments de fluorescència. Per tal que aquest fet no afectés la possibilitat de comparar la cinètica del canvi estructural amb les cinètiques d'unió a les membranes i de barreja de lípids, totes les mesures es varen dur a terme a una relació molar lípid/pèptid constant. Hem de tenir en compte que en unir-se el pèptid a la superfície de la membrana es produeix una reducció de la dimensionalitat: es passa de tres dimensions a dues dimensions a la superfície de la membrana. Per analogia amb el que passa a les reaccions catalitzades per una superfície, podem suposar que les constants de reacció dependran únicament de la concentració de pèptid a la superfície de la membrana. Si això és així, una disminució de la concentració de pèptid en els experiments d'IR, acompanyada de la corresponent disminució de la concentració de lípid per tal de mantenir constant la relació molar lípid/pèptid, no

hauria d'afectar la constant cinètica aparent calculada. Aquest fet queda demostrat a la Figura IV.12.

Els resultats descrits anteriorment estarien d'acord amb el fet àmpliament descrit a la literatura que, a relacions molars lípid/pèptid per a les quals es detecta la fusió de membranes, l'estructura secundària dominant del pèptid de fusió és una estructura  $\beta$  agregada intermolecular. En el nostre treball queda demostrat que la formació d'estructura  $\beta$  intermolecular és afavorida per la membrana i que es produeix abans que comenci el procés de barreja de lípids. En canvi, les estructures helicoïdals han estat descrites a relacions molars lípid/pèptid elevades. Cal mencionar també que la formació d'estructura helicoïdal en el cas del FP23-H a relacions molars lípid/pèptid fusogèniques també ha estat descrita per a pèptids dissolts en HFIP (Gordon *i col.*, 2002; Mobley *i col.*, 1999), però s'ha de tenir en compte, com s'ha mencionat anteriorment, que el HFIP és un formador d'estructura helicoïdal, i a més en aquests treballs no es presenten dades que permetin relacionar la formació d'estructura helicoïdal amb la barreja de lípids.

Resumint, les dades presentades en aquest treball han permès per primera vegada presentar un model cinètic de la interacció dels pèptids de fusió amb membranes model. En aquest, els agregats dels pèptids de fusió s'uneixen a les membranes i seguidament experimenten un canvi conformacional pel qual una barreja d'estructures helicoïdals i no-ordenades es converteixen en estructura  $\beta$  agregada intermolecular, una transformació que està afavorida per la interacció amb les membranes. Aquesta interacció amb membranes en condicions fusogèniques implica una pertorbació de la interfície aigua-lípid, causant un cert grau de deshidratació, un fet que facilitaria la fusió de membranes i que ja havia estat prèviament descrit pel pèptid de fusió del virus caní Distemper (Aranda *i col.*, 2003). A més, aquest procés de fusió hauria de complir com a mínim dos requisits (Nir i Nieva, 2000): en primer lloc s'hauria de produir l'agregació dels liposomes que han de fusionar-se i en segon lloc s'hauria de produir una desestabilització de les bicapes. Les dades obtingudes dels pèptids de fusió sobre l'agregació de liposomes mostren que aquesta agregació i la desestabilització de les membranes són efectes que es donen alhora que es produeix la fusió de membranes.

Per tal de visualitzar la morfologia dels liposomes durant el procés de fusió de membranes, es va utilitzar MET amb la tècnica de la tinció negativa. Aquesta tècnica ja havia estat emprada per analitzar la morfologia dels liposomes en presència del pèptid de fusió, observant-se en els casos en els quals es produïa un augment de la barreja de lípids, un augment de la mida dels liposomes (Kliger *i col.*, 1997; Pritsker *i col.*, 1999; Sackett i Shai, 2002). En el present treball, però, les mostres han estat preses directament de la cubeta de fluorescència, de manera que es pot comparar la morfologia dels liposomes amb la barreja de lípids corresponent. Les dades permeten visualitzar per primera vegada la fusió de liposomes induïda pel pèptid de fusió de 33 residus i suggerir, juntament amb la resta de dades de l'estudi, un model per a la fusió induïda per aquest pèptid en el sistema model i esquematitzada a la *Figura V.2*.

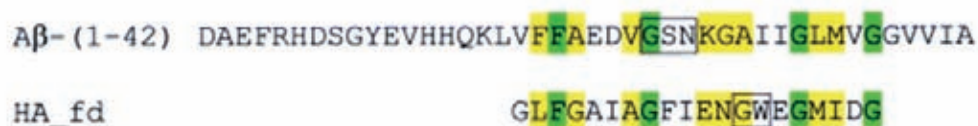


**Figura V.2.** Model de la fusió de membranes induïda pel pèptid de fusió FP33. El pèptid de fusió dissolt en DMSO presenta una estructura monomèrica i no-ordenada. Al passar a un medi aquós aquest pèptid es transforma en una barreja d'estructura helicoidal, estructura no-ordenada i estructura  $\beta$  agregada intermolecular. Seguidament, aquest tipus d'agregats interaccionen amb les membranes, sofreixen un canvi conformacional i es forma més estructura  $\beta$  agregada intermolecular, la qual finalment desencadena el procés de la barreja de lípids. En aquest cas també es presenten les constants cinètiques aparents dels diferents processos i, gràcies a les dades de MET, els possibles intermediaris de la fusió.

En aquest model, i concordant amb el model que s'ha presentat a la *Figura V.1* per al pèptid FP23-H, el pèptid FP33 dissolt en DMSO, estaria no-ordenat i monomèric; en tampó aquós formaria ràpidament una barreja d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular i estructura helicoïdal i estructura no-ordenada. Un cop aquests agregats interaccionen amb les membranes, el pèptid experimenta un canvi conformacional en el qual la major part d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada es transforma en més estructura  $\beta$  agregada intermolecular. Aquest canvi seria el responsable del desencadenament de la barreja de lípids, la qual aniria acompanyada d'un alliberament de continguts i d'una agregació de liposomes. En qualsevol cas, aquests agregats no formarien estructures fibril·lars del tipus amiloide, sinó que serien agregats intermoleculars amorfs (veure paràgraf següent).

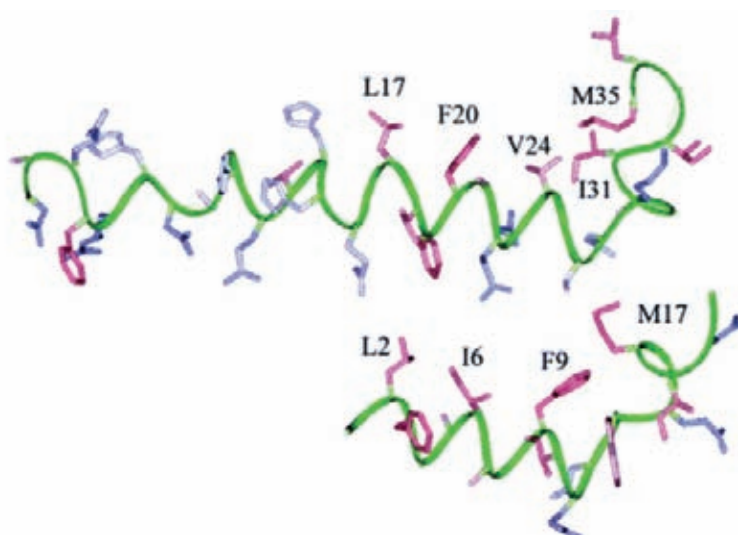
#### V. 1. 6. Caràcter Amorf No Fibril·lar dels Agregats Intermoleculars del FP33

Es va analitzar si el pèptid de fusió FP33 podia formar fibres amiloides, ja que en els espectres d'IR s'observa la formació d'estructura  $\beta$  agregada igual que el pèptid A $\beta$ (1-42). A més, havia estat descrit que pèptid de fusió de l'hemaglutinina presentava una certa homologia amb el pèptid A $\beta$ (1-42) (*Figura V.3*) (Crescenzi *i col.*, 2002).



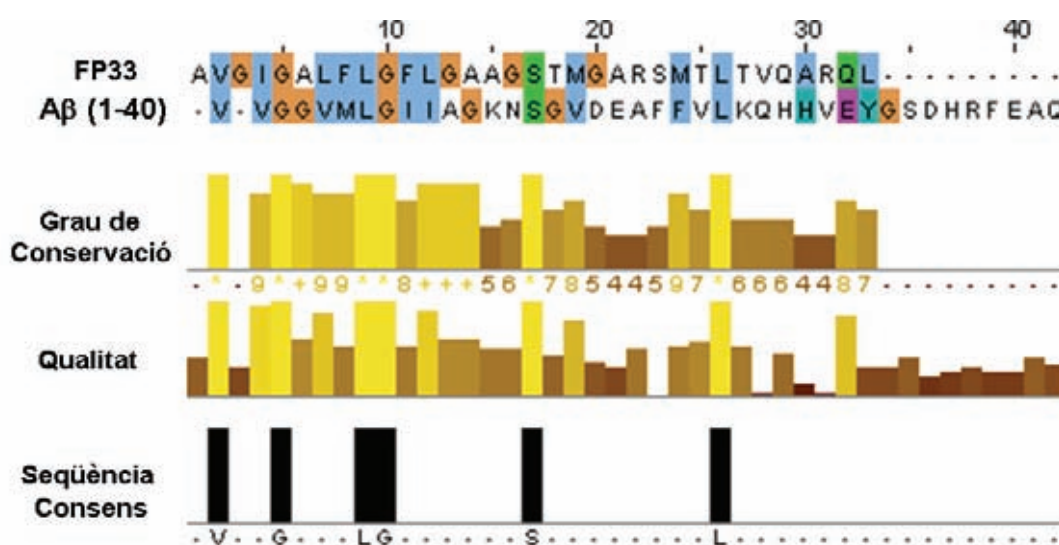
**Figura V.3.** Seqüències primàries dels pèptids de fusió de l'hemaglutinina del virus de la grip i del pèptid amiloide A $\beta$ (1-42) alineades mitjançant el programa Clustal. Els residus idèntics es mostren en verd i en groc els homòlegs [extret de (Crescenzi *i col.*, 2002)].





**Figura V.4.** Comparació de les estructures amb mínima energia del pèptid de fusió de l'HA del virus de la grip amb la regió 1-35 del pèptid amiloide Aβ(1-42). Les cadenes laterals dels diferents residus es mostren segons la seva hidrofobicitat (molt hidrofòbiques en rosa i en blau les poc hidrofòbiques) [extret de (Crescenzi *i col.*, 2002)].

Tenint en compte l'observació anterior i que el pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH presenta a la vegada una certa homologia amb el pèptid de fusió de l'hemaglutinina, vàrem realitzar un alineament entre les seqüències del pèptid de fusió del VIH i el pèptid amiloide Aβ(1-40) utilitzant el programa ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) essent els resultats els que es mostren a la següent figura (Figura V.5):



**Figura V.5.** Alineament del pèptid de fusió del VIH FP33 amb el pèptid amiloide Aβ(1-40).

---

Degut a que els dos pèptids, FP33 i A $\beta$ (1-40), presenten certa homologia de seqüència i al fet que el pèptid de fusió del VIH forma estructura  $\beta$  agregada intermolecular en tampó aquós i que aquesta augmenta en presència de membranes, ens vàrem plantejar l'estudi de la formació de fibres amiloides del FP33, tant en presència com en absència de membranes, utilitzant la sonda fluorescent ThT. En cap de les dues situacions es va observar un augment en la fluorescència de la sonda, la qual cosa indica que no hi ha formació de fibres amiloides.

## **V. 2. Efecte del Colesterol en la Interacció del Pèptid de Fusió de la Proteïna gp41 del VIH amb Membranes Model: Importància del Potencial Dipolar de Membrana**

Com s'ha comentat a la introducció, el colesterol és un dels principals components de l'envolta lipídica viral, en la qual es troba a una relació fosfolípid/colesterol de 0.9 (Aloia *i col.*, 1988; Aloia *i col.*, 1993). A més, ha estat descrit que agents fluïdificants de la membrana, així com el tractament amb ciclodextrina (un agent segrestador del colesterol de la membrana), inhibeixen la infecció de cèl·lules per part del VIH (Reimund, 1986; Sarin *i col.*, 1985; Schaffner *i col.*, 1986).

Tot i que l'efecte del colesterol sobre la fluïdesa de les membranes ha estat àmpliament estudiat, aquesta molècula també pot afectar una altra propietat físico-química de la membrana: el potencial dipolar de membrana. En els darrers anys han aparegut diversos treballs sobre la influència d'aquest potencial electrostàtic en determinats processos biològics: interacció de pèptids antimicrobians, pèptids de fusió vírics, pèptids senyal o pèptids amfipàtics amb membranes o funcionament de canals iònics de membrana, com el canal de gramicidina (Alakoskela i Kinnunen, 2001; Alakoskela *i col.*, 2004; Antonenko *i col.*, 1999; Asawakarn *i col.*, 2001; Cladera i O'Shea, 1998; Cladera *i col.*, 2003; Hristova *i col.*, 2001; Rokitskaya *i col.*, 1997; Rokitskaya *i col.*, 2002; Schagina *i col.*, 2003; Voglino *i col.*, 1998; Zhang *i col.*, 2001). En el cas concret dels pèptids de fusió, únicament ha estat descrit que variacions del potencial dipolar de membrana afecten a l'extensió de la barreja de lípids induïda pel pèptid de fusió del virus de la immunodeficiència de simi (VIS) (Cladera *i col.*, 1999).

Així doncs, també ens vàrem proposar l'estudi de la influència del colesterol en cadascun dels processos que tenen lloc durant la interacció del pèptid de fusió descrits en la primera part d'aquest treball: unió a membranes, canvi conformacional (transformació d'estructura helicoidal i no-ordenada a estructura  $\beta$  agregada intermolecular) i finalment barreja de lípids.

Per tal de diferenciar els efectes sobre la interacció del pèptid de fusió amb membranes provocats per variacions del potencial dipolar o de la fluïdesa de la membrana i el seu grau d'hidratació, les membranes s'han complementat amb colesterol o amb 6-KC. Aquestes dues molècules tenen un mateix efecte sobre el

potencial dipolar, les dues l'augmenten (Asawakarn i col., 2001; Cladera i O'Shea, 1998). En canvi, tenen efectes oposats sobre el grau d'hidratació i la fluïdesa de membrana: mentre que el primer augmenta la hidratació i disminueix la fluïdesa de la membrana, el 6-KC, té efectes oposats: disminueix la hidratació de la interfície aigua-lípid i augmenta la fluïdesa de la membrana (Auner i col., 2005). En aquest treball van observar com la presència de 6-KC en liposomes formats per DPPC, disminueix la seva  $T_m$ .

Els resultats presentats han mostrat que el potencial dipolar de membrana té un efecte sobre l'afinitat del pèptid de fusió FP23-H per a les membranes. Això queda demostrat pel fet que al augmentar el potencial de membrana (ja sigui per l'addició de 6-KC o colesterol), es produeix una disminució de la constant de dissociació.

En canvi, el potencial dipolar sembla ser que no afecta al canvi conformacional que sofreix el pèptid un cop interacciona amb les membranes (transformació d'una estructura helicoïdal i no-ordenada a una estructura  $\beta$  agregada intermolecular), ja que en membranes amb diferent percentatge d'esterol, però que modifiquen en igual grau la magnitud del potencial dipolar de membrana, el canvi conformacional no es dóna de la mateixa manera. Així doncs, el grau de formació d'estructura  $\beta$  intermolecular del pèptid és molt evident en membranes amb 15 mol% de 6-KC mentre que gairebé no hi ha formació d'aquest tipus d'estructura quan la membrana conté un 50 mol% de colesterol. Aquest fet podria estar relacionat amb l'efecte oposat que tenen les dues molècules sobre la fluïdesa de la membrana i sobre el grau d'hidratació de les mateixes.

Finalment, la velocitat de la barreja de lípids es veu afectada per la presència tant de 6-KC com per la presència de colesterol, però en aquest últim cas, només fins al 40 mol% de colesterol. Un cop superat aquest percentatge, sembla ser que la velocitat de la barreja de lípids podria dependre d'altres paràmetres físico-químics de la membrana, com la fluïdesa o el grau d'hidratació ja que la velocitat de la barreja de lípids torna a disminuir. D'altra banda, ha estat descrit que el colesterol podria formar microdominis de membrana fins al 50 mol% de colesterol, i que aquesta separació en dominis a la membrana desapareixeria al superar aquest percentatge de colesterol, de manera que la membrana tornaria a ser homogènia. Aquest fet podria explicar perquè la velocitat de la barreja de lípids en membranes complementades amb 50 mol% de colesterol és igual que sense colesterol, però més lenta que al 33 mol% de colesterol (Silvius, 2003a; Silvius, 2003b).

Així doncs, es pot concloure que part de la importància de la presència de colesterol a l'envolta del VIH, podria ser la seva influència sobre el potencial dipolar de membrana.

En aquest capítol queda demostrat que l'increment de la magnitud del potencial dipolar de membrana, augmenta l'afinitat del pèptid de fusió per les membranes. En canvi, altres processos que tenen lloc durant la fusió (com poden ser els canvis conformacionals o la velocitat de la barreja de lípids) poden estar afectats per altres propietats de les membranes, com el seu grau d'hidratació o la fluïdesa de la membrana, o fins i tot, per la presència de colesterol en un percentatge òptim perquè la fusió es produeixi de la manera més eficient possible.

### **V. 3. Comparació amb la Fusió de Membranes Induïda per Altres Pèptids de Fusió Vírics**

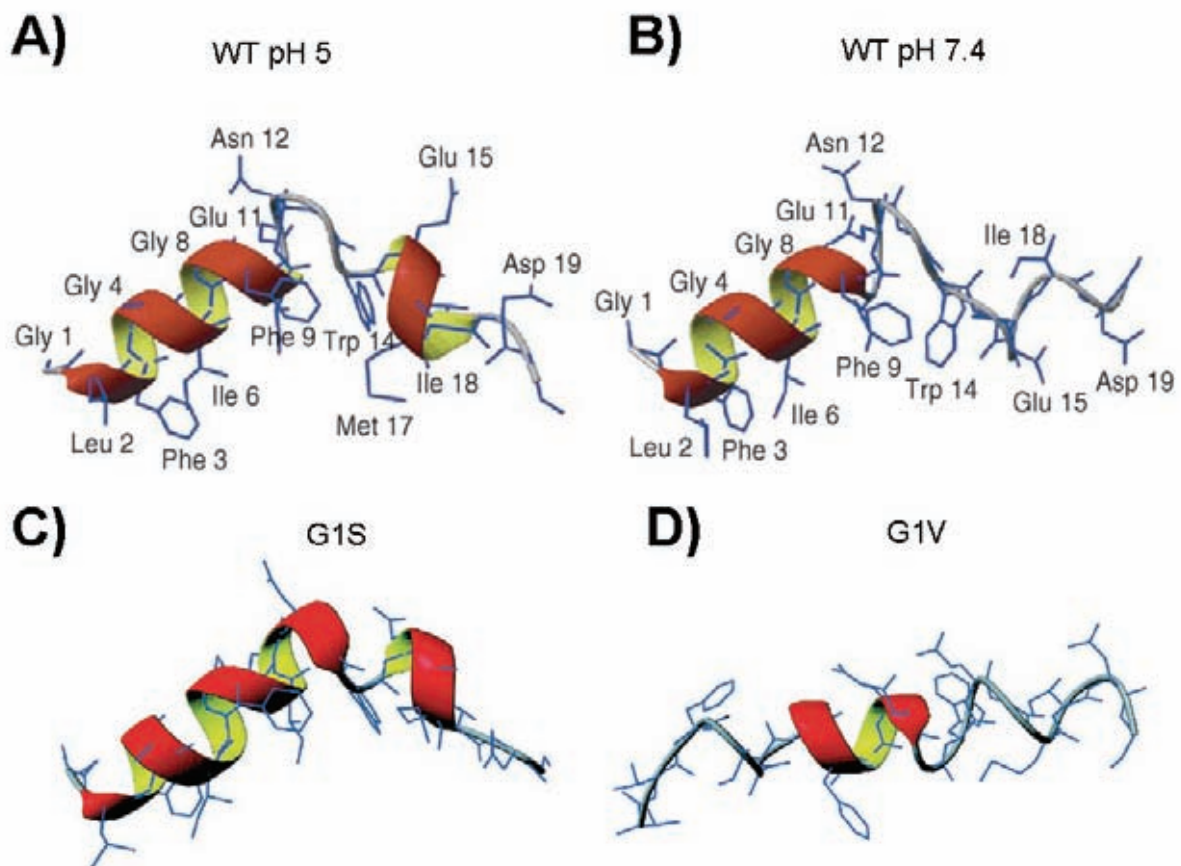
Com s'ha comentat a la introducció, la interpretació molecular de l'entrada del VIH dins de la cèl·lula hoste es basa en el model proposat per al virus de la grip. És per aquest motiu que existeix un elevat nombre de treballs sobre l'estudi de la interacció del pèptid de fusió de l'hemaglutinina (HA) amb membranes model. Segons Tamm (2003), la forma fusogènica del pèptid de fusió del virus de la grip seria una hèlix  $\alpha$  inserida obliquament en forma de V invertida (**Spring-Loaded Boomerang Mechanism**). Els autors proposen aquest model a partir d'una sèrie de treballs. Primer van determinar l'estructura i l'orientació del pèptid de fusió de l'HA del virus de la grip mitjançant ATR-FTIR, indicant que aquest presenta un 50% d'estructura hèlix  $\alpha$  quan es troba en un ambient apolar o barrejat amb membranes, i que aquesta hèlix  $\alpha$  s'insereix a les membranes obliquament amb un angle de  $50^\circ$  respecte a la superfície de la membrana (Gray *i col.*, 1996). A continuació i degut a l'elevada hidrofobicitat del pèptid de fusió en ambient aquós, van dissenyar una estratègia per fer el pèptid de fusió més soluble. Per aconseguir-ho, van afegir al pèptid de fusió de l'HA un cert nombre de residus polars, concretament quatre residus de Lys units al pèptid de fusió per un lligador flexible format per dos residus Gly i un de Cys (Tamm i Han, 2000) (*Figura V.6*). Aquest pèptid de fusió modificat adopta una estructura en hèlix  $\alpha$  igual que el pèptid salvatge i és fusogènic.

P20H7: GLFGAIAGFIENGWEGMIDG -- GCGKKKK -- CONH2

**Figura V.6.** Seqüència aminoacídica del pèptid de fusió de l'HA del virus de la grip mostrant l'estratègia emprada per fer-lo més soluble en medi aquós.

En un treball posterior, els mateixos autors, van determinar l'estructura d'aquest pèptid modificat en micel·les formades pel detergent dodecilsfosfolina (DPC) mitjançant NMR, així com la seva inserció en aquestes micel·les mitjançant EPR (Han *i col.*, 2001). En aquest treball determinen que l'estructura del pèptid de fusió de l'HA és una hèlix  $\alpha$  amfipàtica inserida obliquament en forma de V invertida. Els autors presenten l'estructura del pèptid a pH 7.4 (inactiu) i a pH 5 (fusogènic), observant que la principal diferència entre ambdues estructures és la presència d'una hèlix  $3_{10}$  en l'extrem carboxi terminal del pèptid i, per tant, conclouen que

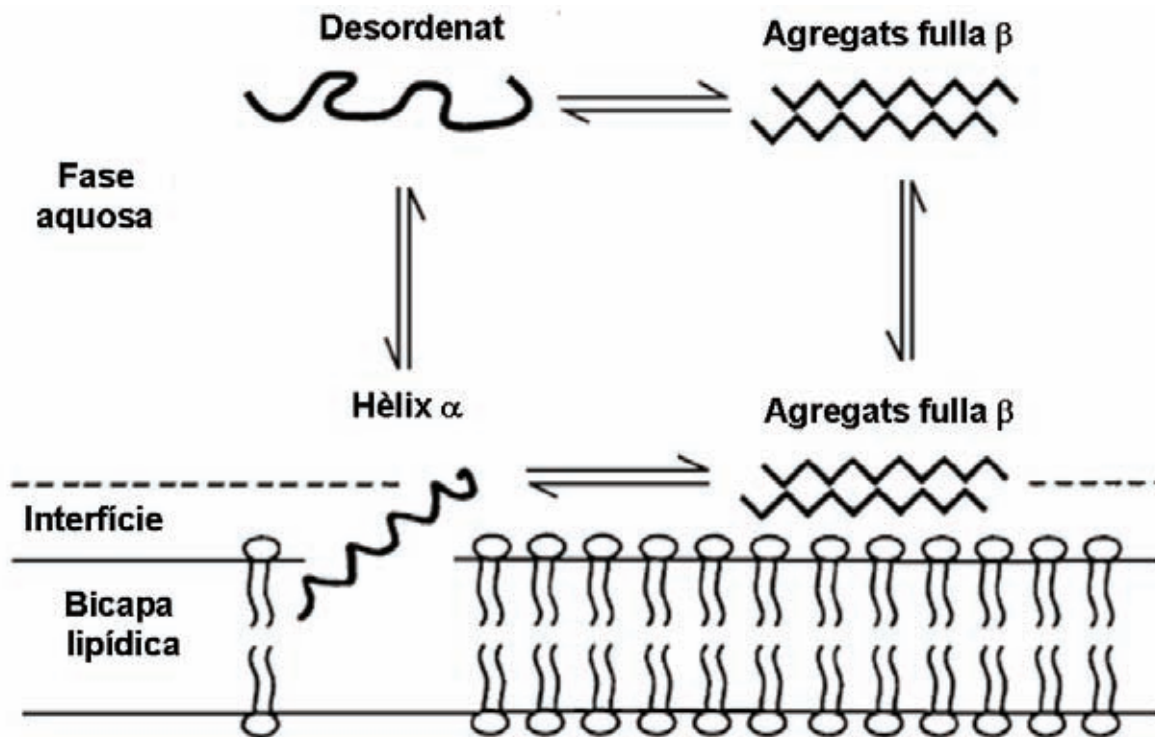
l'estructuració d'aquest extrem seria la desencadenant de la fusió. A més, també van determinar les estructures de dos pèptids mutants (el G1S i el G1V) en condicions fusogèniques (pH 5) utilitzant la mateixa estratègia. El pèptid G1S provoca hemifusió i el segon inhibeix totalment la fusió. L'estructura del primer va ser molt similar a l'estructura obtinguda per al pèptid salvatge mentre que el segon no presentava una estructura definida (*Figura V.7*).



**Figura V.7.** Estructures del pèptid de fusió del virus de la grip obtingudes mitjançant NMR en micelles formades de DPC. **(A)** Pèptid salvatge a pH 5. **(B)** Pèptid salvatge a pH 7.4. **(C)** Pèptid mutant G1S a pH 5. **(D)** Pèptid mutant G1V a pH 5 [modificat de (Tamm *i col.*, 2003)].

Finalment els autors proposen un mecanisme segons el qual el pèptid de fusió de l'HA del virus de la grip podria adoptar diferents conformacions. Els autors proposen que l'estructura hèlix  $\alpha$  obliqua en forma de V invertida seria la que induiria la fusió, tot i que l'estructura  $\beta$  intermolecular observada en determinats treballs a elevades concentracions podria intervenir en algun moment del procés de la fusió, com podria ser a l'hora de reclutar diferents molècules d'HA en una mateixa zona. Els autors també argumenten que el pèptid en medi aquós s'agrega i que aquests

agregats podrien interaccionar directament amb les membranes, un procés que segons la seva hipòtesi, inhibiria la fusió, ja que han observat que els mutants que produeixen més agregació, són menys fusogènics. Així doncs els autors, proposen l'estructura helicoïdal com la causant de la fusió (*Figura V.8*).



**Figura V.8.** Esquema dels processos que podria experimentar el peptid de fusió del virus de la grip en membranes [modificat de (Tamm i Han, 2000)].

Tot i aquest exhaustiu treball, altra vegada, les relacions molars lípid/peptid en les quals s'han realitzat els experiments de fusió i de determinació de l'estructura secundària són molt diferents; tal i com passava amb els estudis realitzats amb el peptid de fusió de la proteïna gp 41 del VIH i que ja ha estat comentat en un apartat anterior (**Discussió V. 1.**).

Tot i així, en el cas dels mutants que no formen hèlix no s'ha contemplat la possibilitat de que, tal com sembla ser en el cas del peptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH, la formació d'hèlix  $\alpha$  precedeixi la formació de l'estructura  $\beta$  fusogènica. Podria ser que en no formar-se l'hèlix  $\alpha$  en el cas dels mutants no es pogués formar l'estructura  $\beta$  que desencadena el procés de fusió.



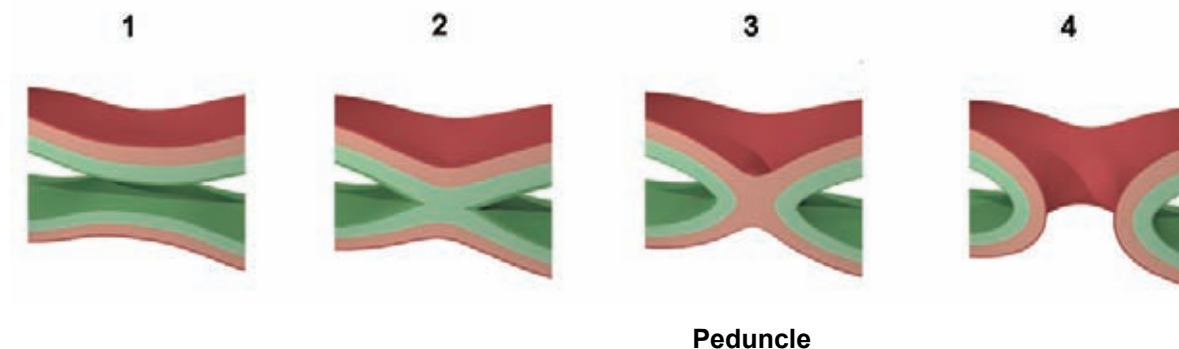
#### V. 4. Fusió de Membranes: Models Moleculars

La fusió de membranes és un esdeveniment essencial en multitud de processos biològics. Estudis teòrics i experimentals han suggerit l'existència de diferents intermediaris durant el procés de fusió.

La fusió de les membranes, des d'un punt de vista físic, estaria dirigit per l'efecte hidrofòbic, el qual es basa en minimitzar l'exposició de superfícies hidrofòbiques al medi polar. L'aplicació d'aquest principi a la fusió de membranes implica l'existència d'un intermediari de la fusió en forma de peduncle (hipòtesi de l'*stalk*). Segons aquesta hipòtesi, la fusió de dues membranes formades exclusivament per lípids requeriria com a mínim 4 etapes (*Figura V.9*):

1. Acostament de les dues membranes que s'han de fusionar.
2. Pertorbació local de l'estructura dels lípids i fusió de les dues monocapes externes.
3. Formació del peduncle (*stalk*).
4. Expansió del peduncle i formació d'un porus.

Cadascuna d'aquestes etapes necessita superar una barrera energètica.

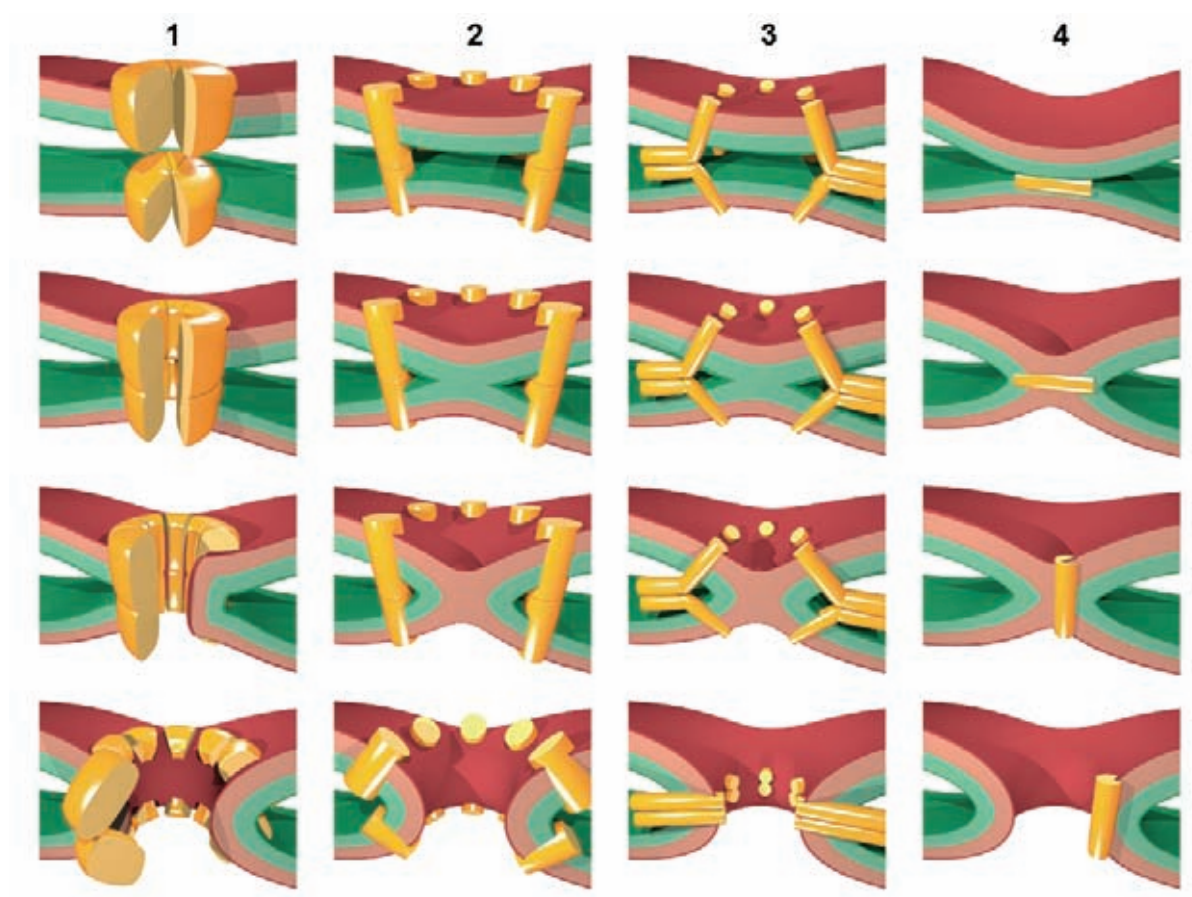


**Figura V.9.** Fusió de membranes segons el model del peduncle (hipòtesi de l'*stalk*) i descrites en el text. Les monocapes de cascuna de les bicapes estan representades en verd i vermell [modificat de (Jahn i Grubmuller, 2002)].

D'altra banda la fusió de membranes biològiques és un procés més complex que el procés presentat per a dues bicapes, i cal a més, la intervenció de proteïnes especialitzades en la fusió. La barrera energètica que cal superar perquè es produeixi la fusió de membranes en un ambient aquós no és gaire elevada (Jahn i Grubmuller, 2002), de manera que petites pertorbacions i fluctuacions locals són suficients per superar aquesta barrera.

D'altra banda, encara no està clar si en totes les reaccions de fusió es produeixen els mateixos intermediaris (com per exemple els suggerits en el model de fusió per *stalk* en membranes lliures de proteïnes) o si, per contra, cada sistema de fusió té els seus propis intermediaris. Així doncs, s'han proposat diferents models de la fusió induïda per proteïnes que difereixen en els seus estats de transició, en les interaccions de les proteïnes de fusió amb les membranes i en la importància dels canvis conformacionals per al procés de la fusió. Aquests models es presenten a la següent figura (*Figura V.10*):

1. Model del porus de fusió proteic.
2. Model de tanca.
3. Model de bastida (*scaffold*).
4. Model de pertorbacions locals.



**Figura V.10.** Esquema dels quatre models de fusió de membranes induïda per proteïnes. **(A)** Model del porus de fusió proteic. **(B)** Model de tanca. **(C)** Model de bastida. **(D)** Model de pertorbacions locals [modificat de (Jahn i Grubmüller, 2002)].

El model que es proposa per a les proteïnes de fusió, podria correspondre al model de bastida, representació que recorda a la formació de la forquilla trimèrica (**Introducció I. 4. 2. v**) Aquest model està basat principalment en la fusió de membranes induïda pels lípids, en la qual la funció de les proteïnes seria bàsicament acostar les dues membranes ajudant a superar la barrera d'activació o potser creant una deficiència de molècules d'aigua a la superfície de la membrana, induint la fusió.

En el cas concret del VIH i d'acord amb les dades experimentals obtingudes en el present treball, proposem un model en el que el pèptid de fusió de la proteïna gp41, al interaccionar amb la membrana, experimenta una transformació d'estructura helicoïdal i estructura no-ordenada a estructura  $\beta$  agregada intermolecular, la qual seria responsable de la fusió.

En el cas de les proteïnes de fusió víriques, ja sigui l'HA del virus de la grip, o la gp41 del VIH, hi ha multitud d'evidències experimentals (Eckert i Kim, 2001) (**Introducció I. 4. 2. i**) que indiquen l'existència d'un canvi conformacional (replegament de la proteïna sobre sí mateixa per donar lloc a la forquilla trimèrica) que provocaria l'acostament de les dues membranes. Aquest model correspondria al model molecular de bastida descrit anteriorment. La representació gràfica d'aquest model va acompanyada normalment de la inserció de part de la proteïna gp41 (concretament la part amino terminal corresponent al pèptid de fusió) a la membrana de la cèl·lula diana. Aquest fet està òbviament inspirat en la idea (exposada en l'apartat anterior) de que el pèptid de fusió s'inseriria a la membrana cel·lular en forma d'una hèlix  $\alpha$  obliqua. Resulta clar, però, a partir del nostre treball, que l'estructura que es forma en el sistema model abans de que es desencadeni el procés de la fusió, és una estructura  $\beta$  agregada intermolecular.

Tot i que dels estudis realitzats no se'n pot deduir fins a quin punt es produeix la inserció d'aquesta estructura en el sí de la bicapa lipídica, no és descartable alguna mena d'inserció del tipus que, per exemple, han proposat Sackett i Shai (Sackett i Shai, 2005), formant un porus a la membrana en forma de barril  $\beta$ . Ara bé, en el present treball, la unió dels pèptids de fusió a les membranes provoca una deshidratació de la superfície de la mateixa. Aquesta deshidratació pot ser essencial pel desencadenament del procés de la fusió ja que implica la desaparició d'una de les forces que s'hi oposarien: la pressió d'hidratació.

---

A partir d'això, és possible plantejar un model en el qual l'estructura  $\beta$  agregada intermolecular que forma el pèptid de fusió, no penetri en la bicapa i es disposi de manera superficial. Aquest model podria ser una combinació del model 3 (model de bastida) i 4 (model de pertorbació local) descrits a la *Figura V.10*. En aquest cas la pertorbació seria la deshidratació de la membrana.

## V. 5. Els Pèptids de Fusió i els Agregats Peptídics

Els canvis conformacionals dels pèptids de fusió del VIH descrits en el present treball poden ser considerats en relació a alguns aspectes del corpus de coneixement que es té actualment del plegament de proteïnes.

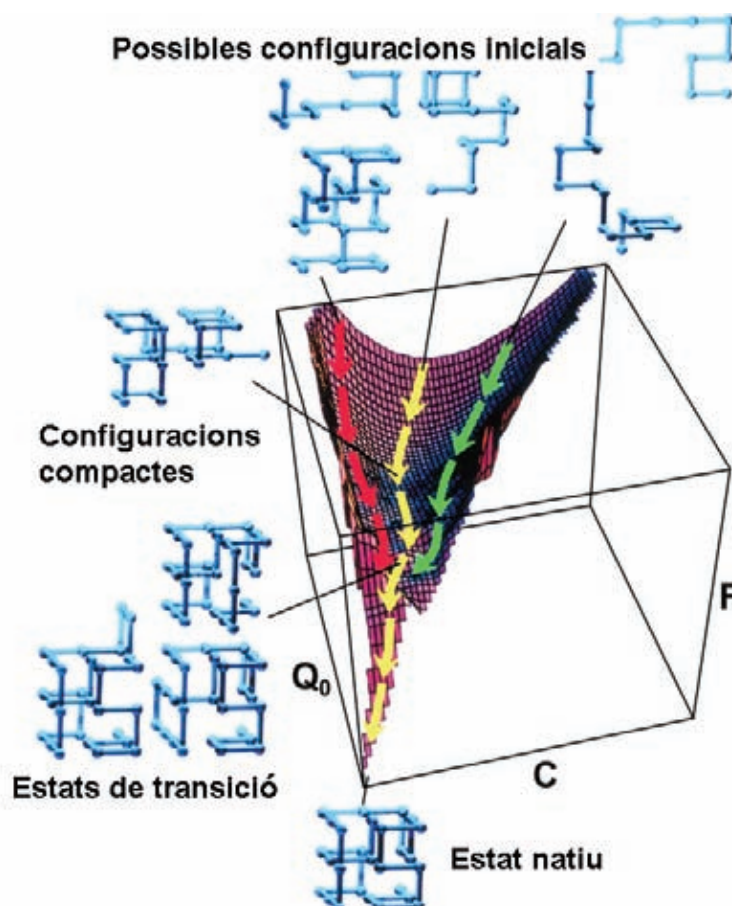
Actualment, existeixen nombroses evidències que indiquen que l'estructura nativa d'una proteïna correspon a la forma més estable en condicions fisiològiques. Tot i això, la manera per la qual una proteïna assoleix la seva conformació nativa tot just s'està començant a resoldre.

Dins del camp del plegament de proteïnes existia el que s'anomenava *La paradoxa de Levinthal* la qual explicava que si una proteïna de mida mitjana explorés totes les possibles conformacions espacials que pot adoptar, trigaria més temps en assolir la seva conformació nativa que l'edat predita de l'univers.

Les idees més actuals en el camp del plegament de proteïnes superen, però, aquest problema plantejant el plegament de la seqüència polipeptídica com una cerca estocàstica de totes les possibles conformacions que podria adoptar la molècula. Durant aquesta cerca, els contactes correctes (aquells que es donen en l'estat natiu) que són termodinàmicament més estables que els contactes incorrectes (que no es donen en l'estat natiu), dirigeixen el plegament de la cadena polipeptídica cap a la seva estructura nativa, a través d'intermediaris del plegament cada vegada més semblants a l'estructura nativa.

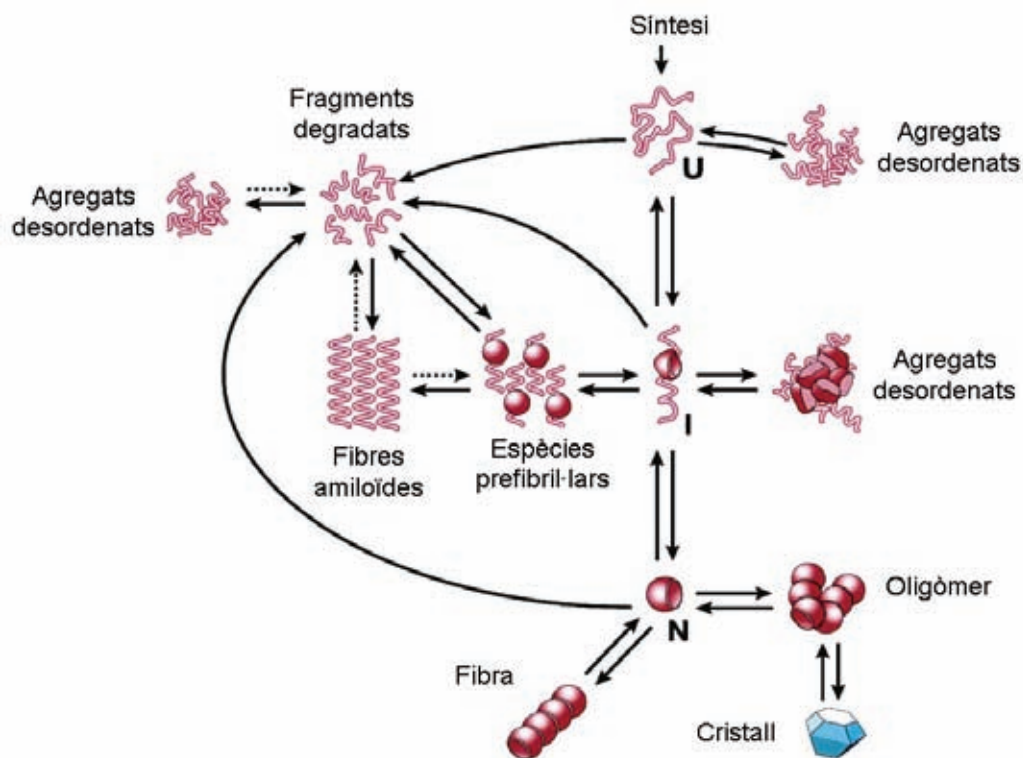
Aquest concepte es recull d'una manera gràfica en el que es coneix com a mapa d'energia (*energy landscape*), que descriu l'energia lliure d'una cadena polipeptídica en funció de les seves propietats conformacionals.

La *Figura V.11* representa un mapa energètic típic per a una cadena polipeptídica. Segons aquesta representació, una cadena polipeptídica podria adoptar qualsevol conformació possible amb la mateixa energia. Només en situacions en que les interaccions formades fossin les correctes, és a dir, més estables, l'energia seria menor, de manera que el plegament avançaria per aquest mapa energètic en forma d'embut cap a conformacions més estables fins assolir l'estat natiu.



**Figura V.11.** Mapa energètic en forma d'embut d'una cadena polipeptídica típica. L'energia lliure del sistema,  $F$ , s'ha representat en funció del nombre total de contactes entre els diferents residus,  $C$ , i del nombre de contactes que es produeixen a l'estructura nativa,  $Q_0$  [modificat de (Dobson, 2004)].

Seguint mecanismes encara poc coneguts, les fluctuacions conformacionals que experimenten els intermediaris del plegament en el procés que porta a l'estat natiu, poden, en determinades condicions, generar agregats moleculars més estables que l'estat natiu (*Figura V.12*). Aquests agregats poden ser amorfs o bé adoptar una estructura fibril·lar molt ordenada. En els últims anys, aquesta part del mapa energètic del plegament de proteïnes, està adquirint un protagonisme creixent. Aquest fet és degut principalment al paper que poden jugar aquests agregats en un nombre important de patologies, conegudes com malalties conformacionals: la malaltia d'Alzheimer, les malalties priòniques, la malaltia de Huntington, la diabetis de tipus II i d'altres (Dobson, 2003; Dobson, 2004; Dobson, 2006).



**Figura V.12.** Esquema del plegament de proteïnes des de l'estat desplegat (U) fins a l'estat natiu (N) mostrant els diferents tipus d'estructures intermedis de plegament erroni [modificat de (Dobson, 2004)].

Existeix actualment una certa controvèrsia sobre la naturalesa de les espècies agregades responsables dels efectes citotòxics. Hi ha, però, cada vegada més evidències segons les quals les espècies citotòxiques no serien les estructures fibril·lars, sinó oligòmers de baix pes molecular (Caughey i Lansbury, 2003). Resulta interessant assenyalar en aquesta discussió algunes possibles coincidències entre aquests oligòmers i els agregats moleculars descrits per al pèptid de fusió del VIH en el present treball.

Hem demostrat que l'estructura  $\beta$  intermolecular que forma el pèptid de fusió, constitueix uns agregats amorfs (no fibril·lars) i resulta clar que aquests agregats poden desestabilitzar la bicapa lipídica. Aquesta capacitat pot ser molt important a l'hora d'exercir un efecte citotòxic. De fet, en el cas dels pèptids amiloïdes, se sap que aquests interaccionen amb les membranes i que l'estructura d'aquestes afecta el procés de formació de fibres (Bokvist *i col.*, 2004). També s'ha descrit la capacitat fusogènica de certs pèptids amiloïdes (Pillot *i col.*, 1997; Pillot *i col.*, 1996). A més, també ha estat descrit que els intermedis oligomèrics que serien citotòxics contenen estructura  $\beta$  i segons experiments recents en el nostre grup de recerca

(Benseny-Cases, 2006) es tractaria d'una estructura  $\beta$  intermolecular no fibril·lar (agregats amorfs).

Totes aquestes dades ens permeten formular, per ser presa en consideració en la futura recerca en el camp dels pèptids de fusió i dels pèptids amiloides, la següent pregunta: **poden ser els agregats amorfs, constituïts per estructures  $\beta$  intermoleculars no fibril·lars, el tipus conformacional característic d'agregats proteics amb capacitat citotòxica?**





# CONCLUSIONS

## VI. CONCLUSIONS

A partir dels resultats presentats en aquest treball sobre la interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model se'n poden extreure les següents conclusions:

- 1) Els pèptids de fusió de la proteïna gp41 del VIH en DMSO adopten una estructura no-ordenada i monomèrica.
- 2) La interacció del pèptid de fusió de la proteïna gp41 del VIH amb membranes model es dona segons la seqüència d'esdeveniments moleculars que es descriuen a continuació:
  - a) agregació ràpida dels monòmers peptídics en el medi aquós. Els agregats estan constituïts per una barreja d'estructura helicoïdal, estructura no-ordenada i estructura  $\beta$  agregada intermolecular.
  - b) unió dels agregats peptídics formats en tampó aquós a les membranes model.
  - c) transformació de la major part d'estructures no-ordenades i helicoïdals en estructura  $\beta$  agregada intermolecular.
  - d) fusió de membranes.
- 3) L'afinitat dels pèptids de fusió per les membranes model es veu clarament augmentada (disminució de la constant de dissociació,  $K_d$ , del procés d'unió) si contenen el segment 24-33.
- 4) L'afinitat del pèptid de fusió per les membranes model augmenta quan augmenta la magnitud del potencial dipolar de membrana (quan es fa més positiu cap a l'interior de la membrana).
- 5) Els canvis conformationals associats a la unió dels pèptids de fusió a les membranes model, i el procés de fusió de membranes, no depenen del potencial dipolar, però sí de paràmetres com la fluïdesa de la membrana i la hidratació de la mateixa, els quals estan relacionats amb la presència de colesterol a la bicapa lipídica.

- 6) La interacció dels pèptids de fusió amb les membranes provoca una deshidratació de la superfície de la membrana que podria ser l'element desestabilitzador necessari per desencadenar la fusió.
  
- 7) Els agregats peptídics formats pel pèptid de fusió del VIH tenen una morfologia amorfa, no presentant una estructura fibril·lar i amiloide.

# **BIBLIOGRAFIA**

**VII. BIBLIOGRAFIA****A**

Adamson, C. S. i Jones, I. M. (2004) **The molecular basis of HIV capsid assembly-five years of progress.** *Rev. Med. Virol.* 14(2):107-121.

Alakoskela, J. I. i Kinnunen, P. K. (2001) **Control of a redox reaction on lipid bilayer surfaces by membrane dipole potential.** *Biophys. J.* 80(1):294-304.

Alakoskela, J. M., Soderlund, T., Holopainen, J. M. i Kinnunen, P. K. (2004) **Dipole potential and head-group spacing are determinants for the membrane partitioning of pregnanolone.** *Mol. Pharmacol.* 66(1):161-168.

Aloia, R. C., Jensen, F. C., Curtain, C. C., Mobley, P. W. i Gordon, L. M. (1988) **Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85(3):900-904.

Aloia, R. C., Tian, H. i Jensen, F. C. (1993) **Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 90(11):5181-5185.

Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I. i Kotova, E. A. (1999) **Effect of dipole modifiers on the kinetics of sensitized photoinactivation of gramicidin channels in bilayer lipid membranes.** *Membr. Cell. Biol.* 13(1):111-120.

Aranda, F. J., Teruel, J. A. i Ortiz, A. (2003) **Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study.** *Biochim. Biophys. Acta* 1618(1):51-58.

Asawakarn, T., Cladera, J. i O'Shea, P. (2001) **Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells.** *J. Biol. Chem.* 276(42):38457-38463.

Auner, B. G., O'Neill, M. A., Valenta, C. i Hadgraft, J. (2005) **Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC-liposomes as phospholipid model membranes.** *Int. J. Pharm.* 294(1-2):149-155.

## B

Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A. i Jardetzky, T. S. (1999) **Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion.** *Mol. Cell.* 3(3):309-319.

Baltimore, D. (1970) **RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.** *Nature* 226(252):1209-1211.

Barnadas, R. (1999) **Optimització de formulacions amb fosfolípids per a ús dermatològic.** Universitat Autònoma de Barcelona

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. i Montagnier, L. (1983) **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science* 220(4599):868-871.

Benseny-Cases, N. (2006) **Estudi estructural, morfològic i cinètic, del procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40).** Universitat Autònoma de Barcelona

Bentz, J. i Mittal, A. (2003) **Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site.** *Biochim. Biophys. Acta* 1614(1):24-35.

Bokvist, M., Lindstrom, F., Watts, A. i Grobner, G. (2004) **Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation.** *J. Mol. Biol.* 335(4):1039-1049.

Bosch, M. L., Earl, P. L., Fagnoli, K., Picciafuoco, S., Giombini, F., Wong-Staal, F. i Franchini, G. (1989) **Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses.** *Science* 244(4905):694-697.

Brockman, H. (1994) **Dipole potential of lipid membranes.** *Chem. Phys. Lipids.* 73: 57-59.

Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. i Stevenson, M. (1998) **Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton.** *J. Exp. Med.* 188(11):2113-2125.

Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. i Wiley, D. C. (1994) **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion.** *Nature* 371(6492):37-43.

Buzón, V., Padrós, E. i Cladera, J. (2005) **Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study.** *Biochemistry* 44(40):13354-13364.

Byler, D. M. i Susi, H. (1986) **Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra.** *Biopolymers* 25(3):469-487.

## C

Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M. i Clore, G. M. (1998) **Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41.** *EMBO J.* 17(16):4572-4584.

Campbell, I. D. i Dwek, R. A. (1984) **Biological Spectroscopy.** The Benjamin/Cummings Publishing Company.



Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E., Thali, M., Repke, H. i Sodroski, J. (1993) **Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein.** *J. Virol.* 67(5):2747-2755.

Carr, C. M. i Kim, P. S. (1993) **A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin.** *Cell* 73(4):823-832.

Caughey, B. i Lansbury, P. T. (2003) **Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders.** *Annu. Rev. Neurosci.* 26:267-298.

Cevc, G. (1990) **Membrane electrostatics.** *Biochim. Biophys. Acta* 1031(3):311-382.

Cladera, J., Martin, I. i O'Shea, P. (2001) **The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface.** *EMBO J.* 20(1-2):19-26.

Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J. M. i O'Shea, P. (1999) **Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential.** *J. Biol. Chem.* 274(42):29951-29959.

Cladera, J., O'Shea, P., Hadgraft, J. i Valenta, C. (2003) **Influence of molecular dipoles on human skin permeability. Use of 6-ketocholesterol to enhance the transdermal delivery of bacitracin.** *J. Pharm. Sci.* 92(5): 1018-1027.

Cladera, J. i O'Shea, P. (2001) **Generic techniques for fluorescence measurements of protein-ligand interactions; real-time kinetics and spatial imaging.** In: Protein-ligand interactions: structure and spectroscopy. A Practical Approach. Oxford University Press. Oxford.

Cladera, J. i O'Shea, P. (1998) **Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide.** *Biophys. J.* 74(5):2434-2442.

Clapham, P. R., Reeves, J. D., Simmons, G., DeJucq, N., Hibbitts, S. i McKnight, A. (1999) **HIV co-receptors, cell tropism and inhibition by chemokine receptor ligands.** *Mol. Membr. Biol.* 16(1):49-55.

Clarke, R. J. (1997) **Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers.** *Biochim. Biophys. Acta* 1327(2):269-278.

Clarke, R. J. (2001) **The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection.** *Adv. Colloid. Interface Sci.* 89-90:263-281.

Clements, G. J., Price-Jones, M. J., Stephens, P. E., Sutton, C., Schulz, T. F., Clapham, P. R., McKeating, J. A., McClure, M. O., Thomson, S., Marsh, M. i et al. (1991) **The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion?** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7(1):3-16.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. i et al. (1986) **Human immunodeficiency viruses.** *Science* 232(4751):697.

Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A. i Picone, D. (2002) **Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain.** *Eur.J. Biochem.* 269(22):5642-5648.

Chan, D. C., Chutkowski, C. T. i Kim, P. S. (1998) **Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target.** *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 95(26):15613-15617.

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. i Kim, P. S. (1997) **Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.** *Cell* 89(2):263-273.

Chan, D. C. i Kim, P. S. (1998) **HIV entry and its inhibition.** *Cell* 93(5):681-684.

Chen, C. H., Matthews, T. J., McDanal, C. B., Bolognesi, D. P. i Greenberg, M. L. (1995) **A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion.** *J. Virol.* 69(6):3771-3777.

Chen, J., Skehel, J. J. i Wiley, D. C. (1999) **N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(16):8967-8972.

Chen, S. S. (1994) **Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41.** *J. Virol.* 68(3):2002-2010.

Chen, S. S., Lee, C. N., Lee, W. R., McIntosh, K. i Lee, T. H. (1993) **Mutational analysis of the leucine zipper-like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein.** *J. Virol.* 67(6):3615-3619.

Chernomordik, L. V. I Kozlov, M. M. (2005) **Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps.** *Cell* 123(3):375-382.

Chou, P. Y. i Fasman, G. D. (1978) **Empirical predictions of protein conformation.** *Annu. Rev. Biochem.* 47:251-276.

Chung, L. A. i Thompson, T. E. (1996) **Design of membrane-inserting peptides: spectroscopic characterization with and without lipid bilayers.** *Biochemistry* 35(35):11343-11354.

**D**

Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O. i Bonifacino, J. S. (1996) **Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues.** *Virology* 218(1):94-102.

Dobson, C. M. (2003) **Protein folding and misfolding.** *Nature* 426(6968):884-890.

Dobson, C. M. (2004) **Principles of protein folding, misfolding and aggregation.** *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15(1):3-16.

Dobson, C. M. (2006) **Protein aggregation and its consequences for human disease.** *Protein Pept. Lett.* 13(3):219-227.

Doms, R. W., Helenius, A. i White, J. (1985) **Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change.** *J. Biol. Chem.* 260(5):2973-2981.

Dubay, J. W., Roberts, S. J., Brody, B. i Hunter, E. (1992) **Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity.** *J. Virol.* 66(8):4748-4756.

Dwyer, D. S. (1999) **Molecular simulation of the effects of alcohols on peptide structure.** *Biopolymers* 49(7):635-645.

**E**

Eckert, D. M. i Kim, P. S. (2001) **Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition.** *Annu. Rev. Biochem.* 70:777-810.

Ellens, H., Bentz, J. i Szoka, F. C. (1985) **H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes.** *Biochemistry* 24(13):3099-3106.

**F**

Frankel, A. D. i Young, J. A. (1998) **HIV-1: fifteen proteins and an RNA.** *Annu. Rev. Biochem.* 67:1-25.

Franklin, J. C. i Cafiso, D. S. (1993) **Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles.** *Biophys. J.* 65(1):289-299.

Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchsacher, G. L., Jr. i Panganiban, A. T. (1992) **A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(1):70-74.

Freed, E. O., Myers, D. J. i Risser, R. (1990) **Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(12):4650-4654.

Furuta, R. A., Wild, C. T., Weng, Y. i Weiss, C. D. (1998) **Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41.** *Nat. Struct. Biol.* 5(4):276-279.

**G**

Gallo, R., Wong-Staal, F., Montagnier, L., Haseltine, W. A. i Yoshida, M. (1988) **HIV/HTLV gene nomenclature.** *Nature* 333(6173):504.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. i et al. (1984) **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.** *Science* 224(4648):500-503.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. i Hahn, B. H. (1999) **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*.** *Nature* 397(6718):436-441.

Gerber, D., Pritsker, M., Gunther-Ausburn, S., Johnson, B., Blumenthal, R. i Shai, Y. (2004) **Inhibition of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion by a D,L-amino acid-containing fusion peptide: Possible recognition of the fusion complex.** *J. Biol. Chem.* 279(46): 48224-48230.

Ghosh, J. K., Peisajovich, S. G. i Shai, Y. (2000) **Sendai virus internal fusion peptide: structural and functional characterization and a plausible mode of viral entry inhibition.** *Biochemistry* 39(38):11581-11592.

Gilson, M. K. i Honig, B. H. (1988) **Energetics of charge-charge interactions in proteins.** *Proteins* 3(1):32-52.

Golding, C., Senior, S., Wilson, M. T. i O'Shea, P. (1996) **Time resolution of binding and membrane insertion of a mitochondrial signal peptide: correlation with structural changes and evidence for cooperativity.** *Biochemistry* 35(33):10931-10937.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. i Ruyschaert, J. M. (1994a) **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds.** *Subcell. Biochem.* 23:329-362.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. i Ruyschaert, J. M. (1994b) **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange.** *Subcell. Biochem.* 23:363-403.

Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. i Ruyschaert, J. M. (1994c) **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures.** *Subcell. Biochem.* 23:405-450.

Gordon, L. M., Curtain, C. C., Zhong, Y. C., Kirkpatrick, A., Mobley, P. W. i Waring, A. J. (1992) **The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein 41 interacts with human erythrocyte membranes: peptide conformation, orientation and aggregation.** *Biochim. Biophys. Acta* 1139(4):257-274.

Gordon, L. M., Mobley, P. W., Lee, W., Eskandari, S., Kaznessis, Y. N., Sherman, M. A. i Waring, A. J. (2004) **Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using  $^{13}\text{C}$ -enhanced Fourier transform infrared spectroscopy.** *Protein Sci.* 13(4):1012-1030.

Gordon, L. M., Mobley, P. W., Pilpa, R., Sherman, M. A. i Waring, A. J. (2002) **Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using  $^{13}\text{C}$ -enhanced Fourier transform infrared spectroscopy.** *Biochim. Biophys. Acta* 1559(2):96-120.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A. I Saxon, A. (1981) **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.** *N. Engl. J. Med.* 305(24):1425-1431.

Gray, C., Tatulian, S. A., Wharton, S. A. i Tamm, L. K. (1996) **Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation, and interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers.** *Biophys. J.* 70(5):2275-2286.

Gross, E., Bedlack, R. S., Jr. i Loew, L. M. (1994) **Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential.** *Biophys. J.* 67(1):208-216.

## H

Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S. i Tamm, L. K. (2001) **Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin.** *Nat. Struct. Biol.* 8(8):715-720.

Harrich, D. i Hooker, B. (2002) **Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation.** *Rev. Med. Virol.* 12(1):31-45.

Haugland, R. P. (2002) **Handbook of fluorescent probes and research products.** R. P. Haugland, editor. Molecular Probes, Eugene (OR).

Heyduk, T. (2002) **Measuring protein conformational changes by FRET/LRET.** *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(4):292-296.

Hristova, K., Dempsey, C. E. i White, S. H. (2001) **Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface.** *Biophys. J.* 80(2):801-811.

Huang, Q., Sivaramakrishna, R. P., Ludwig, K., Korte, T., Bottcher, C. i Herrmann, A. (2003) **Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin.** *Biochim. Biophys. Acta* 1614(1):3-13.

Hymes, K. B., Cheung, T., Greene, J. B., Prose, N. S., Marcus, A., Ballard, H., William, D. C. i Laubenstein, L. J. (1981) **Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases.** *Lancet* 2(8247):598-600.

## J

Jackson, M. i Mantsch, H. H. (1991) **Beware of proteins in DMSO.** *Biochim. Biophys. Acta* 1078(2):231-235.

Jahn, R. i Grubmuller, H. (2002) **Membrane fusion.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14(4):488-495.

Jiang, S., Lin, K., Strick, N. i Neurath, A. R. (1993) **HIV-1 inhibition by a peptide.** *Nature* 365(6442):113.



Jones, P. L., Korte, T. i Blumenthal, R. (1998) **Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors.** *J. Biol. Chem.* 273(1):404-409.

## K

Kamath, S. i Wong, T. C. (2002) **Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation.** *Biophys. J.* 83(1):135-143.

Kliger, Y., Aharoni, A., Rapaport, D., Jones, P., Blumenthal, R. i Shai, Y. (1997) **Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell Fusion. Structure-function study.** *J. Biol. Chem.* 272(21):13496-13505.

Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B. i Straus, S. E. (2001) **Fields virology.** Lippincott Williams & Wilkins.

Korte, T. i Herrmann, A. (1994) **pH-dependent binding of the fluorophore bis-ANS to influenza virus reflects the conformational change of hemagglutinin.** *Eur. Biophys. J.* 23(2):105-113.

Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J. i Hendrickson, W. A. (1998) **Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.** *Nature* 393(6686):648-659.

## L

Lagerholm, B. C., Weinreb, G. E., Jacobson, K. i Thompson, N. L. (2005) **Detecting microdomains in intact cell membranes.** *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56:309-336.

Lakowicz, J. R. (2001) **Principles of fluorescence spectroscopy.** Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Larios, C., Casas, J., Alsina, M. A., Mestres, C., Gomara, M. J. i Haro, I. (2005a) **Characterization of a putative fusogenic sequence in the E2 hepatitis G virus protein.** *Arch. Biochem. Biophys.* 442(2):149-159.

Larios, C., Christiaens, B., Gomara, M. J., Alsina, M. A. i Haro, I. (2005b) **Interaction of synthetic peptides corresponding to hepatitis G virus (HGV/GBV-C) E2 structural protein with phospholipid vesicles.** *FEBS J.* 272(10):2456-2466.

Lemey, P., Pybus, O. G., Wang, B., Saksena, N. K., Salemi, M. i Vandamme, A. M. (2003) **Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100(11):6588-6592.

LeVine, H., 3rd. (1993) **Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution.** *Protein Sci.* 2(3):404-410.

Li, S. C. i Deber, C. M. (1994) **A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments.** *Nat. Struct. Biol.* 1(8):558.

Li, X. M., Momsen, M. M., Brockman, H. L. i Brown, R. E. (2003) **Sterol structure and sphingomyelin acyl chain length modulate lateral packing elasticity and detergent solubility in model membranes.** *Biophys. J.* 85(6):3788-3801.

Liao, Z., Cimasky, L. M., Hampton, R., Nguyen, D. H. i Hildreth, J. E. (2001) **Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17(11):1009-1019.

Loew, L. M., Scully, S., Simpson, L. i Waggoner, A. S. (1979) **Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential.** *Nature* 281(5731):497-499.

Lu, M., Blacklow, S. C. i Kim, P. S. (1995) **A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein.** *Nat. Struct. Biol.* 2(12):1075-1082.

Lu, X., Yu, H., Liu, S. H., Brodsky, F. M. i Peterlin, B. M. (1998) **Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4.** *Immunity* 8(5):647-656.

## M

Maeda, T., Kawasaki, K. i Ohnishi, S. (1981) **Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78(7):4133-4137.

Maeda, T. i Ohnishi, S. (1980) **Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes.** *FEBS Lett.* 122(2):283-287.

Malashkevich, V. N., Chan, D. C., Chutkowski, C. T. i Kim, P. S. (1998) **Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(16):9134-9139.

Malashkevich, V. N., Schneider, B. J., McNally, M. L., Milhollen, M. A., Pang, J. X. i Kim, P. S. (1999) **Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96(6):2662-2667.

Manes, S., del Real, G., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gómez-Mouton, C., Sánchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E. i Martínez, A. C. (2000) **Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection.** *EMBO Rep.* 1(2):190-196.

Mantsch, H. H. i McElhaney, R. N. (1991) **Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy.** *Chem. Phys. Lipids* 57(2-3):213-226.

Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R. i Ruyschaert, J. M. (1993a) **Orientation and structure of the NH<sub>2</sub>-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes.** *Biochim. Biophys. Acta* 1145(1):124-133.

Martin, I., Dubois, M. C., Saermark, T., Epand, R. M. i Ruyschaert, J. M. (1993b) **Lysophosphatidylcholine mediates the mode of insertion of the NH<sub>2</sub>-terminal SIV fusion peptide into the lipid bilayer.** *FEBS Lett.* 333(3):325-330.

Martin, I. i Ruyschaert, J. M. (1995) **Lysophosphatidylcholine inhibits vesicles fusion induced by the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of SIV/HIV fusogenic proteins.** *Biochim. Biophys. Acta* 1240(1):95-100.

Martin, I., Schaal, H., Scheid, A. i Ruyschaert, J. M. (1996) **Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer.** *J. Virol.* 70(1):298-304.

Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W. i Cunningham-Rundles, S. (1981) **An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction.** *N. Engl. J. Med.* 305(24):1431-1438.

Mayer, L. D., Hope, M. J. i Cullis, P. R. (1986) **Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure.** *Biochim. Biophys. Acta* 858(1):161-168.

McLaughlin, S. (1989) **The electrostatic properties of membranes.** *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:113-136.

Mobley, P. W., Waring, A. J., Sherman, M. A. i Gordon, L. M. (1999) **Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs.** *Biochim. Biophys. Acta* 1418(1):1-18.

Muesing, M. A., Smith, D. H., Cabradilla, C. D., Benton, C. V., Lasky, L. A. i Capon, D. J. (1985) **Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus.** *Nature* 313(6002):450-458.

Muñoz-Barroso, I., Durell, S., Sakaguchi, K., Appella, E. i Blumenthal, R. (1998) **Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41.** *J. Cell. Biol.* 140(2):315-323.

## N

Nicholls, D. i Ferguson, S. (1992) **Bioenergetics.** J. Wiley & Son, Inc. Regne Unit.

Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goñi, F. M. i Wilschut, J. (1994) **Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage.** *Biochemistry* 33(11):3201-3209.

Nir, S. i Nieva, J. L. (2000) **Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion.** *Prog. Lipid Res.* 39(2):181-206.

## P

Peisajovich, S. G., Blank, L., Epand, R. F., Epand, R. M. i Shai, Y. (2003) **On the interaction between gp41 and membranes: the immunodominant loop stabilizes gp41 helical hairpin conformation.** *J. Mol. Biol.* 326(5):1489-1501.

Peisajovich, S. G., Epand, R. F., Pritsker, M., Shai, Y. i Epand, R. M. (2000a) **The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion.** *Biochemistry* 39(7):1826-1833.

Peisajovich, S. G., Samuel, O. i Shai, Y. (2000b) **Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion.** *J. Mol. Biol.* 296(5):1353-1365.

Peisajovich, S. G. i Shai, Y. (2002) **New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion.** *Trends Biochem. Sci.* 27(4):183-190.

Pereira, F. B., Goñi, F. M., Muga, A. i Nieva, J. L. (1997a) **Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects.** *Biophys. J.* 73(4):1977-1986.

Pereira, F. B., Goñi, F. M. i Nieva, J. L. (1995) **Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution.** *FEBS Lett.* 362(2):243-246.

Pereira, F. B., Goñi, F. M. i Nieva, J. L. (1997b) **Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13(14):1203-1211.

Pereira, F. B., Valpuesta, J. M., Basanez, G., Goñi, F. M. i Nieva, J. L. (1999) **Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates.** *Chem. Phys. Lipids* 103(1-2):11-20.

Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Lins, L., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. i Rosseneu, M. (1997) **Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms.** *Eur. J. Biochem.* 243(3):650-659.

Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. i Lins, L. (1996) **Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide.** *J. Biol. Chem.* 271(46):28757-28765.

Poumbourios, P., Wilson, K. A., Center, R. J., El Ahmar, W. i Kemp, B. E. (1997) **Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomerization requires the gp41 amphipathic alpha-helical/leucine zipper-like sequence.** *J. Virol.* 71(3):2041-2049.

Pritsker, M., Jones, P., Blumenthal, R. i Shai, Y. (1998) **A synthetic all D-amino acid peptide corresponding to the N-terminal sequence of HIV-1 gp41 recognizes the wild-type fusion peptide in the membrane and inhibits HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95(13):7287-7292.

Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W. i Shai, Y. (1999) **Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes.** *Biochemistry* 38(35):11359-11371.

## Q

Qiao, H., Pelletier, S. L., Hoffman, L., Hacker, J., Armstrong, R. T. i White, J. M. (1998) **Specific single or double proline substitutions in the "spring-loaded" coiled-coil region of the influenza hemagglutinin impair or abolish membrane fusion activity.** *J. Cell. Biol.* 141(6):1335-1347.

Quagliarello, V. (1982) **The Acquired Immunodeficiency Syndrome: current status.** *Yale J. Biol. Med.* 55(5-6):443-452.

## R

Rafalski, M., Lear, J. D. i DeGrado, W. F. (1990) **Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41.** *Biochemistry* 29(34):7917-7922.

Reimund, E. (1986) **Envelope perturbation and AIDS.** *Lancet* 2(8516):1159.

Rokitskaya, T. I., Antonenko, Y. N. i Kotova, E. A. (1997) **Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics.** *Biophys. J.* 73(2):850-854.

Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A. i Antonenko, Y. N. (2002) **Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel.** *Biophys. J.* 82(2):865-873.

## S

Sackett, K. i Shai, Y. (2002) **The HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat plays an essential role in membrane fusion.** *Biochemistry* 41(14):4678-4685.

Sackett, K. i Shai, Y. (2003) **How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.** *J. Mol. Biol.* 333(1):47-58.

Sackett, K. i Shai, Y. (2005) **The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: a <sup>13</sup>C FTIR study.** *J. Mol. Biol.* 350(4):790-805.

Sáez-Ciri3n, A. i Nieva, J. L. (2002) **Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide.** *Biochim. Biophys. Acta* 1564(1):57-65.

Sarin, P. S., Gallo, R. C., Scheer, D. I., Crews, F. i Lippa, A. S. (1985) **Effects of a novel compound (AL 721) on HTLV-III infectivity in vitro.** *N. Engl. J. Med.* 313(20):1289-1290.

Sattentau, Q. J. i Moore, J. P. (1991) **Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding.** *J. Exp. Med.* 174(2):407-415.



Schaffner, C. P., Plescia, O. J., Pontani, D., Sun, D., Thornton, A., Pandey, R. C. i Sarin, P. S. (1986) **Anti-viral activity of amphotericin B methyl ester: inhibition of HTLV-III replication in cell culture.** *Biochem. Pharmacol.* 35(22):4110-4113.

Schagina, L. V., Gurnev, P. A., Takemoto, J. Y. i Malev, V. V. (2003) **Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers.** *Bioelectrochemistry* 60(1-2):21-27.

Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Huang, Q. i Griebenow, K. (2001) **Dihedral angles of trialanine in D2O determined by combining FTIR and polarized visible Raman spectroscopy.** *J. Am. Chem. Soc.* 123(39):9628-9633.

Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Pérez, A., Griebenow, K., Cao, X. i Nafie, L. A. (2003) **The structure of tri-proline in water probed by polarized Raman, Fourier transform infrared, vibrational circular dichroism, and electric ultraviolet circular dichroism spectroscopy.** *Biopolymers* 71(5):558-568.

Shnaper, S., Sackett, K., Gallo, S. A., Blumenthal, R. i Shai, Y. (2004) **The C- and the N-terminal regions of glycoprotein 41 ectodomain fuse membranes enriched and not enriched with cholesterol, respectively.** *J. Biol. Chem.* 279(18):18526-18534.

Silvius, J. R. (2003a) **Fluorescence energy transfer reveals microdomain formation at physiological temperatures in lipid mixtures modeling the outer leaflet of the plasma membrane.** *Biophys. J.* 85(2):1034-1045.

Silvius, J. R. (2003b) **Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems.** *Biochim. Biophys. Acta* 1610(2):174-183.

Simons, K., Garoff, H. i Helenius, A. (1982) **How an animal virus gets into and out of its host cell.** *Sci. Am.* 246(2):58-66.

Struck, D. K., Hoekstra, D. i Pagano, R. E. (1981) **Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion.** *Biochemistry* 20(14):4093-4099.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. i Brunger, A. T. (1998) **Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.** *Nature* 395(6700):347-353.

## T

Tamm, L. K., Crane, J. i Kiessling, V. (2003) **Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13(4):453-466.

Tamm, L. K. i Han, X. (2000) **Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes.** *Biosci. Rep.* 20(6):501-518.

Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S. i Lu, M. (1997) **Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(23):12303-12308.

Temin, H. M. i Mizutani, S. (1970) **RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus.** *Nature* 226(252):1211-1213.

Thali, M., Moore, J. P., Furman, C., Charles, M., Ho, D. D., Robinson, J. i Sodroski, J. (1993) **Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding.** *J. Virol.* 67(7):3978-3988.

Turner, B. G. i Summers, M. F. (1999) **Structural biology of HIV.** *J. Mol. Biol.* 285(1):1-32.

## U

Ugolini, S., Mondor, I. i Sattentau, Q. J. (1999) **HIV-1 attachment: another look.** *Trends Microbiol.* 7(4):144-149.

**V**

Valenta, C., Cladera, J., O'Shea, P. i Hadgraft, J. (2001) **Effect of phloretin on the percutaneous absorption of lignocaine across human skin.** *J. Pharm. Sci.* 90(4):485-492.

Van Maele, B. i Debyser, Z. (2005) **HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins.** *AIDS Rev.* 7(1):26-43.

Viard, M., Parolini, I., Sargiacomo, M., Fecchi, K., Ramoni, C., Ablan, S., Ruscetti, F. W., Wang, J. M. i Blumenthal, R. (2002) **Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells.** *J. Virol.* 76(22):11584-11595.

Voglino, L., McIntosh, T. J. i Simon, S. A. (1998) **Modulation of the binding of signal peptides to lipid bilayers by dipoles near the hydrocarbon-water interface.** *Biochemistry* 37(35):12241-12252.

**W**

Wall, J., Ayoub, F. i O'Shea, P. (1995a) **Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface.** *J. Cell. Sci.* 108 ( Pt 7):2673-2682.

Wall, J., Golding, C. A., Van Veen, M. i O'Shea, P. (1995b) **The use of fluoresceinphosphatidylethanolamine (FPE) as a real-time probe for peptide-membrane interactions.** *Mol. Membr. Biol.* 12(2):183-192.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. i Wiley, D. C. (1999) **Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses.** *Mol. Membr. Biol.* 16(1):3-9.

Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. i Wiley, D. C. (1997) **Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.** *Nature* 387(6631):426-430.

Weng, Y. i Weiss, C. D. (1998) **Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41.** *J. Virol.* 72(12):9676-9682.

Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T., Baird, T., Jr., Oas, T. G., McDanal, C., Hunter, E. i Matthews, T. (1994a) **Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(26):12676-12680.

Wild, C., Greenwell, T. i Matthews, T. (1993) **A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9(11):1051-1053.

Wild, C., Greenwell, T., Shugars, D., Rimsky-Clarke, L. i Matthews, T. (1995) **The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11(3):323-325.

Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. i Matthews, T. (1992) **A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89(21):10537-10541.

Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. i Matthews, T. J. (1994b) **Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91(21):9770-9774.

Wilson, I. A., Skehel, J. J. i Wiley, D. C. (1981) **Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution.** *Nature* 289(5796):366-373.

**Y**

Yang, C., Yang, Q. i Compans, R. W. (2000) **Coreceptor-dependent inhibition of the cell fusion activity of simian immunodeficiency virus Env proteins.** *J. Virol.* 74(13):6217-6222.

Yang, J., Gabrys, C. M. i Weliky, D. P. (2001) **Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide.** *Biochemistry* 40(27):8126-8137.

Yang, J., Prorok, M., Castellino, F. J. i Weliky, D. P. (2004) **Oligomeric beta-structure of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide formed from soluble monomers.** *Biophys. J.* 87(3):1951-1963.

Yang, J. i Weliky, D. P. (2003) **Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for parallel and antiparallel strand arrangements in the membrane-associated HIV-1 fusion peptide.** *Biochemistry* 42(40):11879-11890.

**Z**

Zhang, L., Rozek, A. i Hancock, R. E. (2001) **Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes.** *J. Biol. Chem.* 276(38):35714-35722.

Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. i Kim, P. S. (2000) **Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97(26):14172-14177.

Zhuang, X. i Rief, M. (2003) **Single-molecule folding.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13(1):88-97.

# **PUBLICACIONES**

## Interaction of Fusion Peptides from HIV gp41 with Membranes: A Time-Resolved Membrane Binding, Lipid Mixing, and Structural Study<sup>†</sup>

Victor Buzón, Esteve Padrós, and Josep Cladera\*

Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Received March 1, 2005; Revised Manuscript Received June 7, 2005

**ABSTRACT:** The interaction of the so-called fusion peptide of the human immunodeficiency virus gp41 envelope glycoprotein with the target cell membrane is believed to trigger the fusion process which allows the entry of the virus into the cell. Many studies on the interaction of the fusion peptide with biological membranes have been carried out using synthetic peptides and model membranes. Due to the variety of experimental systems and sequences used, some controversy exists, concerning mainly the type of structure which triggers membrane destabilization and fusion ( $\alpha$  helix or  $\beta$  structure). With the aim of contributing to shed some light on the subject we have undertaken a series of experiments on the interaction of the three most representative fusion sequences with model membranes under the same experimental conditions. The results show that the fusion peptides, which adopt an unordered structure when dissolved in DMSO, form a mixture of aggregated  $\beta$  and helical + unordered structures in aqueous buffer. Model membranes are shown to enhance the formation of aggregated  $\beta$  structures. The nature of the membrane binding event, the kinetics of the binding and lipid mixing processes, and the kinetics of the structural changes depend on whether both ends of the fusion sequence or just one bears a positive charge. Analysis of the kinetic data shows that lipid mixing depends on the transformation of unordered + helical structures into aggregated  $\beta$  structures upon binding to the membrane.

According to a nowadays widely accepted hypothesis, human immunodeficiency virus (HIV-1)<sup>1</sup> entry into the target cell is triggered by the interaction of the viral glycoprotein gp41 with the cell membrane (1–6). In the viral envelope gp41 is noncovalently associated to gp120, the glycoprotein responsible for T-lymphocyte recognition. Following the interaction of gp120 with the CD4 receptor and various coreceptors on the cell membrane, a series of conformational rearrangements takes place, which results in the interaction of the N-terminal part of gp41 with the cell membrane. This process has been described to trigger the fusion of the viral and the cellular membranes, and the involvement of the 23 N-terminal fragment (the fusion peptide) of gp41 has been deduced from mutagenesis experiments, which have shown the importance of different residues within the segment for the fusion event to take place (7–11). gp41 has been crystallized, and it has been shown to form a trimeric structure composed of three coiled  $\alpha$  helices (12–14), a conformation that was first described for influenza's hemag-

glutinin (15) and that has been proposed for the fusion proteins of other viruses (2). A general model, the so-called "spring loaded mechanism" (16), by which the viral fusion protein makes contact with the target cell membrane and causes the viral and cellular membranes to become close enough for membrane fusion to occur, has been elaborated from the above-mentioned structural studies. The structures deduced from the diffraction data, however, are devoid of the N-terminal fusion peptide, since its hydrophobicity makes necessary its removal in order to get the protein crystals. Nevertheless, a considerable amount of structural and functional data has been gathered in the past decade from experiments using synthetic peptides with sequences corresponding to different lengths of the N-terminal fusion peptide of mainly influenza but also HIV and other viruses (17–40). In the case of immunodeficiency viruses, the interpretation of the experimental results has resulted in two different and contradictory views on the structure adopted by the fusion peptide upon interaction with model membranes and its importance for the membrane fusion process. Data from Nieva's laboratory (27–32, 40) for example, obtained from studies with a 23 residue long fusion peptide, indicate that the fusogenic conformation corresponds to a  $\beta$ -pleated structure which absorbs in the infrared region characteristic for proteinaceous aggregates. Formation of  $\beta$ -pleated structure upon membrane interaction has been detected as well by Weliky and collaborators (35, 36, 41–43). On the other hand, working with a 16 residue long sequence, Ruyschaert's group in Brussels have reported the formation of an obliquely inserted  $\alpha$  helix in the membrane, which would

<sup>†</sup> This work was funded by "Fundació La Marató de TV3" (Project Ref. 020410) (J.C.).

\* Corresponding author. E-mail: josep.cladera@uab.es. Phone: 00-34-935812112. Fax: 00-34-935811907.

<sup>1</sup> Abbreviations: HIV-1, human immunodeficiency virus type-1; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; DMSO, dimethyl sulfoxide; FPE, fluorescein-phosphatidylethanolamine; Rh-PE, *N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) phosphatidylethanolamine; NBD-PE, *N*-(nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) phosphatidylethanolamine; ANTS, 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt; DPX, *p*-xylene-bis-pyridinium bromide; FP, fusion peptide; LUVs, large unilamellar vesicles; FTIR, Fourier transform infrared; gp41, glycoprotein 41; gp120, glycoprotein 120; FRET, fluorescence resonance energy transfer

## Interaction of HIV Fusion Peptides with Membranes

Biochemistry, Vol. 44, No. 40, 2005 13355

trigger the destabilization of the lipidic bilayer and the fusion process (21–26, 33). Differences in the length of the sequences used, composition of the model membranes, and other experimental parameters make it difficult to draw clear conclusions from the comparison of the different studies. On the other hand, the structural studies describe the conformation of the peptides at the end of the fusion process or in other nonfusogenic conditions. Information on the structure of the fusion peptides during the membrane fusion process is lacking.

In the present work we have studied the interaction of the two most widely used HIV fusion domain sequences (16 and 23 residue long sequences) with model membranes in the same experimental conditions, with the aim of getting and comparing information on the kinetics of the structural changes, the membrane binding, and the lipid mixing processes. Phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine (1:1) membranes have been chosen as model membranes. Phosphatidylethanolamine (PE) is together with phosphatidylcholine (PC), cholesterol, sphingomyelin, and phosphatidylserine (PS) one of the major lipidic components of the viral membrane (44). PE as a nonlamellar lipid has been described as a generator of negative curvature in the bilayer and a modulator of the tendency of bilayers to fuse (38). Most of the works in which helicoidal structures are presented as the ones responsible for triggering the fusion process have been carried out using PC/PE membranes (21, 24). Finally, using PC/PE membranes we attempt to define a basic lipid system that could be supplemented with other components (cholesterol, PS, sphingomyelin) in order to study systematically their importance in subsequent works.

The results show that lipid mixing depends on the transformation of unordered and probably helical structures into aggregated  $\beta$  structures and that such a conformational change occurs upon binding to the membrane. Moreover the kinetics of the process greatly depend on whether the two ends of the peptidic sequence or just one of them bears a positive charge.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** Egg phosphatidylcholine, egg phosphatidylethanolamine, and Triton X-100 were purchased from Sigma Chemical Company. Fluorescein-phosphatidylethanolamine, *N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) phosphatidylethanolamine, *N*-(nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) phosphatidylethanolamine, 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt (ANTS), and *p*-xylene-bis-pyridinium bromide (DPX) were purchased from Molecular Probes Inc. Deuterated dimethyl sulfoxide was purchased from Merck. All others reagents were of analytical grade.

**Peptide Synthesis.** The sequences corresponding to the N-terminus of the HIV-1 gp41 were synthesized using chloride as a counterion and purified (estimated homogeneity > 90%) by Jerini Peptide Technologies. Peptide stock solutions were prepared in deuterated dimethyl sulfoxide (spectroscopy grade). The sequences used were as follows:

FP16: H-AVGIGALFLGFLGAAG-CONH<sub>2</sub>

FP23-Ac: Ac-AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-CONH<sub>2</sub>

FP23-H: H-AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-CONH<sub>2</sub>

**Vesicle Preparation and Labeling with Fluorescein-phosphatidylethanolamine.** Large unilamellar lipid vesicles were prepared according to Mayer et al. (45). Phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine 1:1) dissolved in chloroform were mixed in a round-bottom flask, and the solution was dried under a stream of nitrogen until a thin film was obtained. The film was resuspended in buffer (10 mM Tris pH 7.5 for fluorescence experiments or 10 mM Hepes pD 7.5 for infrared measurements) and then frozen and thawed 5 times. Finally the vesicle suspension was extruded 10 times through 2 polycarbonate filters of pore size 100 nm using a LiposoFast extruder. The vesicles were labeled exclusively in the outer bilayer leaflet with FPE as described by Wall et al. (46). Briefly, LUVs were incubated with 0.25 mol % FPE dissolved in ethanol (never more than 0.1% of the total aqueous volume) at 37 °C for 1 h in the dark. Any remaining unincorporated FPE was removed by gel filtration on a PD10 Sephadex G-25 column equilibrated with the appropriate buffer. FPE-vesicles were stored at 4 °C until use in an oxygen-free atmosphere.

**Fluorescence Measurements with FPE-Labeled Membranes.** Fluorescence time courses of FPE-labeled vesicles were measured after the desired amount of peptide was added into 2 mL of lipid suspensions (300  $\mu$ M lipid) with an SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set at 490 and 520 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C. The contribution of light scattering to the fluorescence signals was measured in experiments without the dye and was subtracted from the fluorescence traces. Data were fitted either to a hyperbolic or to a sigmoidal binding model (47) respectively using the equations

$$F = (F_{\max}[\text{FP}]) / (K_d + [\text{FP}]) \quad (1)$$

$$F = (F_{\max}[\text{FP}]^n) / (K_d^n + [\text{FP}]^n) \quad (2)$$

where  $F$  is the fluorescence variation,  $F_{\max}$  the maximum fluorescence variation,  $[\text{FP}]$  the fusion peptide concentration,  $K_d$  the dissociation constant of the membrane binding process, and  $n$  the Hill coefficient. The experimental points shown in the figures are the mean values of two measurements.

**Lipid Mixing Measurements.** Lipid mixing experiments were carried out by measuring the fluorescence intensity change resulting from the fluorescence resonance energy transfer between NBD-PE and Rh-PE, inserted into the lipid bilayer, as described by Struck et al. (48). Fluorescence was monitored by using an SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Vesicles were prepared as described above, but in this case the dyes were added into the initial organic lipid solution. Vesicles containing both dyes at 0.6 mol % each were mixed with dye-free vesicles (1:9 molar ratio) at a final lipid concentration of 300  $\mu$ M. The initial fluorescence of the labeled/unlabeled vesicle suspension was taken as 0% lipid mixing, and the 100% lipid mixing was determined by adding Triton X-100 at a final concentration of 0.1% (v/v). The excitation wavelength was 465 nm and emission wavelength 530 nm. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C. The experimental points shown in the figures are the mean values of two measurements.

**Leakage Measurements.** For leakage experiments, release of vesicle contents to the medium induced by addition of



different fusion peptides was monitored using the ANTS/DPX assay (49). LUVs (50  $\mu$ M) containing 12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 20 mM NaCl, and 10 mM Tris pH 7.5 were separated from unencapsulated material by gel filtration in a PD10 Sephadex G-25 column equilibrated with the appropriate buffer and eluted with 10 mM Tris, 100 mM NaCl pH 7.5. Fluorescence measurements were recorded with an SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths of ANTS were set at 353 and 520 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C. Fluorescence of the vesicles at time zero was taken as 0% fluorescence, and the 100% fluorescence value was obtained by adding Triton X-100 (0.5% v/v).

**Vesicle's Size Measurements.** PC/PE (1:1) liposomes were incubated overnight at room temperature with the fusion peptides at different lipid-to-peptide ratios. Vesicle size distributions were measured by dynamic light scattering, using an ultrafine particle analyzer (UPA) 150 (Microtrac, Montgomeryville, PA). All parameters were fixed as previously described (50).

**Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Measurements.** FTIR spectra were recorded at 20 °C on an FTIR-Mattson Polaris spectrometer, equipped with a cooled liquid nitrogen mercury-cadmium-telluride (MCT) detector, at a nominal resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$ . The spectrometer was continuously purged with dry air (dew point lower than -60 °C). All spectra were corrected for atmospheric water vapor contribution. For time-resolved experiments vesicles from stock solutions in deuterated Hepes buffer and peptides from stock solutions in deuterated DMSO were mixed at different lipid-to-peptide ratios and immediately placed between two  $\text{CaF}_2$  windows separated with a 50  $\mu$ m spacer. Ten scans were collected and averaged using the shuttle device every 80 s for 30 min. Spectra of the peptides in deuterated DMSO were collected by placing the peptide dissolved in pure DMSO between the windows and averaging 400 scans using the shuttle device after incubation in the solvent for at least a half-hour. Concentration of the peptides for FTIR experiments was always around 1 mM. FTIR spectra for the analysis of the ester carbonyl region were collected by placing a PC/PE vesicle suspension in deuterated buffer (10 mM lipid) or a mixture of PC/PE vesicles (10 mM) and fusion peptide (1 mM, incubated overnight with the lipid) between the two  $\text{CaF}_2$  windows separated by a 50  $\mu$ m spacer. Four hundred scans were averaged using the shuttle accessory. Solvent contributions were always subtracted from the spectra.

**Mathematical Fitting of Experimental Traces.** Fluorescence variation traces (from membrane binding and lipid mixing experiments) and FTIR time-resolved data were fitted to exponential processes using the following equation:

$$\text{single exponential: } y = y_0 - A_1 e^{-k_{app}t} \quad (3)$$

$$\text{double exponential: } y = y_0 - A_1 e^{-k_{app1}t} - A_2 e^{-k_{app2}t} \quad (4)$$

where  $A$  is the amplitude of the exponential process,  $k_{app}$  its the apparent rate constant, and  $t$  is time.

## RESULTS

**Aggregation State and Secondary Structure of the Fusion Peptides in DMSO.** The infrared transmission spectrum of

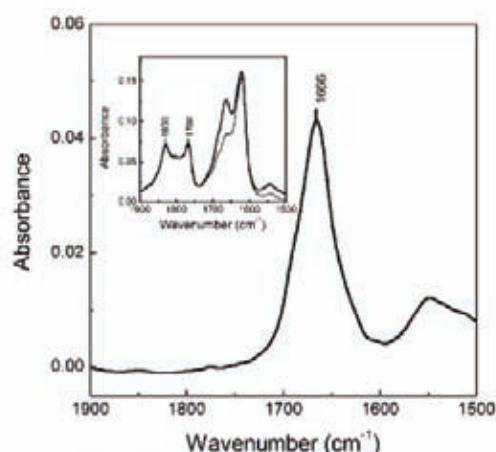


FIGURE 1: Fourier transform infrared spectra of FP16 in DMSO. The amide I and II regions are shown, after subtracting the spectrum of the pure solvent from the spectrum of the sample. The inset shows both spectra before the subtraction. Bands at 1830 and 1788  $\text{cm}^{-1}$  correspond to DMSO and have been used as the factoring reference for the subtraction. Temperature 20 °C. Four hundred scans were acquired and averaged for every spectrum. Spectra shown are representative of two different measurements.

the 16 residue long fusion peptide FP16 dissolved in DMSO is shown in Figure 1. The spectrum of the peptide in the amide I region was obtained after subtracting the spectral contributions from DMSO, as illustrated in the figure inset. FP16 in DMSO shows an IR absorption maximum at 1666  $\text{cm}^{-1}$ . Such an amide I maximum has been assigned by Jackson and Mantsch (51), for proteins and peptides dissolved in DMSO, to the stretching vibration of amide carbonyls which do not form hydrogen bonds with the amide NH groups. In these conditions carbonyls would be substituted as hydrogen bond acceptors by the SO groups from DMSO. The authors infer, in a study with different proteins and peptides, that the polypeptidic chains are unaggregated and unstructured when dissolved in pure DMSO. Infrared spectra similar to those shown in Figure 1 were obtained in the present work for the fusion peptides FP23-H and FP23-Ac (not shown). The fusion peptides in pure DMSO are, therefore, monomeric and unstructured, according to their IR spectra.

**Binding of the Fusion Peptides to Model Membranes.** Binding of the fusion peptides to the PC/PE (1:1) model membranes was monitored using the electrostatic surface potential sensor FPE (0.25 mol %) (52, 53). The change in the magnitude of the surface potential, as a consequence of the interaction of the positive charges with the membrane surface, resulted in an increase of the fluorescence of the FPE dye, which is inserted in the membrane leaving the fluorophore at the membrane surface (Figure 2A). The binding curves shown in Figure 2B represent the fluorescence change as a function of peptide concentration for the three sequences. The binding curve corresponding to FP16 is consistent with the one previously published using the same technique (54), showing a clear interaction of the peptide with the membrane surface, with a dissociation constant of ca. 10  $\mu$ M. The binding curve of FP23-Ac follows a very similar pattern. In both cases the binding curves have a predominant hyperbolic character (eq 1) with no significant signs of sigmoidality. Binding of FP23-H, however, gives a

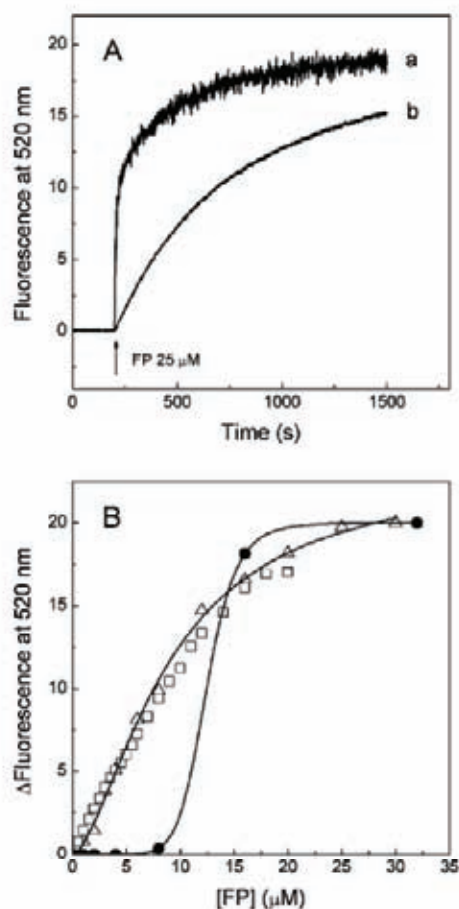


FIGURE 2: Binding of the fusion peptides to the PC/PE (1:1) model membranes. (A) FPE fluorescence variation as a function of time upon peptide addition ( $25 \mu\text{M}$ ) to the PC/PE (1:1) membrane suspension: (a) FP23-Ac (FP16 gave a very similar trace); (b) FP23-H. The fluorescence traces shown are representative of two independent experiments. (B) The amplitude of the fluorescence variation as a function of peptide concentration was used to obtain the binding curves: FP16 (triangles), FP23-Ac (squares), and FP23-H (full circles). The amplitude of fluorescence variation was measured when the traces shown in A reached a plateau, ca. 3000 s. The solid lines are the best fits using eq 1 for FP16 and FP23-Ac and eq 2 for FP23-H. Each experimental point is the average of two independent measurements. Lipid concentration was  $300 \mu\text{M}$ . Temperature  $20^\circ\text{C}$ . The buffer was 10 mM Tris pH 7.5

clearly sigmoidal binding curve, with a Hill coefficient of 9 and a dissociation constant ca.  $12 \mu\text{M}$ , calculated using eq 2.

**Lipid Mixing.** The peptides' fusogenic capacity was monitored by measuring their ability to induce lipid mixing in model membrane vesicle suspensions.

FRET measurements were carried out using the dyes Rhodamine and NBD according to Struck et al. (48). Figure 3A shows the increase in fluorescence intensity of NBD (decrease in energy transfer) as a consequence of the lipid mixing and dye dilution caused by the addition of the fusion peptides. The results clearly show that, whereas the addition of both FP16 and FP23-Ac produced very similar kinetics, addition of FP23-H caused a much slower lipid mixing process. In Figure 3B the extent of lipid mixing has been plotted against the lipid/peptide ratio for the three fusion sequences: FP23-Ac and FP16 caused very similar extents

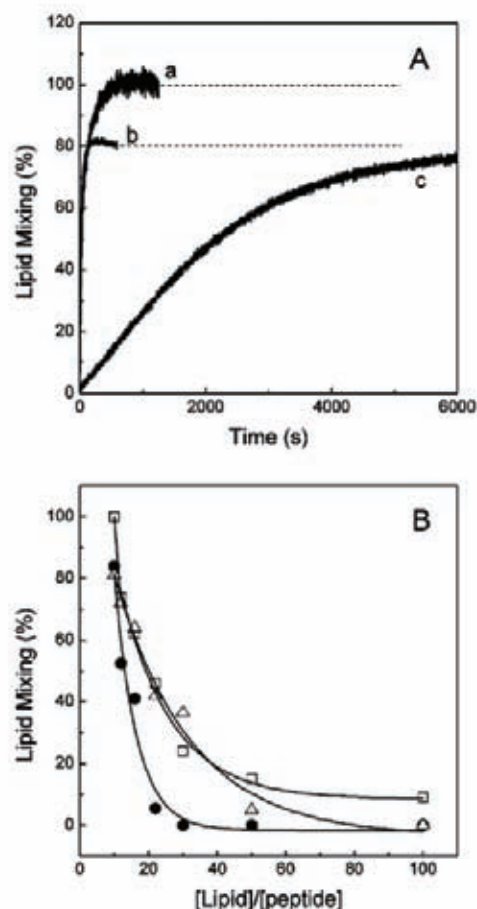


FIGURE 3: (A) Lipid mixing time course caused by addition of  $25 \mu\text{M}$  FP23-Ac (a), FP16 (b), and FP23-H (c) to a  $300 \mu\text{M}$  PC/PE (1:1) membrane suspension. (B) Percentage of lipid mixing as a function of the lipid/peptide ratio: FP16 (triangles), FP23-Ac (squares), and FP23-H (full circles). The amplitude of fluorescence variation was measured when the traces shown in A reached a plateau (ca. 1000 s for a and b, ca. 10000 s for c). Temperature  $20^\circ\text{C}$ . Fluorescence traces in A are representative of two independent measurements, and each data point in B is the average of two experiments. The buffer was 10 mM Tris pH 7.5

of lipid mixing at the same lipid/peptide ratios, but lower ratios are sufficient to attain the same levels when using FP23-H.

**Structural Changes upon Peptide-Membrane Interaction.** To gain insight on the kinetics of the conformational changes taking place during the membrane binding and lipid mixing processes, we monitored the secondary structure variations of the fusion peptides as a function of time in the absence and presence of membranes, using transmission FTIR. The results are summarized in Figure 4. The spectra corresponding to the FP23-H sequence when added into the buffer (Figure 4A) reveal two main bands: one centered at  $1624 \text{ cm}^{-1}$ , characteristic of aggregated intermolecular  $\beta$  structures (23, 28), and another with a maximum between  $1645$  and  $1648 \text{ cm}^{-1}$ , which according to the usual assignments found in the literature for spectra in  $\text{D}_2\text{O}$  suspensions would correspond to a mixture of unordered and helical structures (55). From the relative intensities of both bands it can be roughly estimated that the FP23-H peptide forms in water molecular aggregates composed of a mixture of intermolecular  $\beta$  structures and unordered + helical structures. When

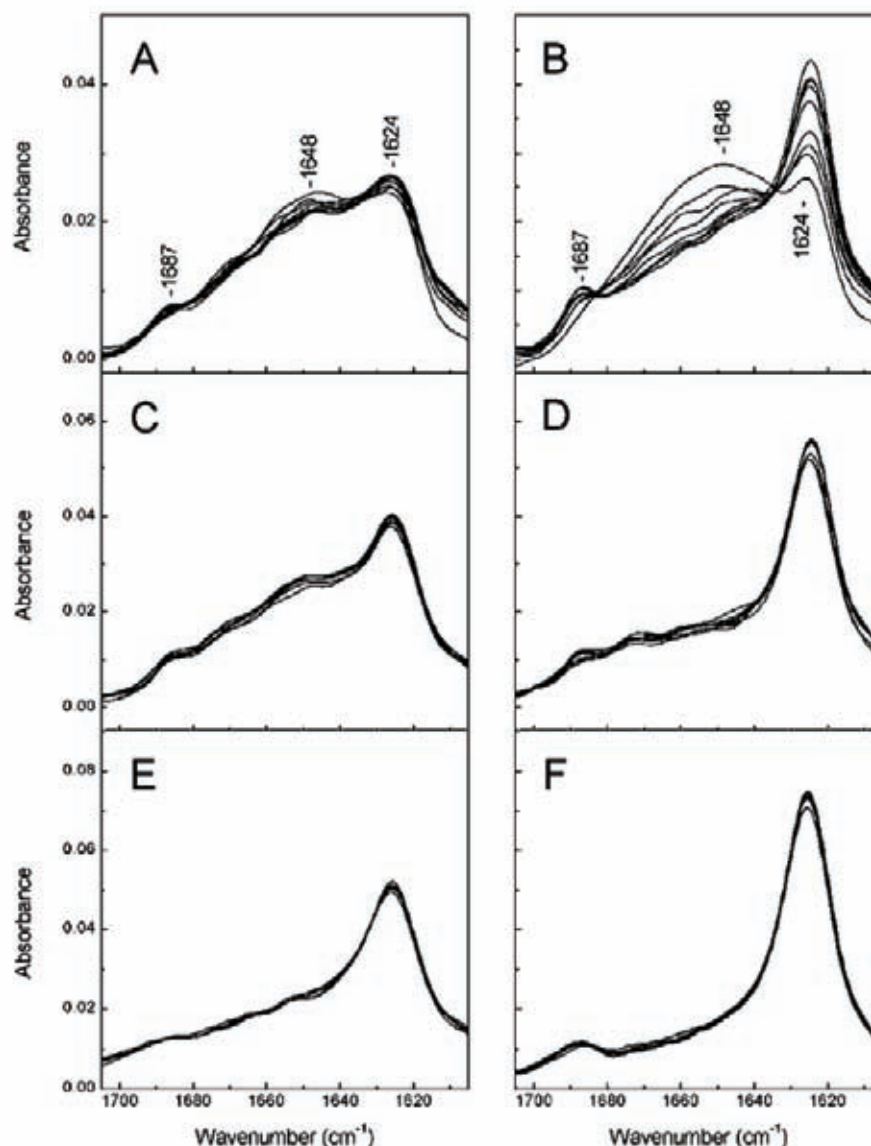


FIGURE 4: Effect of the addition of the fusion peptide (1 mM) into deuterated 10 mM Hepes buffer (A, C, E) and to a 10 mM PC/PE (1:1) membrane suspension in the same buffer (B, D, F) measured by transmission FTIR. Spectra acquired as a function of time are shown for FP23-H (A, B), FP23-Ac (C, D), and FP16 (E, F). Each spectrum is the average of 10 scans, and the spectral contribution of the buffer was always subtracted. One spectrum was collected every 80 s. Temperature 20 °C, pD 7.5. The series of spectra shown are representative of two independent measurements.

the FP23-Ac sequence is mixed with the aqueous buffer (Figure 4C), the infrared spectra reveal the same structural components as for FP23-H, but in this case the amount of unordered + helical structures is reduced in favor of the intermolecular  $\beta$  aggregates. This effect is clearly more intense when FP16 is added into Hepes buffer (Figure 4E): the feature which dominates the infrared spectra is then the band at 1624  $\text{cm}^{-1}$ , whereas there is only a residual component at 1645–50  $\text{cm}^{-1}$ .

On the other hand, when the peptides were mixed with PC/PE model membranes (Figure 4B,D,F) it becomes apparent that a larger amount of aggregated  $\beta$  structure did form, as compared with the spectra of the peptides in water, at the same peptide concentration.

For FP23-H (Figure 4B), we have been able to measure this  $\beta$  structure formation as an increment of the absorbance

at 1624  $\text{cm}^{-1}$ , which is simultaneous with the disappearance of a broad band centered at 1648  $\text{cm}^{-1}$ . This broad band, detected just 50 s after the peptide was mixed with the membranes, can be again interpreted as being the result of a mixture of spectral components assignable to helical ( $\alpha$  helices and polyproline II type helices) and unordered structures (47, 56, 57). In the case of FP3-Ac (Figure 4D) and FP16 (Figure 4F), the sequences of FTIR spectra measured show that the formation of the  $\beta$  structure as a consequence of mixing the peptides with the membranes is a faster process. As with FP23-H it is possible that helical structures (absorbing at 1648  $\text{cm}^{-1}$ ) do form within the dead time (approximately 50 s) of our measuring procedure.

In Figure 5 the absorbance increment at 1624  $\text{cm}^{-1}$  reported in Figure 4 with respect to the absorbance measured at 1648  $\text{cm}^{-1}$  is plotted as a function of time. For FP23-H

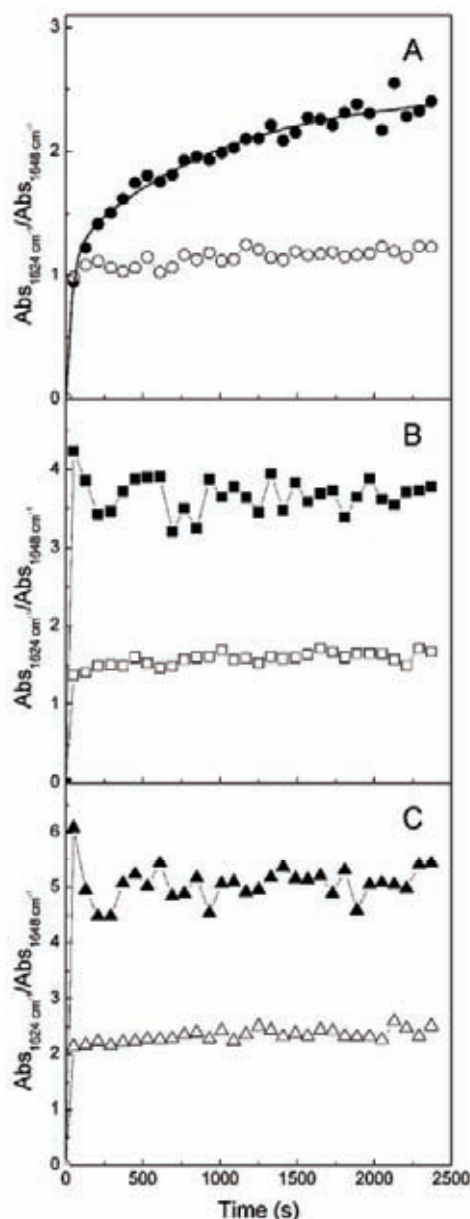


FIGURE 5: Kinetics of the structural changes illustrated in Figure 4. The formation of aggregated  $\beta$  structure from helical + unordered structures has been represented as the ratio of absorbances at 1624 and 1648  $\text{cm}^{-1}$  versus time. (A) FP23-H, (B) FP23-Ac, and C (FP16). Full symbols: kinetics of the interactions of the peptides (1 mM) with PC/PE membranes, 10 mM lipid ( $L/P = 10$ ). Hollow symbols: kinetics of the addition of the peptides into deuterated 10 mM Hepes buffer. Full circles in (A) were fitted to a double exponential function (eq 3). Each data point is the average of two independent measurements. Temperature 20  $^{\circ}\text{C}$ , pD 7.5.

(Figure 5A) the experimental points could be fitted to a double exponential function (eq 4), from which the apparent rate constants  $k_{app1}$  and  $k_{app2}$  were calculated (Table 1).

Figure 5B and Figure 5C clearly show that formation of the aggregated  $\beta$  structure when FP16 and FP23-Ac are mixed with the PC/PE vesicles is a rapid process that entirely falls within the dead time of the experimental procedure. The figure confirms that in all cases the amount of  $\beta$  structures formed with respect to other structures when the

peptides are mixed with membranes is more than double the amount of  $\beta$  structure formed when the peptides are added into Hepes buffer.

*Effect of Varying the Lipid/Peptide Ratio on the Rate Constants Derived from the FTIR Studies.* One of the major problems when comparing kinetic data from structural studies (Figure 5) with data from "functional" studies (lipid mixing and binding data in this case, Figures 2 and 3) is the difference in the concentration required for each type of study. In the present work the peptide and lipid concentrations used in the FTIR studies reported in Figures 4 and 5 were 33 times higher than the concentrations used for the binding and lipid mixing experiments. To try to overcome this problem we have kept always constant the lipid peptide ratio ( $L/P = 10$ ) for the measurements that had to be compared in kinetic terms. To properly sustain this approach we checked whether lowering the lipid and peptide concentrations but keeping constant the lipid/peptide ratio had any effect on the rate constant derived from the FTIR kinetic studies. Figure 6 shows the FTIR kinetics measured at the same lipid/peptide ratio as in Figure 5 for the FP23-H sequence ( $L/P = 10$ ), but the lipid and the peptide concentrations being 10 times lower than that in Figure 5A. As described in the figure legend, the rate constants derived from the mathematical fit to eq 4 are very similar to those calculated from the data in Figure 5A and presented in Table 1. This experimental evidence allowed us to compare the kinetic constants derived from the structural and functional measurements (see next paragraph) and to be able to propose a general kinetic scheme in order to explain the data (see Discussion).

*Comparison of the  $\beta$  Structure Formation, Membrane Binding, and Lipid Mixing Processes.* To undertake a more detailed kinetic analysis of the different processes measured and described in the above sections, we proceeded to mathematically fit the experimental data (time traces) to exponential functions (eqs 3 and 4). The apparent rate constants derived from such fittings for the structural changes (formation of  $\beta$  structure), membrane binding, and lipid mixing processes reported in Figures 2–5 are summarized in Table 1 for the three peptidic sequences.

When the FP23-H peptide was mixed with the membranes, aggregated  $\beta$  structure formation data (Figure 5A, solid circles) fitted a double exponential process from which two apparent rate constants were calculated (Table 1): the first one ( $2.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) is consistent with the formation of aggregates in Hepes buffer illustrated in Figure 5A (hollow symbols); the second, slower process has an apparent rate constant of  $1.03 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , which coincides with the higher apparent rate constant of the binding process ( $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , time trace reported in Figure 2A). The slower lipid mixing process (Figure 3A) gave an apparent rate constant of  $1.87 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , very similar to the lower rate constant of the binding process ( $4.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). These slow FPE fluorescence changes might reflect the effect of membrane fusion on the fluorescence of the FPE dye including perhaps conformational rearrangements of the peptide on the membrane surface. It can be therefore concluded that the formation of the aggregated  $\beta$  structure takes place as the FP23-H peptide binds to the membranes and that the structural change is followed by the lipid mixing process.

Table 1: Apparent Rate Constants ( $k_{app}$ ) Calculated from the Mathematical Fitting of the Time Traces Reported in Figures 2–5 (Binding, Structural Changes, and Lipid Mixing) to Exponential Functions (Eqs 3 and 4)<sup>a</sup>

	$k_{app1}, k_{app2} (s^{-1})$		
	binding	$\rightarrow \beta^b$	lipid mixing
FP23-H	$2.5 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-5}$ $4.2 \times 10^{-4} \pm 7 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^{-2} \pm 5 \times 10^{-3}$ $1.03 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-4}$	$1.87 \times 10^{-4} \pm 1.4 \times 10^{-6}$
FP16	$2 \times 10^{-2} \pm 10^{-3}$ $7.6 \times 10^{-3} \pm 2.5 \times 10^{-4}$	nd <sup>c</sup>	$5 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-3}$ $8.55 \times 10^{-3} \pm 1.46 \times 10^{-4}$
FP23-Ac	$10^{-1} \pm 6 \times 10^{-3}$ $3 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-4}$	nd <sup>c</sup>	$5 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}$ $6.25 \times 10^{-3} \pm 9.52 \times 10^{-5}$

<sup>a</sup> The errors shown are the standard deviations calculated by the fitting program. <sup>b</sup> Structural change: from helical + unordered structures into aggregated  $\beta$  structures. <sup>c</sup> Not determined; the structural change in the case of FP16 and FP23-Ac is very fast, and occurs within the dead time of the experimental procedure (50 s).

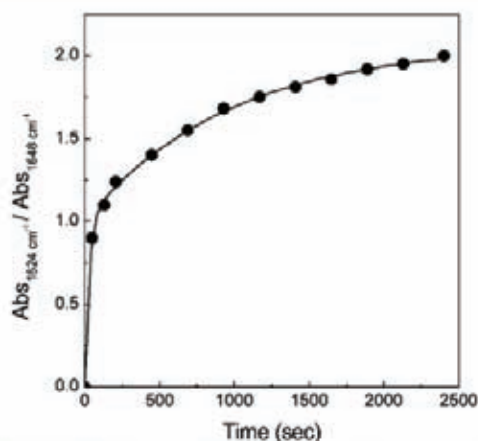


FIGURE 6: Kinetics of the structural change of FP23-H (0.1 mM peptide) when mixed with 1 mM lipid ( $L/P = 10$ ). Data points were fitted to a double exponential function (eq 4). Rate constants derived from the mathematical fitting:  $k_{app1} = 3.7 \times 10^{-2} \pm 3 \times 10^{-3} s^{-1}$ ;  $k_{app2} = 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-5} s^{-1}$ . Conditions as in Figure 5.

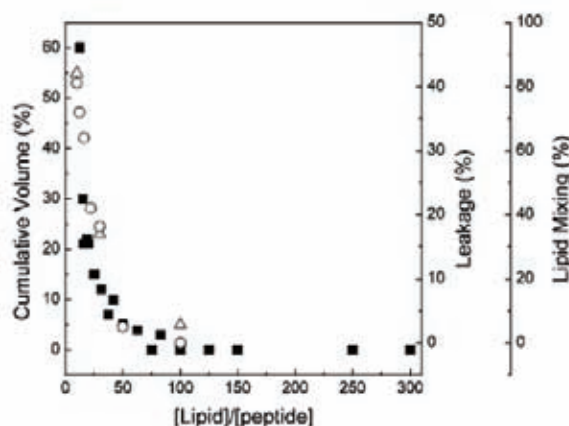


FIGURE 7: Changes in vesicle's size as a function of the lipid/peptide ratio (squares) compared to the percentage of vesicle leakage (triangles) and lipid mixing (circles) for FP16. Changes in size are expressed as percentage of cumulative volume, that is, as the percentage of the total vesicle's volume which corresponds to a population of particles with a diameter between 1 and 10  $\mu m$  (diameter of the initial model vesicles is 100 nm). Conditions as in Figure 5.

No exponential curve could be fitted to the  $\beta$  structure formation data points corresponding to the FP23-Ac and FP16 sequences, reported in Figure 5, due to the lack of data between 0 and 50 s. Nevertheless, it can be safely concluded that the rate constant for the structural change would be

smaller or at most equal to the rate constant calculated for the first of the two exponential processes to which the binding traces were fitted ( $2 \times 10^{-2}$  and  $10^{-1} s^{-1}$  in Table 1). So we can assume that also in this case the peptide molecules that bind to the membranes will form aggregated  $\beta$  structures as they bind. Moreover, for both FP23-Ac and FP16, the binding and lipid mixing processes fit a two exponential function that gave very similar apparent rate constants for both types of processes. Contrary to what has been said for FP23-H (lipid mixing is a process slower than binding), for the other two sequences, either lipid mixing takes place as the peptide binds and forms aggregated  $\beta$  structures or binding is the limiting step (lipid mixing being faster than binding).

**Membrane Fusion, Vesicle Aggregation, and Leakage.** In Figure 7 experimental data on membrane fusion, changes in the vesicle's size, and leakage of encapsulated ANTS/DPX, as a function of lipid/peptide ratio, are summarized for FP16. The same results were obtained for FP23-Ac and FP23-H (not shown). The figure indicates that, as the lipid/peptide ratio decreases, the percentage of a population of particles with diameters ranging from 1 to 10  $\mu m$  with respect to the total vesicle volume increases. This can be interpreted as vesicle aggregation and is accompanied by membrane destabilization, which in turn causes leakage. This aggregation dependent leakage has been previously described (58).

**Effect of Peptide Binding on the Hydration State of the Phospholipid Ester Carbonyl Group.** To get some information on the effect of peptide binding on the lipid components we analyzed the lipid carbonyl infrared region (1700–1750  $cm^{-1}$ ), as shown in Figure 8 for the FP23-H sequence. According to what is described in the literature (59–61) the carbonyl band has two main components: a band centered at 1742  $cm^{-1}$  which corresponds to the carbonyls which do not form hydrogen bonds with water molecules at the lipid water interface (dehydrated carbonyls) and another band centered at 1727  $cm^{-1}$  corresponding to the carbonyls hydrogen bonded to water molecules (hydrated carbonyls). The same results were obtained for the other two peptides (FP16 and FP23-Ac). As it can be deduced from the curve-fittings reported in Figure 8, the interaction of the peptide clearly increases the intensity of the band assigned to the dehydrated carbonyls at the expense of the hydrated ones. Interaction of the peptide with the membranes would therefore have a dehydrating effect at the lipid water interface.

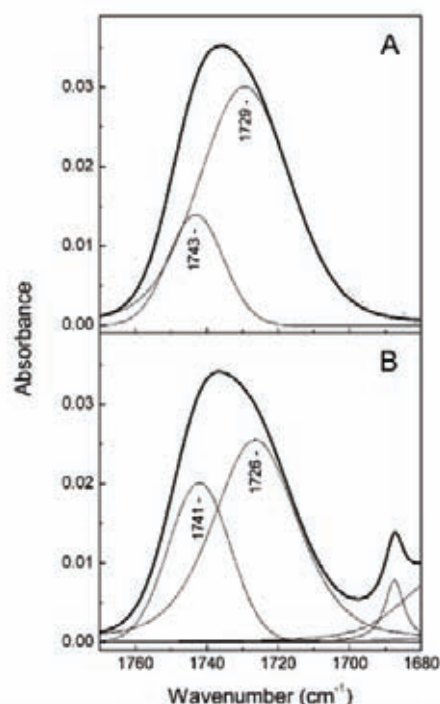


FIGURE 8: Ester carbonyl region of the FTIR spectra of PC/PE model membranes (A) and PC/PE model membranes mixed with the peptide FP23-H (B). Fitted Lorentzian component bands to the original infrared spectra using the Grams 3.2 (Galactic Inc.) program are shown. Experimental conditions as in Figure 5. Percentage area of component bands: in A, 1743  $\text{cm}^{-1}$  (21%), 1729  $\text{cm}^{-1}$  (79%); in B, 1741  $\text{cm}^{-1}$  (34%), 1726  $\text{cm}^{-1}$  (66%).

## DISCUSSION

In spite of the great variety of studies on the interaction of the so-called HIV gp41 fusion peptides with membranes, a detailed description of the events that lead to membrane fusion is still lacking. Two important factors that make it difficult to summarize the existing corpus of data are, first, the fact that sequences differing in length (number of residues) and therefore in amino acidic composition have been used as model fusion peptides in different works, and second, the number of different experimental conditions, mainly in terms of the lipidic composition of the model membranes, in which the experiments have been carried out.

Whereas the fusogenic capacity of all the sequences described in the literature as gp41 fusion peptides has been quite unarguably established, this is not the case with respect to the peptidic structures which are responsible for destabilizing the membrane and triggering the fusion process. Obliquely inserted  $\alpha$  helices and aggregated  $\beta$  structures are the two secondary structures that, depending on the study, have been described as the fusogenic structures (21–33, 40).

In the present work it has been our aim to contribute to the resolution of the controversy with an approach based on two main strategies: (1) to compare the membrane interaction and lipid mixing capacity of the most widely used gp41 fusion peptide sequences (16 and 23 residues long) in exactly the same experimental conditions, in special a unique lipid composition; and (2) to study the conformational changes that the peptides undergo upon mixing with membranes, as a function of time. We followed this approach in order to overcome one of the shortages of the structural studies with

fusion peptides in the past, that is, the fact that the structures described correspond to those present in the sample after the fusion process is completed.

On close examination of the literature, we realized that, for a detailed description of the sequence of events during the interaction of the fusion peptides with membranes, the first problem arises when we try to establish the conformation of the peptides in the solvent more commonly used to stock them in these cases, DMSO. Although Kliger et al. (62) state that they kept the peptide stocks in DMSO in order to avoid aggregation of the peptide prior to its use, no data has been reported, to our knowledge, illustrating it. Martin et al. (25) reported ATR-FTIR data which shows that the peptide, originally in DMSO, is heavily aggregated after being deposited on the ATR crystal and being exposed to a flux of dry air saturated with heavy water vapor. Such experimental conditions did probably result in a sample where the ratio DMSO/peptide was low compared to that in the initial peptide solution, due to the evaporation of the DMSO during the sample preparation process, which would explain the aggregation. Our FTIR spectra clearly show that the peptides in DMSO (a suspension at 1 mM peptide) are not aggregated (lack of the characteristic band around 1620  $\text{cm}^{-1}$ ). According to Jackson and Mantsch (51) it can be deduced that the peptides adopt an unordered structure, most probably due to the S=O groups in the DMSO molecule competing with the C=O groups in the peptidic bond to establish hydrogen bonds with the N–H in the amide.

Once the peptides are added from the DMSO solution to a membrane suspension, they interact with the membrane as the binding curves shown in Figure 2 prove. Binding curves for the 23 residue long fusion peptide have been previously reported using NBD-labeled peptides (62, 63) but under experimental conditions very different from those of the present work. These authors do not observe any interaction of FP16 with lipidic membranes. In our case the binding curve measured for the FP16 sequence is consistent with the one reported before for this peptide by Cladera et al. (64). According to the results presented in Figure 2, the FP23-Ac binds to the membranes in a very similar way to that of FP16, that is, following a hyperbolic process with no sign of cooperativity. The most striking feature in the figure is the binding curve of FP23-H, the form with the protonated N-terminus (positively charged at neutral pH). In this case the binding curve profile is clearly sigmoidal. The Hill coefficient calculated from the mathematical fit to eq 2 is 9. That is a clear indication that, contrary to the interaction of FP16 and FP23-Ac, there are cooperative interactions between the FP23-H molecules upon membrane binding. Given the fact that gp41 exists as a trimer (12–14) and that membrane fusion seems to imply clustering of viral envelope glycoproteins on the surface of the target cell (65), it could be tempting to try to relate this particular Hill coefficient to the formation of 9-mers or trimers of trimers upon membrane binding. The fact that only FP23-H presents such a cooperative behavior, and not FP23-Ac nor FP16, could be related to a different solubility of the peptides in aqueous buffer. FTIR data shows that the three peptides rapidly aggregate into the buffer before interacting with the membrane. FP23-H is however less aggregated than FP23-Ac and much less than FP16 (Figure 4A,C,E). These conformational differences, reflecting the different solubility in water, could account for the observed differences in the binding kinetics and the

binding curves. At this point, it is convenient to bear in mind as well that Bentz and Mittal (66) reported that cooperative units derived from Hill plots for influenza hemagglutinin were not compatible with their proposed kinetic model. Given this discrepancy, we would consider it uncautious to stretch the interpretation of the Hill coefficient too far. An important outcome anyway from the results presented in Figure 2 is a quite distinctive behavior of the fusion peptide FP23 when the N-terminal residue is protonated. The oligomerization of FP23-H upon membrane binding is in agreement with the studies of Weliky and colleagues (35, 36, 41–43) using mainly nuclear magnetic resonance.

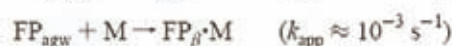
Such a difference between the interaction of FP23-H and that of the other two sequences is further illustrated by the lipid mixing measurements (Figure 3): lipid mixing is slower when triggered by FP23-H and a lower lipid/peptide ratio is sufficient for FP23-H in order to reach the same percentage of fusion, compared to FP16 and FP23-Ac, which follow very similar profiles.

Given the same experimental conditions, the results discussed above show that differences in membrane binding and lipid mixing do not depend on the length of the sequence, but rather on whether both ends of the sequence or only one bears a positive charge. That is, the different behavior does not depend on the protonation of the N-terminus (FP16 has a protonated N-ter as FP23-H) but on the total charge on the peptide sequence and possibly on the higher polarity of FP23-H.

The series of FTIR measurements on the variation of the peptidic secondary structure as a function of time (Figures 4 and 5) do contribute to further consolidate the differences between the interaction of FP23-H and the other two sequences, FP16 and FP23-Ac. When the N-terminus is in the amine form, a slow conformational change leading to the formation of aggregated  $\beta$  structures is detected. The kinetics of such a change could not be measured for the other two peptides, although as we shall discuss next, it is reasonable to think that the same conformational changes do take place, but faster. Let us first consider the FTIR spectra when the peptides are added into aqueous buffer (in the absence of membranes). The more hydrophobic the sequence, the more aggregated  $\beta$  structure forms in buffer (ordered from low to high  $\beta$  structure content: FP23-H < FP23-Ac < FP16, Figure 4A,C,E). Although the spectra of FP23-H point to the existence of oligomers in buffer (band at 1624  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of intermolecularly hydrogen bonded structures), the aggregation band does not dominate the spectra, in which the band centered at 1648  $\text{cm}^{-1}$  (mixture of helical and unordered structures) has approximately the same intensity. The relative intensity of this band with respect to the 1624  $\text{cm}^{-1}$  one is clearly decreased for FP23-Ac (a sequence in which the segment 1–16 is more hydrophobic than in FP23-H due to the acetylation of the N-terminus) and has almost disappeared from the spectra of FP16, a peptide devoid of the more hydrophilic 17–23 segment.

If we compare now the FTIR spectra of the peptides in buffer with those in the presence of membranes, it is clear that the amount of  $\beta$  structure formed is higher when membranes are present for all the peptides (Figures 4 and 5) and the content in helical + unordered structures is reduced, for all the peptides as well, as compared to the content in buffer. Thus, membranes promote the formation of aggregated  $\beta$  structures.

For FP23-H, the following sequence of processes can be deduced from the comparison of the kinetics of  $\beta$  structure formation with those of membrane binding and membrane fusion (Figures 2–5 and Table 1):



where  $\text{FP}_{\text{DMSO}}$  is the fusion peptide dissolved in DMSO (unordered secondary structure),  $\text{FP}_{\text{agw}}$  is the fusion peptide forming  $\beta$  + helical + unordered structure aggregates in water, M is the membrane,  $\text{FP}_{\beta} \cdot \text{M}$  is the complex formed when the aggregated peptide in water interacts with the membranes, and  $\text{FP}_{\beta} \cdot \text{M}_{\text{F}}$  is the peptide–membrane complex after fusion has taken place. Fusion, therefore, is preceded by a conformational change which consists of the transformation of helical + unordered structures into  $\beta$  aggregated ones and such a conformational change takes place upon binding of the peptide to the membrane (coincidence of the second rate constant of the conformational change with the first rate constant of the binding process in Table 1).

According to the data in Table 1, FP23-Ac and FP16 present different kinetics compared to FP23-H. For these two sequences no rate constants could be derived for the conformational change (Figure 5B,C). It can be deduced however that it would be a process as fast as or faster than binding. On the other hand and contrary to the kinetics of FP23-H, the rate constants derived from binding and lipid mixing data for FP23-Ac and FP16 are very similar. This fact would be compatible with a kinetic model in which membrane binding was the limiting step (lipid mixing being faster than binding).

It is important to note that the kinetic analysis exposed above relies on the comparison of structural and functional data that has been obtained at quite different peptide concentrations. For this reason we have ensured that keeping constant the lipid/peptide ratio keeps unaltered the measured rate constant despite significantly changing both the peptide and the lipid concentrations (Figure 6). To explain this fact, it is useful to take into account that, upon binding of the peptide to the membrane surface, a reduction in dimensionality takes place (from the three dimensions in solution to the two dimensions on the membrane surface) as in the case of chemical reactions on a catalyst surface described in chemistry textbooks, where the velocity of the reaction depends on the concentration of the substance on the surface of the catalyst. According to such an approach, the peptide concentration on the membrane surface will remain unchanged while keeping constant the lipid/peptide ratio, that is in our case as long as  $L/P = 10$  and therefore our structural and “functional” data (binding and lipid mixing) will be kinetically comparable.

Such a description of the kinetics of the binding and fusion processes together with that of the conformational changes involved is presented here for the first time. The resulting picture is in agreement with the fact, extensively described in previous works (23–33, 40), that at lipid/peptide ratios at which fusion takes place, the dominant peptide structure is  $\beta$  aggregated. On the other hand, helical structures have been described to form at high lipid/peptide ratios (23–33,

40) or other nonfusogenic conditions. The occurrence of such structures is compatible with the spectroscopic FTIR band detected in our work at around  $1648\text{ cm}^{-1}$ , early in the interaction of FP23-H with the model membranes, but also when the peptides (specially FP23-H) are dissolved in water.

The relevant fact is that, for the lipid mixing to take place, the peptides must undergo a conformational transition from helical + unordered into aggregated  $\beta$  structures, a transition which depends on the interaction with the membrane. On the other hand, this interaction with the membrane under fusogenic conditions implies a perturbation of the lipid-water interface, as the analysis of the FTIR spectra in the carbonyl region has shown (Figure 8). The interaction of the peptide would cause a certain degree of dehydration at the interface, a fact that would facilitate the fusion event. Such a dehydrating effect has been previously described for the N-terminal of the canine distemper virus fusion protein (60).

It is important to mention that formation of helical structures for the FP23 sequence at fusogenic lipid/peptide ratios has been described when the peptides' stock solutions are kept in HFIP (67, 68). In this case, no formation of aggregated  $\beta$  is detected, but no data on the fusion capacity of the peptide dissolved in this solvent has been reported.

As Nir and Nieva (58) have pointed out, the fusion process must satisfy at least two requirements: (1) aggregation of the particles and a close apposition of the membranes and (2) a transitional destabilization of the bilayers. The data reported in the present paper (Figure 7) shows that vesicle aggregation and membrane destabilization (measured as vesicle leakage) both are effects concomitant to membrane fusion.

Finally we would like to point out that the importance of the protonation state of the N-terminal residue of the HIV fusion peptide evidenced in the present study should encourage future work directed to elucidate the protonation state in the native protein, since it is clear that this together with the role of other positive charges in the same fusion peptide (Arg22) or close to the fusion sequence (Arg31) can be an important factor in defining the molecular mechanism by which the virus enters the target cell.

#### ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Xavier León for his helpful assistance with the computer program for FTIR time-dependent measurements and Dr. Ramon Barnadas for his help using the ultrafine particle analyzer.

#### REFERENCES

- Dutch, R. E., Jardetzky, T. S., and Lamb, R. A. (2000) Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis, *Biosci. Rep.* 20, 597–612.
- LeDuc, D. L., and Shin, Y. K. (2000) Insights into a structure-based mechanism of viral membrane fusion, *Biosci. Rep.* 20, 557–70.
- Doms, R. W., and Moore, J. P. (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity, *J. Cell Biol.* 151, F9–14.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S., and Blumenthal, R. (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction, *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 36–50.
- Gallo, S. A., Puri, A., and Blumenthal, R. (2001) HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process, *Biochemistry* 40, 12231–6.
- Turner, B. G., and Summers, M. F. (1999) Structural biology of HIV, *J. Mol. Biol.* 285, 1–32.
- Horvath, C. M., and Lamb, R. A. (1992) Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion, *J. Virol.* 66, 2443–55.
- Durell, S. R., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Shai, Y., and Blumenthal, R. (1997) What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review), *Mol. Membr. Biol.* 14, 97–112.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses, *Mol. Membr. Biol.* 16, 3–9.
- Freed, E. O., and Myers, D. J. (1992) Identification and characterization of fusion and processing domains of the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein, *J. Virol.* 66, 5472–8.
- Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchschacher, G. L., Jr., and Panganiban, A. T. (1992) A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 70–4.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein, *Cell* 89, 263–73.
- Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S., and Lu, M. (1997) Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12303–8.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41, *Nature* 387, 426–30.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin, *Annu. Rev. Biochem.* 69, 531–69.
- Tamm, L. K. (2003) Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion, *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 14–23.
- Tamm, L. K., Han, X., Li, Y., and Lai, A. L. (2002) Structure and function of membrane fusion peptides, *Biopolymers* 66, 249–60.
- Tamm, L. K., and Han, X. (2000) Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes, *Biosci. Rep.* 20, 501–18.
- Tatullian, S. A., and Tamm, L. K. (2000) Secondary structure, orientation, oligomerization, and lipid interactions of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin, *Biochemistry* 39, 496–507.
- Tatullian, S. A., Hinterdorfer, P., Baber, G., and Tamm, L. K. (1995) Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane fusion as determined by attenuated total reflection FTIR spectroscopy, *EMBO J.* 14, 5514–23.
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R., and Ruysschaert, J. M. (1993) Orientation and structure of the NH2-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes, *Biochim. Biophys. Acta* 1145, 124–33.
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Mandieau, V., Nielsen, N. M., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruysschaert, J. M., and Vandenbranden, M. (1991) Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH2 terminal domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 872–9.
- Martin, I., Dubois, M. C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., and Ruysschaert, J. M. (1994) Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH2-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study, *J. Virol.* 68, 1139–48.
- Martin, I., Dubois, M. C., Saermark, T., Epanand, R. M., and Ruysschaert, J. M. (1993) Lysophosphatidylcholine mediates the mode of insertion of the NH2-terminal SIV fusion peptide into the lipid bilayer, *FEBS Lett.* 333, 325–30.
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A., and Ruysschaert, J. M. (1996) Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer, *J. Virol.* 70, 298–304.
- Martin, I. I., Ruysschaert, J., and Epanand, R. M. (1999) Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38, 233–55.
- Pereira, F. B., Goni, F. M., Muga, A., and Nieva, J. L. (1997) Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced



- by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects, *Biophys. J.* 73, 1977–86.
28. Pereira, F. B., Goni, F. M., and Nieva, J. L. (1995) Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution, *FEBS Lett.* 362, 243–6.
  29. Pereira, F. B., Goni, F. M., and Nieva, J. L. (1997) Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 1203–11.
  30. Pereira, F. B., Valpuesta, J. M., Basanez, G., Goni, F. M., and Nieva, J. L. (1999) Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates, *Chem. Phys. Lipids* 103, 11–20.
  31. Nieva, J. L., and Agirre, A. (2003) Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion?, *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 104–15.
  32. Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F. M., and Wilschut, J. (1994) Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage, *Biochemistry* 33, 3201–9.
  33. Martin, I., and Ruysschaert, J. M. (2000) Common properties of fusion peptides from diverse systems, *Biosci. Rep.* 20, 483–500.
  34. Maddox, M. W., and Longo, M. L. (2002) Conformational partitioning of the fusion peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs in bilayer membranes, *Biophys. J.* 83, 3088–96.
  35. Yang, J., and Weliky, D. P. (2003) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for parallel and antiparallel strand arrangements in the membrane-associated HIV-1 fusion peptide, *Biochemistry* 42, 11879–90.
  36. Yang, J., Parkanzky, P. D., Khunte, B. A., Canlas, C. G., Yang, R., Gabrys, C. M., and Weliky, D. P. (2001) Solid-state NMR measurements of conformation and conformational distributions in the membrane-bound HIV-1 fusion peptide, *J. Mol. Graphics Modell.* 19, 129–35.
  37. Bradshaw, J. P., Darkes, M. J., Harroun, T. A., Katsaras, J., and Epanand, R. M. (2000) Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffraction, *Biochemistry* 39, 6581–5.
  38. Colotto, A., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Sen, A., Ihu, S. W., and Epanand, R. M. (1996) Structural study of the interaction between the HIV fusion peptide and model membranes, *Biochemistry* 35, 980–9.
  39. Colotto, A., and Epanand, R. M. (1997) Structural study of the relationship between the rate of membrane fusion and the ability of the fusion peptide of influenza virus to perturb bilayers, *Biochemistry* 36, 7644–51.
  40. Suarez, T., Gallaher, W. R., Agirre, A., Goni, F. M., and Nieva, J. L. (2000) Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion, *J. Virol.* 74, 8038–47.
  41. Yang, J., Gabrys, C. M., and Weliky, D. P. (2001) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide, *Biochemistry* 40, 8126–37.
  42. Yang, J., Prorok, M., Castellino, F. J., and Weliky, D. P. (2004) Oligomeric beta-structure of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide formed from soluble monomers, *Biophys. J.* 87, 1951–63.
  43. Yang, R., Yang, J., and Weliky, D. P. (2003) Synthesis, enhanced fusogenicity, and solid-state NMR measurements of cross-linked HIV-1 fusion peptides, *Biochemistry* 42, 3527–35.
  44. Aloia, R. C., Tian, H., and Jensen, F. C. (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5181–5.
  45. Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochim. Biophys. Acta* 858, 161–8.
  46. Wall, J., Ayoub, F., and O'Shea, P. (1995) Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface, *J. Cell Sci.* 108 (Part 7), 2673–82.
  47. Golding, C., Senior, S., Wilson, M. T., and O'Shea, P. (1996) Time resolution of binding and membrane insertion of a mitochondrial signal peptide: correlation with structural changes and evidence for cooperativity, *Biochemistry* 35, 10931–7.
  48. Struck, D. K., Hoekstra, D., and Pagano, R. E. (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion, *Biochemistry* 20, 4093–9.
  49. Ellens, H., Bentz, J., and Szoka, F. C. (1985) H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes, *Biochemistry* 24, 3099–106.
  50. Barnadas Rodriguez, R., and Sabes Xamani, M. (2003) Liposomes prepared by high-pressure homogenizers, *Methods Enzymol.* 367, 28–46.
  51. Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1991) Beware of proteins in DMSO, *Biochim. Biophys. Acta* 1078, 231–5.
  52. Cladera, J., and O'Shea, P. (2001) Generic Techniques for Fluorescence Measurements of Protein–Ligand Interactions; Real Time Kinetics and Spatial Imaging, in *Protein–Ligand Interactions: structure and spectroscopy* (Harding, S. E., and Chowdhry, B. Z., Eds.) pp 169–200, Oxford University Press, Oxford.
  53. Wall, J., Golding, C. A., Van Veen, M., and O'Shea, P. (1995) The use of fluoresceinphosphatidylethanolamine (FPE) as a real-time probe for peptide-membrane interactions, *Mol. Membr. Biol.* 12, 183–92.
  54. Cladera, J., Martin, I., and O'Shea, P. (2001) The fusion domain of HIV gp41 interacts specifically with heparan sulfate on the T-lymphocyte cell surface, *EMBO J.* 20, 19–26.
  55. Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvoluted FTIR spectra, *Biopolymers* 25, 469–87.
  56. Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Perez, A., Griebenow, K., Cao, X., and Nafie, L. A. (2003) The structure of tri-proline in water probed by polarized Raman. Fourier transform infrared, vibrational circular dichroism, and electric ultraviolet circular dichroism spectroscopy, *Biopolymers* 71, 558–68.
  57. Schweitzer-Stenner, R., Eker, F., Huang, Q., and Griebenow, K. (2001) Dihedral angles of trialanine in D<sub>2</sub>O determined by combining FTIR and polarized visible Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9628–33.
  58. Nir, S., and Nieva, J. L. (2000) Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion, *Prog. Lipid Res.* 39, 181–206.
  59. Saez-Cirion, A., and Nieva, J. L. (2002) Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide, *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 57–65.
  60. Aranda, F. J., Teruel, J. A., and Ortiz, A. (2003) Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study, *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 51–8.
  61. Mantsch, H. H., and McElhaney, R. N. (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy, *Chem. Phys. Lipids* 57, 213–26.
  62. Kliger, Y., Aharoni, A., Rapaport, D., Jones, P., Blumenthal, R., and Shai, Y. (1997) Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion. Structure-function study, *J. Biol. Chem.* 272, 13496–505.
  63. Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W., and Shai, Y. (1999) Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes, *Biochemistry* 38, 11359–71.
  64. Cladera, J., Martin, I., Ruysschaert, J. M., and O'Shea, P. (1999) Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the human immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential, *J. Biol. Chem.* 274, 29951–9.
  65. Ugolini, S., Mondor, I., and Sattentau, Q. J. (1999) HIV-1 attachment: another look, *Trends Microbiol.* 7, 144–9.
  66. Bentz, J., and Mittal, A. (2003) Architecture of the influenza hemagglutinin membrane fusion site, *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 24–35.
  67. Mobley, P. W., Waring, A. J., Sherman, M. A., and Gordon, L. M. (1999) Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs, *Biochim. Biophys. Acta* 1418, 1–18.
  68. Gordon, L. M., Mobley, P. W., Pilpa, R., Sherman, M. A., and Waring, A. J. (2002) Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using <sup>13</sup>C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1550, 96–120.

BI050382R



## Effect of Cholesterol on the Interaction of the HIV GP41 Fusion Peptide with Model Membranes. Importance of the Membrane Dipole Potential

Víctor Buzón and Josep Cladera\*

Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

**Accepted in Biochemistry under minor revisions**

**ABSTRACT:** Fusion of viral and cell membranes is a key event in the process by which the human immunodeficiency virus (HIV) enters the target cell. Membrane fusion is facilitated by the interaction of the viral gp41 fusion peptide with the cell membrane. Using synthetic peptides and model membrane systems it has been established that the sequence of events implies the binding of the peptide to the membrane, followed by a conformational change (transformation of unordered and helical structures into  $\beta$ -aggregates) which precedes lipid mixing. It is known that this process can be influenced by the membrane lipid composition. In the present work we have undertaken a systematic study in order to determine the influence of cholesterol (abundant in the viral membrane) in the sequence of events leading to lipid mixing. Besides its effect on membrane fluidity, cholesterol can affect a less known physical parameter, the membrane dipole potential. Using the dipole potential fluorescent sensor di-8-ANEPPS together with other biophysical techniques, we show that cholesterol increases the affinity of the fusion peptide for the model membranes and although it lowers the extent of lipid mixing it increases the mixing rate. The influence of cholesterol on the peptide affinity and the lipid mixing rate are shown to be mainly due to its influence of the membrane dipole potential, whereas the lipid mixing extent and peptide conformational changes seem to be more dependent on other membrane parameters such as membrane fluidity and hydration.

Enveloped viruses employ fusion proteins to enter and infect target cells (1, 2). In HIV-1 the fusion protein (glycoprotein gp41) is non-covalently linked to the glycoprotein gp120, forming the so called envelope (Env) glycoprotein complex (3), which seems to be assembled in the viral membrane forming trimers (4). The first step in the sequence of events leading to virus entry into the target cell is the binding of gp120 to the CD4 receptor on T-lymphocytes membranes. The interaction gp120 with members of the chemokine receptors family, acting as co-receptors, is also necessary for successful infection (5). Receptor recognition is followed by a structural reorganization of the Env complex, which makes possible the interaction of the amino-terminus of gp41 with the target cell membrane (6). The amino terminus of gp41 contains the fusion peptide (FP), a 16-23 residues long sequence, highly hydrophobic and rich in glycine and alanine residues (7). The interaction of this peptide with the cell membrane is essential for

viral and cell membrane fusion to take place since it has been shown that mutations in its sequence completely inhibit the fusion process (8-11).

The crystal structure of the gp41 ectodomain has been solved, showing that the protein is organized as a trimer (12-14). However, the protein in the crystals lacks the amino terminal fusion peptide because of its hydrophobicity. Due to this fact, data on the structure of the peptide and the mechanisms by which the fusion peptide triggers membrane fusion have been obtained using synthetic fusion sequences and model membranes (15). These studies have revealed that the fusion process implies the formation of  $\beta$ -pleated structures (16-21). In a recent study we have shown that the transformation of unordered plus helical structures into  $\beta$ -pleated structures takes place upon membrane binding and precedes lipid mixing (16).

Membrane lipid composition is an important factor when considering HIV fusion peptide-

membrane interactions. It is well known that the viral membrane is rich in cholesterol (22, 23) and it seems that budding of the viral particles from the infected cells takes place through the cell membrane microdomains known as rafts (24-26). The presence of cholesterol in membranes is usually interpreted in terms of its influence on membrane fluidity. But cholesterol, as a molecular dipole can influence another, less known, physical parameter in the lipid bilayer: the membrane dipole potential. In the last few years the influence of the dipole potential on several biological systems has been reported (27-35). This membrane potential is generated by the presence of electrical dipoles on the phospholipid molecules and the presence of oriented water molecules at the membrane-water interface (36). In the case of viral fusion peptides there is some scarce evidence that the magnitude of the membrane dipole potential can affect the extent of the fusion process (37). The magnitude of the membrane dipole potential can be modulated in model membranes using, besides cholesterol, other sterols, such as 6-ketocholestanol and phloretin (38, 39).

In the present work we have studied how cholesterol and 6-ketocholestanol affect the interaction of a 23 residues long HIV fusion peptide with model membranes and which events leading to membrane fusion (binding to the membranes, conformational changes and lipid mixing) can be related to changes in the magnitude of the dipole potential. The approach based on the combined use of fluorescence and infrared spectroscopies shows that the interaction of the fusion peptide with model membranes is affected by the magnitude of membrane dipole potential. The affinity of the fusion peptide is higher for model membranes with higher values of the dipole potential (more positive towards the centre of the membrane). Increasing the magnitude of the dipole potential increases as well the lipid mixing rate. Variations on the extent of the conformational changes associated to membrane binding and fusion and lipid mixing extent are however shown to be dependent upon other membrane properties such as the membrane fluidity and membrane hydration.

## MATERIALS AND METHODS

*Materials.* Egg phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were purchased from Avanti Polar Lipids. Cholesterol (CHOL), 6-ketocholestanol (6-KC) and reduced

Triton X-100 were purchased from Sigma. Fluorescein-phosphatidylethanolamine (FPE), N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) phosphatidylethanolamine (Rh-PE), N-(Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) phosphatidylethanolamine (NBD-PE) and 1-(3-sulfonatopropyl)-4-[ $\beta$ [2-(di-*n*-octylamino)-6-naphthyl]vinyl] pyridinium betaine (Di-8-ANEPPS) were purchased from Molecular Probes. Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO) (spectroscopy grade) was purchased from Merck. All other reagents were of analytical grade.

*Peptide Synthesis.* The sequence corresponding to the N-terminus of the HIV-1 gp41 protein were synthesized using chloride as a counter-ion and purified (estimated homogeneity >90%) by Jerini Peptide Technologies (Berlin, Germany). Peptide stock solutions were prepared in deuterated dimethylsulfoxide. The sequence was:

FP23H: H-  
AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS-CONH<sub>2</sub>

*Preparation of Large Unilamellar Vesicles (LUVs).* Large unilamellar lipid vesicles were prepared according to Mayer et al. (40). Phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and cholesterol (all in chloroform) or 6-ketocholestanol (in methanol) when required, were mixed in a round bottom flask and dried under a stream of nitrogen gas by rotary evaporation until a thin film of lipids was formed. The film was resuspended in buffer (10 mM Tris pH 7.5 for fluorescence experiments or 10 mM HEPES pD 7.5 for infrared measurements) and then frozen and thawed 5 times. Finally the vesicle suspension was extruded 10 times through two polycarbonate filters of pore size 100 nm using a Liposofast Extruder. Liposomes were always 100 nm in diameter according to control measurements carried out with a Ultrafine Particle Analyzer (data not shown).

*Labeling of LUVs with FPE and Di-8-ANEPPS.* LUVs were labeled exclusively in the outer bilayer leaflet with the surface potential sensor fluorescein-phosphatidylethanolamine (FPE) as described (16). Briefly, the unilamellar vesicles were incubated with FPE dissolved in ethanol (never more than 0.1% of the total aqueous volume) at 37 °C for 1 h in the dark. Any remaining unincorporated FPE was removed by gel filtration on a PD10 Sephadex

G-25 column (Amersham Biosciences) equilibrated with the appropriate buffer. Such a procedure leads to the incorporation of 30-50% of the externally added FPE to the preformed membrane vesicle. Furthermore, there was no observed transmembrane flipping of the FPE, at least over time scales of 1 week. The FPE-liposomes were stored at 4 °C until use. LUVs were labeled with the dipole potential fluorescent sensor Di-8-ANEPPS [1-(3-sulfonatopropyl)-4-(β(2-(di-n-octylamino)-6-naphthyl) vinyl) pyridinium betaine] by adding the dye at a final concentration of 8 μM (from a stock solution in ethanol) into a cuvette containing LUVs at a final concentration of 300 μM. LUVs were incubated overnight at 37 °C in the dark with the dye to ensure its complete labeling.

*Fluorescence measurements with FPE-labelled membranes.* Fluorescence time courses of FPE-labelled vesicles were measured after adding the desired amount of peptide into 2 ml of lipid suspensions (300 μM lipid) with a SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set at 490 and 520 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C. The contribution of light scattering to the fluorescence signals was measured in experiments without the dye and was subtracted from the fluorescence traces. Data were fitted to a sigmoidal binding model (41) using the equation:

$$F = (F_{\max} \cdot [FP])^n / (K_d^n + [FP])^n \quad (\text{Eq. 1})$$

where,  $F$  is the Fluorescence variation,  $F_{\max}$  the maximum fluorescence variation,  $[FP]$  the fusion peptide concentration,  $K_d$  the dissociation constant of the membrane binding process and  $n$  the Hill coefficient. The experimental points shown in the figures are the mean value of two measurements. In experiments with FPE-labeled membranes with membranes supplemented with 6-KC or Cholesterol particular attention was paid to the fact that the initial fluorescence level was the same as for the control membranes (PC/PE membranes) in order to have an indication that the additives were not affecting the magnitude of the surface potential (membrane surface electronegativity).

*Fluorescence measurements with Di-8-ANEPPS-labelled membranes.* Di-8-ANEPPS excitation spectra were obtained by exciting the vesicles suspension at 460 nm and collecting

their emission at 580 nm. Dual-wavelength recordings with the Di-8-ANEPPS dye were obtained by exciting the samples at two different wavelengths (430 and 510 nm) and measuring their emission intensity ratio,  $R_{(430/510)}$ , at 580 nm (42, 43). Any contribution of light-scattering to the fluorescence signals was corrected from identical recordings with unlabeled membranes. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C.

*Lipid mixing measurements.* Lipid mixing experiments were carried out by measuring the fluorescence intensity change resulting from the fluorescence resonance energy transfer (FRET) between NBD-PE and Rh-PE, inserted into the lipid bilayer, as described by Struck et al. (44). Fluorescence was monitored by using an SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Vesicles were prepared as described above except that the dyes were added into the initial organic lipid solution. Vesicles containing both dyes at 0.6 mol% each were mixed with dye-free vesicles (1:9 molar ratio) at a final lipid concentration of 300 μM. The initial fluorescence of the labeled/unlabeled vesicle suspension was taken as 0% lipid mixing, and the 100% lipid mixing was determined by adding reduced (to eliminate quenching of the NBD probe) Triton X-100 at a final concentration of 0.1% (v/v). The excitation wavelength was 465 nm and emission wavelength 530 nm. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 20 °C. The experimental points shown in the figures are the mean value of two measurements. In all cases particular attention was paid to the initial level of fluorescence in lipid mixing experiments in order to ensure that the initial fluorescence was the same for the different membrane compositions. This allowed us to rule out any lipid mixing previous to the one due to the peptide, coming from, for example, the presence of cholesterol in the bilayer.

*Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements.* FTIR spectra were recorded at 20 °C on a FTIR-Mattson Polaris spectrometer, equipped with a cooled nitrogen-cadmium-telluride (MCT) detector, at a nominal resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. The spectrometer was continuously purged with dry air (dew point lower than -60 °C). The spectra were corrected for atmospheric water vapour contribution. For time-resolved experiments vesicles from stock solutions in deuterated buffer and the FP23H peptide from a stock solution in DMSO were mixed to give a lipid-to-peptide ratio of 10 and

immediately placed between two CaF<sub>2</sub> windows separated with a 50  $\mu\text{m}$  spacer. 20 scans were collected and averaged using a shuttle device every 110 seconds for 1 hour. The concentration of the lipid vesicles was kept around 10 mM and the concentration of FP23H around 1 mM.

For the analysis of the carbonyl lipid band, 500 spectra were collected and averaged using a shuttle device. The lipid concentration was 10 mM. Spectra were corrected for solvent contribution. Component band curve-fittings were carried out using the program Grams (Galactic Inc.).

## RESULTS.

*Modulation of LUVs' membrane dipole potential by cholesterol and 6-ketocholestanol.* Variations in the magnitude of the membrane dipole potential can be monitored using the fluorescent sensor di-8-ANEPPS. Changes in the total membrane dipole moment are known to cause a shift in the excitation spectrum maximum of the dye, which is usually measured as an excitation difference spectrum. In agreement with previous reports (45), the difference excitation spectra shown in Figure 1A reveal that both cholesterol and 6-ketocholestanol increase the magnitude of the membrane dipole potential in PC/PE membranes. The maximum around 430–450 nm and the minimum around 510 nm are a consequence of the blue shift caused in the excitation spectra of Di-8ANEPPS when the dipole potential is made more positive towards the centre of the bilayer. By exciting the membrane suspensions at the two different wavelengths corresponding to the maximum and the minimum of the difference spectrum, a fluorescence intensity ratio  $R$  can be calculated. This ratio can be used as a measure of the relative changes in the magnitude of the dipole potential: the higher  $R$  the more positive the dipole potential towards the center of the bilayer (38, 43, 46). In Figure 1B the values of the fluorescence intensity ratio  $R$  as a function of the different membrane compositions used throughout the present work is shown.

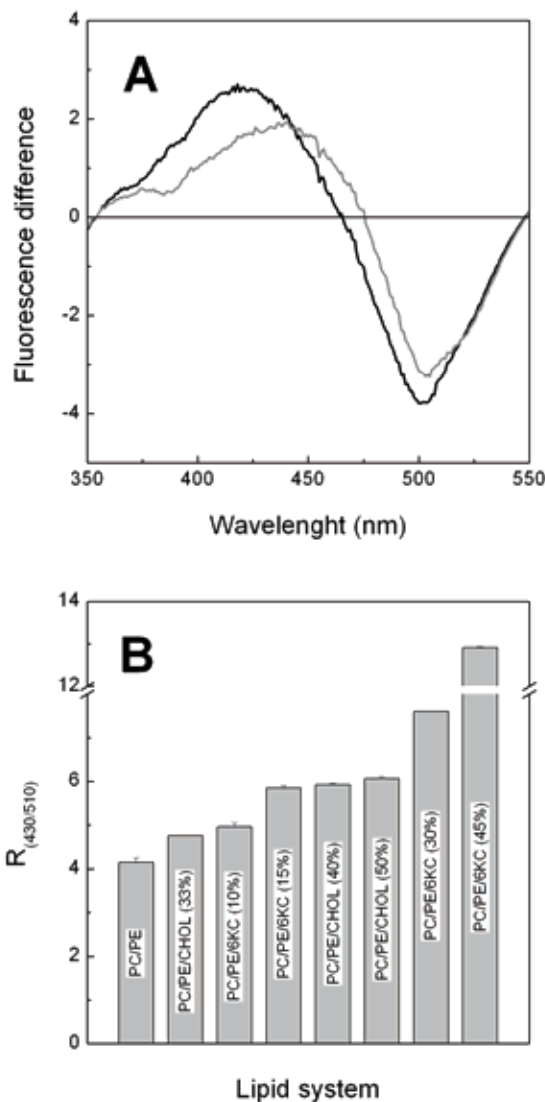


FIGURE 1. (A) Fluorescence difference excitation spectra of Di-8-ANEPPS labeled PC/PE liposomes containing 15 mol% 6-KC, minus the excitation spectrum of PC/PE (1:1) liposomes (gray line) and excitation spectra of PC/PE liposomes containing 50 mol% CHOL minus the excitation spectrum of liposomes without CHOL (black line). (B) Dependence of the magnitude of the dipole potential, expressed as the fluorescence ratio  $R_{(430/510)}$ , on membrane composition. The mol% of CHOL or 6-KC is indicated in brackets.

*Effect of cholesterol and 6-ketocholestanol on the binding of the fusion peptide to PC/PE model membranes.* Binding of the fusion peptide to model membranes was monitored using the fluorescent probe fluorescein-phosphatidylethanolamine (FPE), which is sensitive to changes in the electrostatic surface potential (41). The interaction of the positively charged peptide with the membrane resulted in

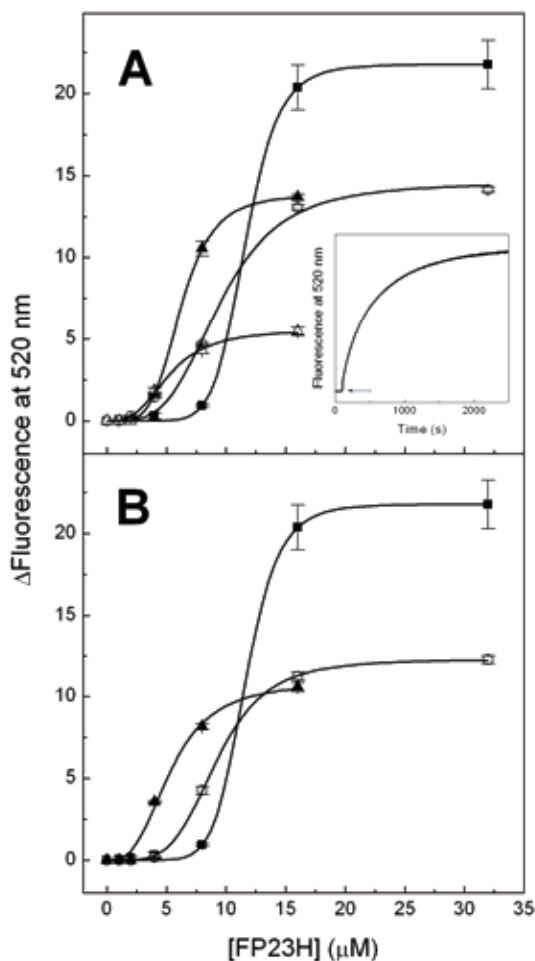


FIGURE 2. Binding of the fusion peptide to FPE-labeled-vesicles. The binding curves were derived from the time course fluorescence variations caused by addition of FP23H to PC/PE FPE-labeled-membranes (panel A inset: addition of FP23H at final concentration of 30  $\mu$ M to FPE-labeled-membranes, indicated by the arrow). (A) PC/PE membranes containing 0 mol% 6-KC (filled squares), 10 mol% 6-KC (open circles), 15 mol% 6-KC (filled triangles), 30mol% 6KC (open triangles). (B) PC/PE membranes containing 0 mol% CHOL (filled squares), 33 was 20° C. The buffer was 10 mM Tris pH 7,5. The solid line represents the best fits using equation 1. Each data point in the binidng curve is the mean value of two independent determinations (two independent binding curves) and the error bars correspond to the standard deviation.

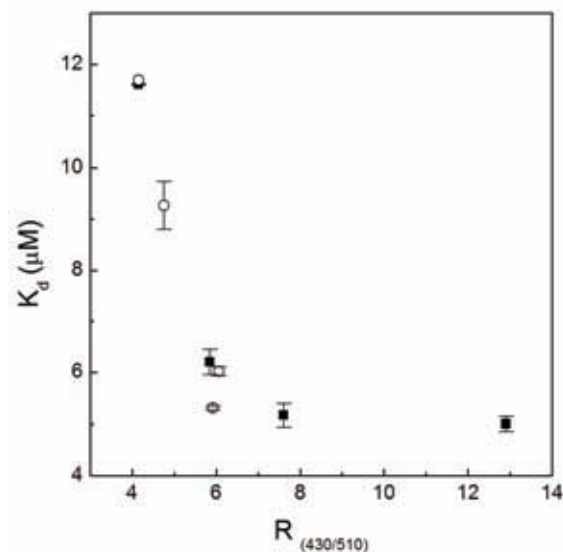


FIGURE 3. Fluorescence ratio  $R=I_{430}/I_{510}$  as a function of the dissociation constants derived from Figure 2. Different percentages of 6-KC (filled squares) and CHOL (open circles) in the membranes has been converted into the corresponding R value using Fig. 1B.  $K_d$  values have been calculated as the mean value from two independent fittings to equation 1 of the two experimental binding curves available (see Fig. 2 legend) for each membrane composition. Errors bars are the standad error. Fitting of the experimental points to equation 1 was highly reproducible: regression coefficient was  $R=0.99$  in all cases and the mathematical (fitting) errors in the calculation of the dissociation constant from the fittings were as in the following examples:  $K_d(\text{PC/PE})=11.6\pm 0.2$ ;  $K_d(10\%\text{KC})=9.5\pm 0.61$ ;  $K_d(15\%\text{KC})=6.2\pm 0.02$ ;  $K_d(30\%\text{KC})=5.2\pm 0.32$ ;  $K_d(33\%\text{ chol})=9.24 \pm 0.06$ ;  $K_d(40\%\text{chol})=5.3\pm 0.4$ .

an increase of the fluorescence intensity of FPE, as shown in Figure 2A (inset), which is consistent with an increase in the electropositivity of the surface potential. The cumulative changes of fluorescence intensity represented as a function of peptide concentration (binding curves) are shown in Figure 2A (effect of 6-ketocholestanol) and 2B (effect of cholesterol). In all cases the binding data fit equation 1, a sigmoid which can imply some degree of cooperativity in the binding process (41).

One interpretation of this cooperativity is that perhaps the initial membrane contacts involve interactions between more than one peptide molecules (the number of peptide molecules involved would be given by the Hill coefficient,  $n$ ) (41). Nevertheless, it is not possible to simply establish a direct link between this cooperativity and the known formation of

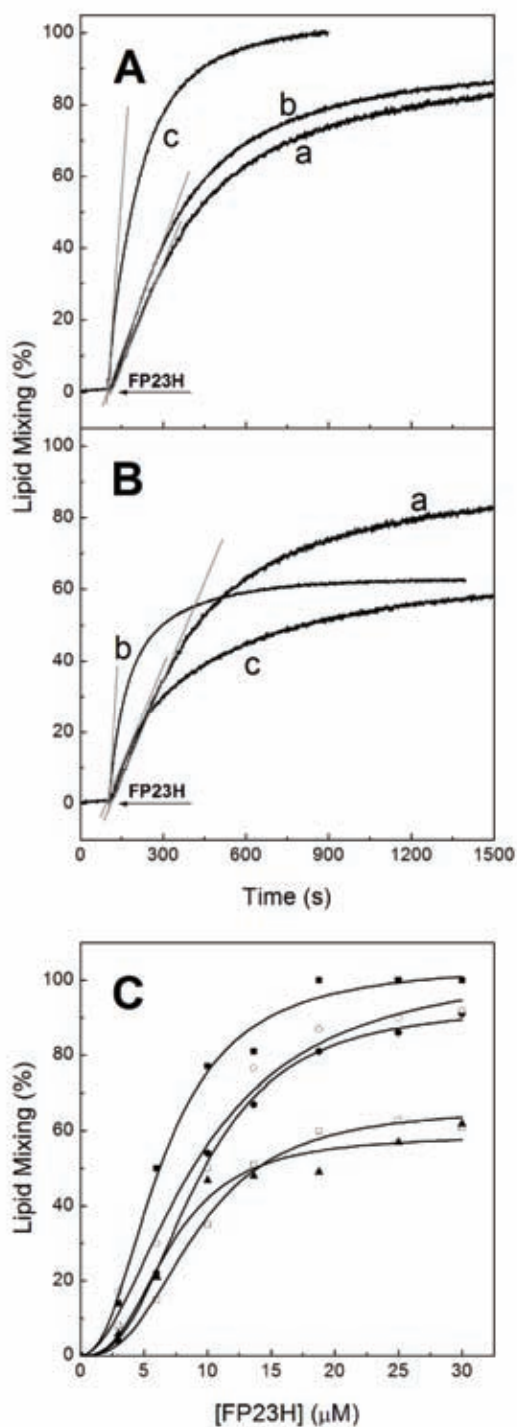


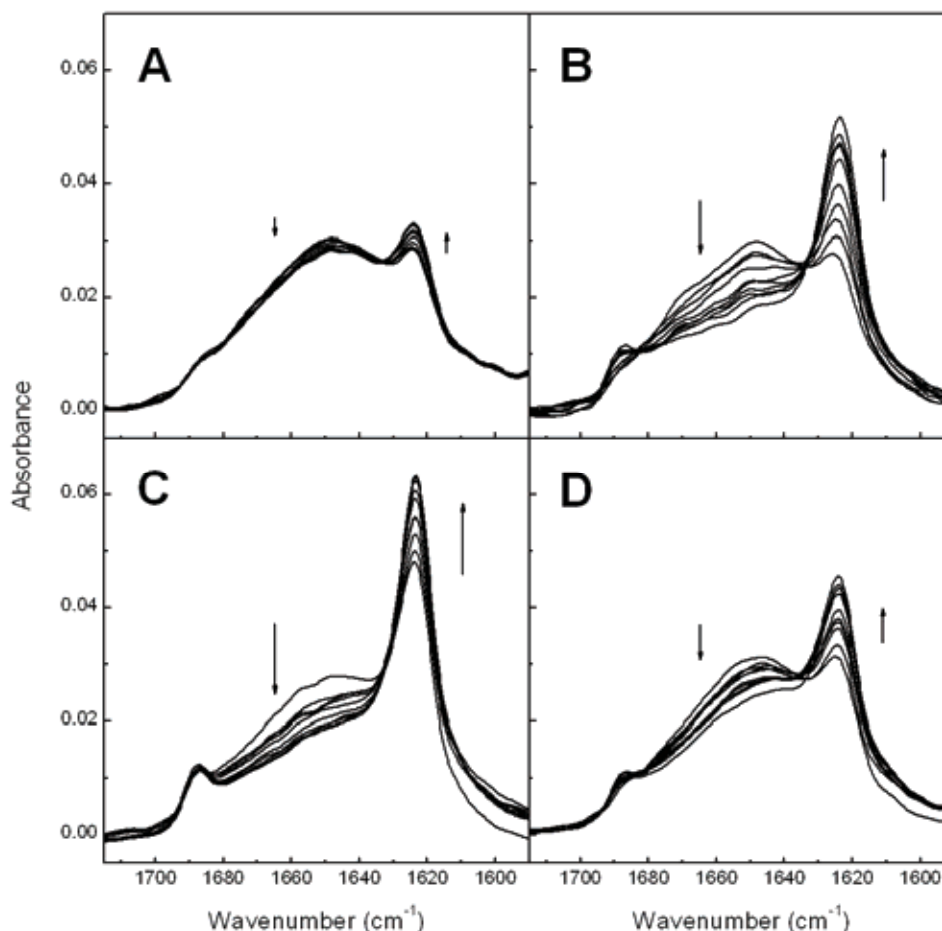
FIGURE 4. Lipid mixing time course induced by addition of FP23H at a final ( $30 \mu\text{M}$  final concentration) to membrane suspensions supplemented either with 6-KC or CHOL. (A) (a) PC/PE, (b) PC/PE and 15 mol% 6-KC and (c) PC/PE and 30 mol% 6-KC; (B) (a) PC/PE, (b) PC/PE and 33 mol% CHOL and (c) PC/PE and 50 mol% CHOL. (C) Percentage of lipid mixing induced by addition of FP23H to NBD/Rh-labeled membranes as a function of peptide concentration. Membrane composition was as follows: PC/PE (solid circles); PC/PE and 15 mol% 6-KC (open circles); PC/PE and 30 mol% 6-KC (solid squares); PC/PE and 40 mol% CHOL (open squares); PC/PE and 50 mol% CHOL (solid triangles).

gp41 oligomers on the viral and cell membranes (see ref. 16). The clear differences observed in the fluorescence intensities reached at the plateaus, depending on the membrane sterol content, correspond to different degrees of

PC and PE were equimolar in all model percentages at the plateaus), where the lipid mixing percentage has been plotted as a function of peptide concentration. Comparison of the curves plotted in Figure 4C with the binding curves shown in Figure 2, reveals that fusion surface potential disturbance caused by peptide binding. These differences could be due to a difference in the membrane binding capacity (number of peptide molecules bound per lipid molecule) although differences in the conformation of the bound peptides could also contribute to the observed fluorescence changes. On the other hand the binding curves reveal an unequivocal effect of the sterol content on the affinity of the peptide for the membrane. Both, cholesterol and 6-ketocholestanol cause a decrease in the value of the dissociation constant calculated using equation 1 (Figure 3). This increase in the affinity of the peptide for the membrane must be due to the increase in the magnitude of the dipole potential caused by the two sterols, since they have an opposite effect on other physico-chemical parameters, such as hydration or fluidity (see discussion).

*Effect of cholesterol and 6-ketocholestanol on membrane lipid mixing.* The peptide fusogenic capacity was monitored by measuring its ability to induce lipid mixing between model membranes composed of PC/PE (1:1) alone or supplemented with 6-ketocholestanol or cholesterol. The NBD fluorescence increase (decrease in energy transfer) as a consequence of the lipid mixing caused by the addition of the peptide, for different membrane lipid compositions at a lipid/peptide ratio of 10 is shown in Figure 4A and 4B. It can be deduced from the figure that 6-ketocholestanol increases both the rate and the extension of lipid mixing whereas the presence of cholesterol reduces the extent of lipid mixing and its influence on the mixing rate depends on the cholesterol molar percentage in the membrane. From these data a different influence of the dipole potential (mainly affecting the lipid mixing rate) and of the fluidity and/or hydration of the membrane (mainly affecting the lipid mixing extent) can be deduced (see discussion section). The different effect of cholesterol and 6-ketocholestanol on





**FIGURE 5.** Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of the FP23H peptide (1mM) in deuterated 10 mM Hepes buffer (A) and mixed with membrane suspensions (10 mM lipid) with the following compositions: (B) PC/PE; (C) PC/PE and 15 mol% 6-KC and (D) PC/PE and 50 mol% CHOL. Spectra were acquired as a function of time. Each spectrum is the average of 20 scans and the spectral contribution of buffer was always subtracted. One spectrum was collected every 110 s. Temperature was 20° C. The buffer was 10 mM Hepes pD 7.5. The series of spectra shown are representative of two independent measurements. Arrows indicate spectral regions where the intensity increases (↑) and decreases (↓).

the lipid mixing extent is also apparent from Figure 4C (maximum lipid extent is given by the takes place as binding occurs. In fact similar values of dissociation constant were obtained when fitting the data in Figure 4C to equation 1, compared to those derived from Figure 2.

*Effect of cholesterol and 6-ketocholestanol on the fusion peptide conformation upon interaction with the membrane.* In order to gain an insight on the structural changes taking place during the interaction of the fusion peptide with membranes, we monitored the secondary structure variations of FP23H as a function of time, in the absence and the presence of membranes of different lipid composition. The FTIR spectra obtained at a fusogenic

lipid/peptide ratio are shown in Figure 5 and are in general dominated by two main features: a band with a maximum at 1624  $\text{cm}^{-1}$ , characteristic of aggregated intermolecular  $\beta$ -structures and another band with a maximum centered around 1648  $\text{cm}^{-1}$ , which corresponds to a mixture of unordered and helical structures (47). The dilution of the peptide in aqueous buffer and the interaction with model membranes implies the transformation of unordered + helical structures into  $\beta$ -aggregated structures. These transformations become more apparent if we represent the ratio  $\text{Abs}_{1624}/\text{Abs}_{1648}$  as a function of time (Figure 6). According to the data and in agreement with previous reports (16) the presence of membranes favors the transformation of unordered + helical structures into  $\beta$ -sheet aggregates. Cholesterol up to 50%

does not affect much the amount of structures converted into  $\beta$ -sheet, a conversion which is however clearly enhanced by the presence of 15 mol% 6-ketocholestanol. Since 50 mol% cholesterol and 15 mol% 6-ketocholestanol cause a similar increase in the magnitude of the dipole potential of PC/PE membranes (see Figure 1B), the observed effect on the formation of  $\beta$ -structures would be rather caused by the increase in membrane fluidity and/or hydration due the presence of 6-ketocholestanol, rather than to the variation of the dipole potential.

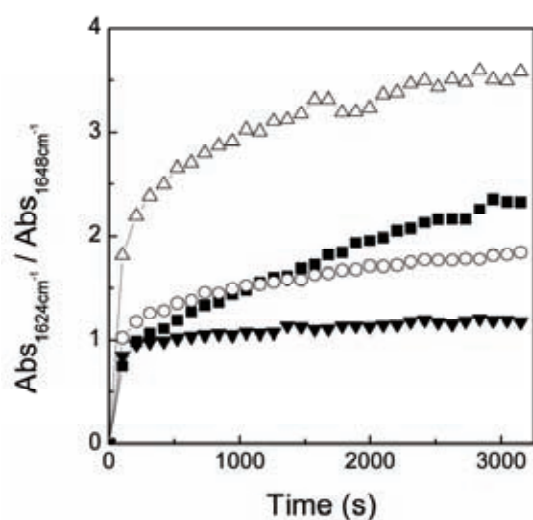


FIGURE 6. Kinetics of the structural changes illustrated in Figure 5. The transformation of helical + unordered structures into  $\beta$  aggregates has been plotted as the ratio  $Abs_{1624}/Abs_{1648}$  versus time: PC/PE vesicles (filled squares); PC/PE vesicles with 15 mol% 6-KC (up open triangles), PC/PE vesicles with 50 mol% CHOL (open circles); FP23H into buffer (down filled triangles). Each data point is the average of two independent experiments.

*Effect of cholesterol and 6-ketocholestanol on lipid hydration.* Since it has been previously established that the interaction of the 23 residues long HIV fusion peptide with model membranes causes a dehydration of the lipid-water interface (16, 19), we have measured how the presence of cholesterol or 6-ketocholestanol affects the hydration degree of the model membranes used in the present study. Figure 7 shows the phospholipid carbonyl region of the infrared spectra of PC/PE membranes containing different molar percentages of either cholesterol or 6-ketocholestanol. Three infrared bands are detected: one centered around  $1739\text{--}1744\text{ cm}^{-1}$ , which can be assigned to the stretching vibration of the dehydrated phospholipid carbonyls;

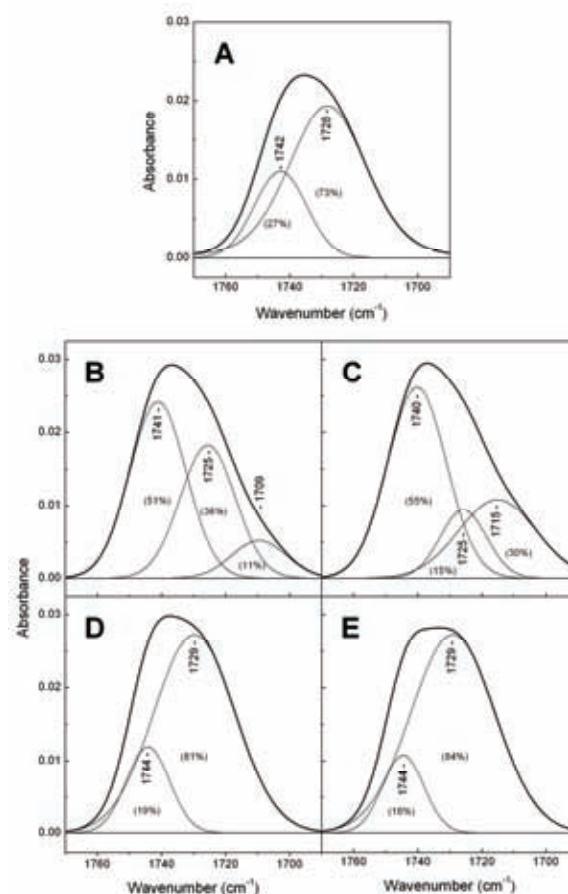


FIGURE 7. Ester carbonyl region of the FTIR spectra of (A) PC/PE (1:1) model membranes, (B) PC/PE with 15 mol% of 6-KC, (C) PC/PE with 30 mol% 6-KC, (D) PC/PE with 33 mol% CHOL and (E) PC/PE with 50 mol% CHOL. Component bands were fitted to the original spectra using Grams 3.2 (Galactic Inc.). Numbers in brackets indicate the percentage of the total carbonyl band corresponding to each component.

another one centered around  $1720\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ , assignable to phospholipid carbonyls which are hydrogen bonded to water molecules; and a third band at around  $1710\text{ cm}^{-1}$  which corresponds to dehydrated carbonyl groups (48, 49). It is clear from the figure that 6-ketocholestanol reduces the percentage of ester carbonyls hydrogen bonded to water molecules whereas cholesterol does increase the hydration of the lipid headgroups. In all cases, addition of the peptide to the membranes did cause a reduction in the level of hydration (data not shown) in agreement with previous observations (16).

## DISCUSSION

Cholesterol is an important component of the HIV envelope membrane, where the cholesterol/phospholipid ratio is around 0.9 (22, 23). It has been described that the use in vitro of

fluidizing agents, acting on the membrane cholesterol content, reduces HIV infection and replication (50-52). The relationship between cholesterol and membrane fluidity has been widely studied. Cholesterol, however is a molecule bearing a dipole moment and its presence in a lipid bilayer does influence one of the less well characterized physical parameters associated to biological membranes: the membrane dipole potential. The importance of this electrostatic potential is only recently becoming apparent in relation to some biological processes (27-35). In the case of fusion peptides, it has been previously described that variations in the magnitude of the dipole potential do affect the extension of the membrane fusion process triggered by a 12-residues long peptide from the simian immunodeficiency virus (37). In the present work, we undertook a more systematic study in order to determine which effects caused by cholesterol on peptide-membrane interactions, can be assigned either to variations in the magnitude of the dipole potential or to changes in other membrane parameters such as the level of hydration and membrane fluidity. The main objective was to study the influence of cholesterol in each one of the different peptide-membrane interaction events which have been kinetically described previously in Buzón et al. (16): membrane binding followed by a conformational change (transformation of helical plus unordered structures into  $\beta$  aggregates) which precedes lipid mixing. In order to distinguish the influence of the membrane dipole potential from the influence of hydration and membrane fluidity we have used cholesterol and 6-ketocholestanol as components of the model membranes described in Figure 1. Both compounds are known to increase the magnitude (making it more positive towards the center of the lipid bilayer) of the membrane dipole potential (Figure 1B and (42, 45)). Cholesterol however, increases the hydration of the lipid headgroups in the lipid bilayer (Figure 7) and decreases membrane fluidity, whereas 6-ketocholestanol does reduce membrane hydration (Figure 7) and increases membrane fluidity (53).

Our data show that an increase in the magnitude of the dipole potential (by adding either cholesterol or 6-ketocholestanol to the membranes) does reduce the dissociation constant of the binding process (Figures 2 and

3). Dipole potential does not seem to affect however the conformational transition (transformation of helical plus unordered structures into  $\beta$  aggregates) that follows membrane binding (Figure 6). Mol percentages of either cholesterol or 6-ketocholestanol causing an equivalent increase in the magnitude of the dipole potential (the same ratio R in Figure 1B) affect differently the conformational transition. The increase in the amount of  $\beta$ -aggregates formed in the presence of 15 mol% 6-ketocholestanol and the lack of effect observed when there is 50 mol% cholesterol in the membranes, must be related to the opposite influence of these compounds on membrane fluidity or hydration. Finally, both the extent and the kinetics of the lipid mixing process are affected by the presence of cholesterol and 6-ketocholestanol in the model membranes (Figure 4). It can be deduced that the increase in the magnitude of the dipole potential caused by either 6-ketocholestanol (15 and 30 mol%) or cholesterol 40 mol% does increase the lipid mixing rate (Fig 4 A and B). In the case of cholesterol however, if we further increase its membrane content to 50 mol% the effect on the lipid mixing rate seems to be reverted, getting back to the initial lipid mixing rate measured for the control (PC/PE membrane). The effect of cholesterol on the lipid mixing rate seems to have an optimum; once this optimum is exceeded other physical properties, such as membrane fluidity, may be taking over, balancing and finally overcoming the dipole potential effect. Lipid mixing extent, however seems to depend on parameters such as hydration and/or membrane fluidity, since 6-ketocholestanol increases lipid mixing whereas cholesterol does decrease it.

In conclusion, it is clear from our results that part of the importance of the presence of cholesterol in the HIV envelope membrane can be due to its influence on the magnitude of the membrane dipole potential. We have shown that an increase in the magnitude of this electrostatic potential can increase the affinity of the fusion peptide for the membrane and the lipid mixing rate. Other events in the membrane fusion process (conformational transitions, lipid mixing extent) seem to be dependent on other membrane parameters, such as membrane hydration and fluidity.

## ACKNOWLEDGMENT

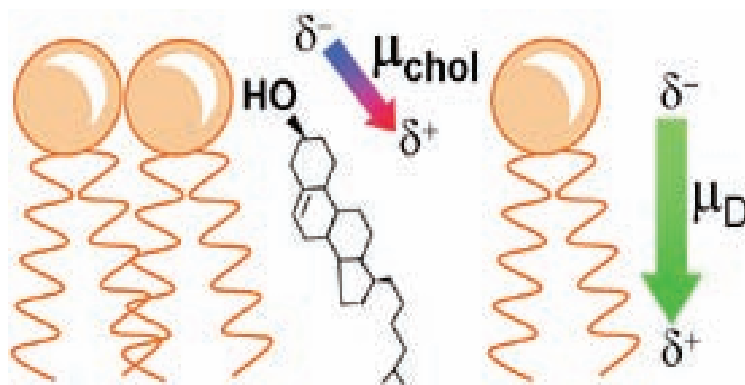
We are grateful to Dr. Tzvetana Lazarova for reading the manuscript and for her valuable suggestions.

## REFERENCES

- (1) Eckert, D. M., and Kim, P. S. (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70, 777-810.
- (2) Peisajovich, S. G., and Shai, Y. (2002) New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem Sci* 27, 183-90.
- (3) Veronese, F. D., DeVico, A. L., Copeland, T. D., Oroszlan, S., Gallo, R. C., and Sarngadharan, M. G. (1985) Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229, 1402-5.
- (4) Center, R. J., Leapman, R. D., Lebowitz, J., Arthur, L. O., Earl, P. L., and Moss, B. (2002) Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* 76, 7863-7.
- (5) Clapham, P. R., Reeves, J. D., Simmons, G., DeJucq, N., Hibbitts, S., and McKnight, A. (1999) HIV coreceptors, cell tropism and inhibition by chemokine receptor ligands. *Mol Membr Biol* 16, 49-55.
- (6) Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S., and Blumenthal, R. (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614, 36-50.
- (7) Tamm, L. K., and Han, X. (2000) Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. *Biosci Rep* 20, 501-18.
- (8) Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. (1990) Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4650-4.
- (9) Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchschacher, G. L., Jr., and Panganiban, A. T. (1992) A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 70-4.
- (10) Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O., and Bonifacino, J. S. (1996) Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 218, 94-102.
- (11) Bosch, M. L., Earl, P. L., Fagnoli, K., Picciafuoco, S., Giombini, F., Wong-Staal, F., and Franchini, G. (1989) Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* 244, 694-7.
- (12) Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263-73.
- (13) Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S., and Lu, M. (1997) Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12303-8.
- (14) Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387, 426-30.
- (15) Rafalski, M., Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (1990) Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry* 29, 7917-22.
- (16) Buzon, V., Padros, E., and Cladera, J. (2005) Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry* 44, 13354-64.
- (17) Sackett, K., and Shai, Y. (2003) How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J Mol Biol* 333, 47-58.
- (18) Sackett, K., and Shai, Y. (2005) The HIV Fusion Peptide Adopts Intermolecular Parallel beta-Sheet Structure in Membranes when Stabilized by the Adjacent N-Terminal Heptad Repeat: A (13)C FTIR Study. *J Mol Biol* 350, 790-805.
- (19) Saez-Cirion, A., and Nieva, J. L. (2002) Conformational transitions of

- membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim Biophys Acta* 1564, 57-65.
- (20) Yang, J., Gabrys, C. M., and Weliky, D. P. (2001) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry* 40, 8126-37.
- (21) Yang, J., and Weliky, D. P. (2003) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for parallel and antiparallel strand arrangements in the membrane-associated HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry* 42, 11879-90.
- (22) Aloia, R. C., Jensen, F. C., Curtain, C. C., Mobley, P. W., and Gordon, L. M. (1988) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 900-4.
- (23) Aloia, R. C., Tian, H., and Jensen, F. C. (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5181-5.
- (24) Viard, M., Parolini, I., Sargiacomo, M., Fecchi, K., Ramoni, C., Ablan, S., Ruscetti, F. W., Wang, J. M., and Blumenthal, R. (2002) Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* 76, 11584-95.
- (25) Liao, Z., Cimakasky, L. M., Hampton, R., Nguyen, D. H., and Hildreth, J. E. (2001) Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17, 1009-19.
- (26) Manes, S., del Real, G., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gomez-Mouton, C., Sanchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcami, J., Mira, E., and Martinez, A. C. (2000) Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* 1, 190-6.
- (27) Alakoskela, J. I., and Kinnunen, P. K. (2001) Control of a redox reaction on lipid bilayer surfaces by membrane dipole potential. *Biophys J* 80, 294-304.
- (28) Alakoskela, J. M., Soderlund, T., Holopainen, J. M., and Kinnunen, P. K. (2004) Dipole potential and head-group spacing are determinants for the membrane partitioning of pregnanolone. *Mol Pharmacol* 66, 161-8.
- (29) Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I., and Kotova, E. A. (1999) Effect of dipole modifiers on the kinetics of sensitized photoinactivation of gramicidin channels in bilayer lipid membranes. *Membr Cell Biol* 13, 111-20.
- (30) Hristova, K., Dempsey, C. E., and White, S. H. (2001) Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophys J* 80, 801-11.
- (31) Rokitskaya, T. I., Antonenko, Y. N., and Kotova, E. A. (1997) Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics. *Biophys J* 73, 850-4.
- (32) Rokitskaya, T. I., Kotova, E. A., and Antonenko, Y. N. (2002) Membrane dipole potential modulates proton conductance through gramicidin channel: movement of negative ionic defects inside the channel. *Biophys J* 82, 865-73.
- (33) Schagina, L. V., Gurnev, P. A., Takemoto, J. Y., and Malev, V. V. (2003) Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers. *Bioelectrochemistry* 60, 21-7.
- (34) Voglino, L., McIntosh, T. J., and Simon, S. A. (1998) Modulation of the binding of signal peptides to lipid bilayers by dipoles near the hydrocarbon-water interface. *Biochemistry* 37, 12241-52.
- (35) Zhang, L., Rozek, A., and Hancock, R. E. (2001) Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J Biol Chem* 276, 35714-22.
- (36) Brockman, H. (1994) Dipole potential of lipid membranes. *Chem Phys Lipids* 73, 57-79.
- (37) Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J. M., and O'Shea, P. (1999) Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential. *J Biol Chem* 274, 29951-9.
- (38) Franklin, J. C., and Cafiso, D. S. (1993) Internal electrostatic potentials in

- bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophys J* 65, 289-99.
- (39) Simon, S. A., McIntosh, T. J., Magid, A. D., and Needham, D. (1992) Modulation of the interbilayer hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface. *Biophys J* 61, 786-99.
- (40) Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* 858, 161-8.
- (41) Golding, C., Senior, S., Wilson, M. T., and O'Shea, P. (1996) Time resolution of binding and membrane insertion of a mitochondrial signal peptide: correlation with structural changes and evidence for cooperativity. *Biochemistry* 35, 10931-7.
- (42) Cladera, J., and O'Shea, P. (1998) Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide. *Biophys J* 74, 2434-42.
- (43) Gross, E., Bedlack, R. S., Jr., and Loew, L. M. (1994) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophys J* 67, 208-16.
- (44) Struck, D. K., Hoekstra, D., and Pagano, R. E. (1981) Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20, 4093-9.
- (45) Asawakarn, T., Cladera, J., and O'Shea, P. (2001) Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells. *J Biol Chem* 276, 38457-63.
- (46) Clarke, R. J. (1997) Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1327, 269-78.
- (47) Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-87.
- (48) Blume, A., Hubner, W., and Messner, G. (1988) Fourier transform infrared spectroscopy of  $^{13}\text{C} = \text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27, 8239-49.
- (49) Mantsch, H. H., and McElhaney, R. N. (1991) Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 57, 213-26.
- (50) Schaffner, C. P., Plescia, O. J., Pontani, D., Sun, D., Thornton, A., Pandey, R. C., and Sarin, P. S. (1986) Anti-viral activity of amphotericin B methyl ester: inhibition of HTLV-III replication in cell culture. *Biochem Pharmacol* 35, 4110-3.
- (51) Reimund, E. (1986) Envelope perturbation and AIDS. *Lancet* 2, 1159.
- (52) Sarin, P. S., Gallo, R. C., Scheer, D. I., Crews, F., and Lippa, A. S. (1985) Effects of a novel compound (AL 721) on HTLV-III infectivity in vitro. *N Engl J Med* 313, 1289-90.
- (53) Auner, B. G., O'Neill, M. A., Valenta, C., and Hadgraft, J. (2005) Interaction of phloretin and 6-ketocholestanol with DPPC-liposomes as phospholipid model membranes. *Int J Pharm* 294, 149-55.



Voldria agrair de manera molt especial a la “Fundació La Marató de TV3” (Exp. 020410) que ha finançat aquest treball.

També voldria donar les gràcies...

Al meu director, el Dr. Josep Cladera,  
per la seva ajuda i dedicació constants

i a tots aquells que han contribuït,  
d'una manera o altra  
tant dins com a fora del laboratori,  
a la realització d'aquesta Tesi