

INFLUÈNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR EN LA INTERACCIÓ DE MACROMOLÈCULES AMB BIOMEMBRANES

JOSEP CLADERA¹ I PAUL O'SHEA²

¹*Unitat de Biofísica. Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona.*

²*Cell Biophysics Group. Departament de Ciències Biomèdiques. Universitat de Nottingham Regne Unit.*

Adreça per a la correspondència: Josep Cladera. Unitat de Biofísica. Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra. Adreça electrònica: Josep.Cladera@uab.es.

Paraules clau: Potencial dipolar, membrana, bicapa lipídica, moment dipolar, pèptid.

Keywords: Dipole potential, membrane, lipidic bilayer, dipole moment, peptide.

RESUM

La importància de l'anomenat *potencial dipolar de membrana* per als sistemes biològics és encara poc coneguda. Aquest potencial és generat per dipols moleculars presents a les molècules que constitueixen les membranes, com són els associats als grups carbonil de l'enllaç èster dels fosfolípids i a l'enllaç amida de les proteïnes, o el dipol que es forma entre el grup fosfat i el grup colina de la fosfatidilcolina, així com els dipols de molècules d'aigua orientades a la interfase lípid-aigua de les bicapes. En la present revisió es fa repàs dels avenços que s'han produït en l'última dècada pel que fa, principalment, a la mesura del potencial dipolar de membrana mitjançant tècniques de fluorescència, les quals, a través d'un mètode de doble longitud d'ona, han contribuït a l'estudi de la importància d'aquest potencial electrostàtic en sistemes biològics. Es presenten exemples d'aquesta influència en la interacció de pèptids senyal amb membranes model, de pèptids de fusió del virus d'immunodeficiència adquirida amb membranes model i cel·lulars, i de compostos orgànics com l'inhibidor de la proteasa del virus d'immunodeficiència humana amb membranes model i cel·lulars i en la penetració de compostos a través de la pell.

SUMMARY

The relevance of the so-called membrane dipole potential in biological systems is not yet well established. This electrostatic potential is generated by the molecular dipoles present on the lipid and protein molecules, as for example the carbonyl groups of ester and amide bonds, the dipole between the phosphate and choline groups of phosphatidylcholine and the electric dipole associated to water molecules oriented at the lipid-water interface. In the present paper we review the contribution that the development of fluorescence techniques based on the application of a dual-wavelength method have made to the study of the role of the dipole potential in biological systems in the past ten years. Examples are presented of the influence of this potential on the interaction of signal peptides with model membranes, the interaction of HIV fusion peptides with model and cellular membranes, the interaction of the HIV protease inhibitor, saquinavir, with model and cellular membranes and the transdermal delivery of drugs.

INTRODUCCIÓ

L'any 1972 Singer i Nicolson proposaren el model anomenat *de mosaic fluid* sobre l'estructura de les membranes biològiques (per a una revisió, veg. Singer, 1992), que consisteix en una bicapa lipídica fluida a la qual s'associen proteïnes perifèriques i integrals. Al llarg dels anys el model ha anat guanyant en complexitat, tant estructural com dinàmica; a la riquesa en composició lipídica s'ha d'afegir la presència a la superfície de la bicapa de les estructures hidrofíliques de les proteïnes integrals i les proteïnes perifèriques, que en ambdós casos estan freqüentment glicosilades o associades a polímers altament sulfatats, coneguts com a *glicans*. També és ben coneguda la possibilitat de translació lateral tant de lípids com de proteïnes en el si de la bicapa, així com la possibilitat de moviment dels lípids des d'una capa a l'altra (*flip-flop*). Finalment, avui dia és àmpliament acceptada l'existència de microdominis estructurals rics en colesterol i esfingolípidis en el si de la membrana, coneguts com a *rafts* o *caveolae*, la importància dels quals en tota mena de processos associats a membranes guanya un significat creixent. El model de Singer i Ni-

colson representa la base conceptual que permet la interpretació del paper que les membranes, amb tota la complexitat descrita anteriorment, juguen en multitud de processos cel·lulars i fisiològics, com ara la transducció de senyals, el reconeixement cel·lular, el metabolisme energètic i diversos processos patològics. Les membranes fan possible la compartimentació d'aquests processos i el seu caràcter vectorial, i juguen així un paper fonamental en el manteniment dels sistemes apartats de l'equilibri termodinàmic, característica fonamental dels éssers vius.

La caracterització molecular de l'estructura de les membranes biològiques resulta, per tant, essencial per a definir la naturalesa de les interaccions entre els diferents components de les biomembranes, i els paràmetres fisicoquímics que en governen la interacció amb molècules. Juntament amb l'efecte hidrofòbic (White i Wimley, 1998), les interaccions electrostàtiques es troben a la base dels processos pels quals les molècules s'uneixen a membranes biològiques o s'hi insereixen, ja sigui a través de receptors específics o directament a la bicapa lipídica. Així, és lògic pensar que els camps elèctrics derivats dels potencials electrostàtics asso-

ciats a biomembranes afectaran aquest tipus d'interaccions, les quals representen una contribució rellevant a l'energia lliure total d'unió i/o inserció.

Normalment trobem associats a biomembranes tres tipus diferents de potencials electrostàtics: el potencial transmembrana, el potencial de superfície i el potencial dipolar. El potencial transmembrana, conegut normalment com a *potencial de membrana*, és el que ha estat més ben caracteritzat dels tres, i resulta del gradient de càrregues elèctriques a través de la membrana (Mitchell 1968; Nicholls i Ferguson, 1992). El paper d'aquest potencial en processos com la conducció de l'impuls nerviós o la síntesi d'ATP és ben conegut. El potencial de superfície és generat per les càrregues elèctriques a la superfície de la membrana. La teoria física que descriu la manifestació d'aquest potencial segons el model de Gouy-Chapman-Stern ha estat revisada per MacLaughlin (1989) i Cevc (1990). El potencial de superfície pot afectar el curs de reaccions que tenen lloc a la superfície de la membrana i un nombre divers de processos, com els que impliquen l'associació de pèptids carregats positivament amb membranes. Els pèptids antimicrobians (Zhang *et al.*, 2001) i hemolítics (Hristova *et al.*, 2001), pèptids senyal (Golding *et al.*, 1996), la tirosina cinasa c-Src (Murray *et al.*, 1998) i el substrat miristoilat ric en alanina de la proteïna cinasa C (MARCKS) (Wang *et al.*, 2001) en són exemples eloqüents.

Finalment, el potencial dipolar de membrana, generat per dipols moleculars presents a les molècules que constitueixen les membranes, és el menys caracteritzat dels tres i el seu paper en processos biològics s'està tot just començant a dilucidar. A la seva descripció i a la presentació d'exemples en els quals adquireix significat biològic es dedica la resta d'aquesta revisió.

EL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA

El potencial dipolar de membrana té el seu origen en polaritzacions associades a les molècules de fosfolípids i proteïnes. Els dipols que trobem a les molècules lipídiques són els associats al grup carbonil de l'enllaç èster i als enllaços fòsfor-oxigen dels fosfats i fòsfor-nitrogen dels grups fosfat i colina. A les proteïnes, l'acoblament del moment dipolar del carbonil de l'enllaç peptídica dona lloc a moments resultants d'important magnitud, com els associats a les hèlixs α . D'altra banda, els moments dipolars de les molècules d'aigua orientades a la interfase lípid-aigua semblen també contribuir al potencial dipolar, encara que la importància d'aquesta contribució es motiu de certa controvèrsia (Brokmann, 1994; Clarke, 2001). La resultant vectorial dels moments dipolars d'una meitat de la bicapa és positiva cap a l'interior de la membrana. El potencial dipolar pot arribar a ser de centenars de milivolts, una magnitud important comparada amb la del potencial de superfície, normalment d'unes desenes de milivolts. La magnitud del potencial dipolar de membrana augmenta molt ràpidament quan passem de la superfície de la membrana a la interfase (figura 1), on es dona un gradient de polaritat (transició des de la fase aquosa a la fase hidrofòbica de les cadenes alifàtiques de l'interior de la bicapa), i té un efecte sobre els cossos polaritzats, com ara els grups polars de pèptids i proteïnes, en un espai de tan sols al voltant d'un nanòmetre.

MESURA DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA

En el cas de monocapes lipídiques a la interfase aigua-aire o aigua-oli, és possible determinar potenciomètricament la magnitud

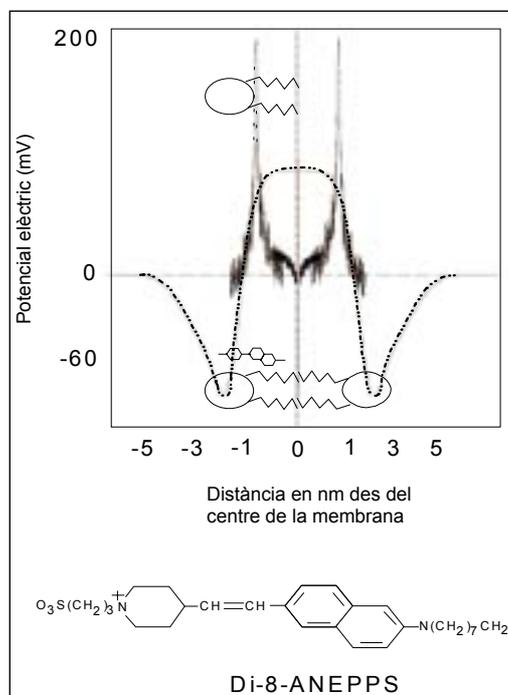


FIGURA 1. Valor del potencial elèctric associat a una bicapa lipídica, en absència de potencial transmembrana (-.-.-). Contribució del potencial dipolar de membrana (-----). S'indica la posició putativa de la sonda di-8-ANEPPS i la seva estructura.

del potencial dipolar (Brockmann, 1994). En el cas de bicapes lipídiques, en canvi, aquest tipus de mesura no és possible a causa de consideracions teòriques, i del gruix reduït de la bicapa (Brockmann, 1994). En bicapes lipídiques, el potencial dipolar s'ha estimat normalment a partir de la cinètica del transport d'anions i cations hidrofòbics a través de la membrana (Franklin i Cafiso, 1993). Va ser precisament el fet que el transport d'anions hidrofòbics és unes 10^5 vegades més ràpid que el de cations (en membranes model neutres i absència de potencial transmembrana) el que va portar a la formulació del concepte de potencial dipolar.

D'altra banda, Seelig *et al.* (1987) establiren un mètode qualitatiu basat en la mesura

de la separació quadrupolar de les molècules de fosfolípid marcades amb deuteri, com a conseqüència de la perturbació del moment dipolar del cap polar a causa de variacions en el potencial dipolar (un cop corregida la contribució del potencial de superfície).

Durant els últims vint anys, el desenvolupament de sondes, la fluorescència de les quals varia en funció del camp elèctric segons un mecanisme electrocròmic, o de desplaçament de la càrrega molecular (Loew *et al.*, 1979), ha permès disposar d'una eina addicional per a seguir de manera principalment qualitativa els canvis en el potencial dipolar i el potencial transmembrana (les mesures de variació del potencial dipolar, per tant, s'han de portar a terme en absència de variacions del potencial transmembrana). La fluorescència d'aquestes sondes no és sensible a canvis en el potencial de superfície (Gross *et al.*, 1994; Cladera i O'Shea, 1998). Exemples d'indicadors fluorescents d'aquest tipus són la betaina 1-(3-sulfonato-propil)-4-[β [2-(di-n-octil-amino)-6-naftil]vinil] piridina, coneguda com a *di-8-ANEPPS* (figura 1) i la forma di-n-butil-amino, o *di-4-ANEPPS*, així com la N-4(sulfobutil)-4-(4-(p-(dipentilamino)fenil) butadienil)-piridina, coneguda com a *RH421* (Clarke i Cane, 1997).

Tal com demostraren Montana *et al.* (1989), la intensitat de la fluorescència d'aquestes sondes, tot i respondre a canvis en el camp elèctric, es pot veure afectada per contribucions artifactuals, com ara les que s'originen a conseqüència de la interacció directa entre els compostos objecte d'estudi i les sondes. El desplaçament del màxim de l'espectre d'excitació (al voltant de 468 nm) és, en canvi, tal com demostren els autors, sensible únicament a variacions del camp elèctric. Per a seguir el desplaçament del màxim, i tal com s'illustra a la figura 1, 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 causen un augment del potencial dipolar de membrana (com el 6-cetocolestanol) l'espectre de diferència reflecteix un desplaçament cap al blau, amb un màxim al voltant de 450 nm i un mínim al voltant de 520 nm. Compostos com la floretina, que causen una disminució del potencial dipolar, originen un desplaçament cap al vermell, amb un mínim a 450 i un màxim a 520 nm. L'existència d'aquests màxims i mínims en l'espectre de diferència, ha permès, també, el disseny d'un mètode de doble longitud d'ona d'excitació, consistent a il·luminar la mostra a 450 i 520 nm, tot mesurant la relació d'intensitats de la llum emesa a 580 nm (màxim d'emissió). Això permet el seguiment de la variació de la relació $R(450/520)$, la qual reflecteix el desplaçament del màxim d'excitació i, per tant, les variacions del potencial en funció del temps (figura 1).

Les seccions següents es dediquen a il·lustrar l'aplicació d'aquests mètodes a l'estudi de la influència del potencial dipolar de membrana en la interacció de molècules amb membranes.

INFLUÈNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR EN LA INTERACCIÓ DE MACROMOLÈCULES AMB MEMBRANES

En comparació al potencial transmembrana o al potencial de superfície, la importància del potencial dipolar per als sistemes biològics fa molt poc que s'ha començat a posar de manifest. L'existència d'una barreira, l'origen de la qual s'associà als dipols moleculars presents a la membrana i que afectava la translocació d'ions hidrofòbics, era coneguda des de 1969 (Lieberman i To-

play, 1969), però només al llarg dels últims sis o set anys han aparegut treballs que il·lustren la influència d'aquests dipols en la interacció entre macromolècules i membranes. Experiments portats a terme al nostre laboratori amb la sonda di-8-ANEPPS (Cladera i O'Shea, 1998) i resultats publicats per Voglino *et al.* (1998), estableixen clarament la influència dels dipols moleculars en la capacitat d'unió de pèptids senyal. Utilitzant monocapes i bicapes lipídiques, Shapovalov *et al.* (1999) i Antonenko *et al.* (1999) estudiaren la relació entre la capacitat de la gramicidina per a formar canals iònics i la magnitud del potencial dipolar, i establiren una correlació entre la dissociació dels dimers de gramicidina i la disminució del potencial. Maggio (1999) demostrà que l'activitat de la fosfolipasa A_2 sobre monocapes lipídiques és modulada a través de les propietats dipolars específiques de glicoesfingolípids i que les reaccions redox a la interfase membrana-aigua es veuen també afectades pel potencial dipolar (Alakoskela *et al.*, 2001). La seva influència s'ha estudiat també en la interacció dels pèptids de fusió amb membranes model (Cladera *et al.*, 1999), la interacció d'inhibidors de la proteasa de VIH amb microdominis de membranes cellulars (Asawarkan *et al.*, 2001) i la difusió de substàncies a través de la pell (Valenta *et al.*, 2001). Alguns d'aquests exemples, estudiats en el nostre laboratori, s'amplien en els apartats següents.

INFLUÈNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR EN LA INTERACCIÓ DEL PÈPTID DE FUSIÓ DEL VIRUS D'IMMUNODEFICIÈNCIA DE SIMI (SIV) AMB MEMBRANES MODEL

El pèptid de fusió del virus d'immunodeficiència de simi (SIV) comprèn 12 residus del segment N-terminal de la proteïna

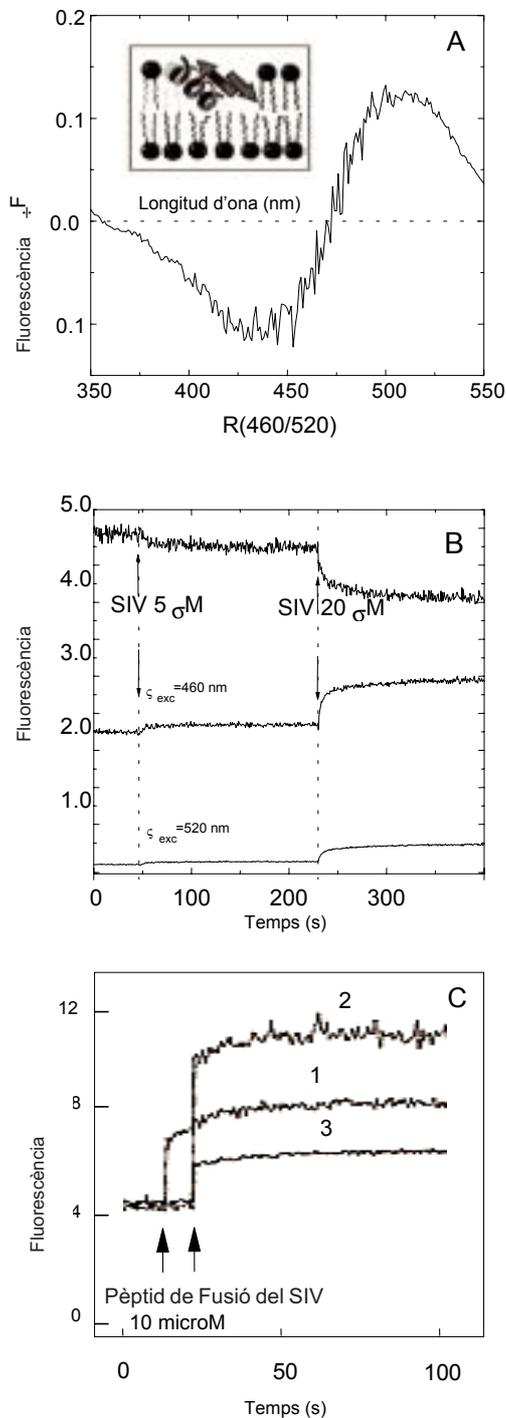


FIGURA 2. *a)* Espectre de diferència obtingut restant l'espectre d'excitació de vesícules lipídiques marcades amb la sonda di-8-ANEPPS de l'espectre d'excitació de les mateixes vesícules després d'afegir el pèptid de fusió del virus d'immunodeficiència de simi (VIS, 10 μM). Abans d'efectuar la resta es normalitzaren les intensitats dels espectres d'excitació perquè l'espectre de diferència reflectís tan sols desplaçaments de longitud d'ona. L'insert mostra una representació esquemàtica de la inserció obliqua de l'estructura helicoidal que el pèptid adopta en interaccionar amb la membrana, així com del moment dipolar associat a l'hèlix (vector orientat cap a la superfície de la membrana) i el moment dipolar de la membrana (vector orientat cap al centre de la bicapa). *b)* Mesura de doble longitud d'ona de la variació temporal del potencial dipolar de vesícules lipídiques marcades amb di-8-ANEPPS, amb l'addició de les concentracions indicades de VIS. La mostra es va excitar a 450 i 520 nm. La fluorescència es va mesurar a 580 nm i es va determinar la relació R(450/520), els canvis en la qual corresponen a canvis en la magnitud del potencial dipolar de membrana. Composició de les vesícules lipídiques: 50 mol% fosfatidilcolina : 50 mol% fosfatidiletanolamina. *c)* Mesura de la fusió de vesícules lipídiques marcades amb les sondes NBD-fosfatidiletanolamina i rodamina-fosfatidiletanolamina induïda pel pèptid de fusió del VIS. Es mesurà la disminució en transferència d'energia (FRET) entre les dues sondes a 530 nm. Traça 1: Vesícules de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina (50:50); traça 2: Vesícules suplementades amb 30 mol% de 6-cetocolesterol, que incrementa el potencial dipolar; traça 3: Vesícules suplementades amb 15 mol% de floretina, la qual disminueix el potencial dipolar. Un major increment de la fluorescència a 530 nm reflecteix una disminució més elevada de la transferència d'energia, a causa de la dissolució de les sondes en el si de les membranes que es fonen. Una variació més gran de la intensitat de fluorescència indica, per tant, més fusió.

gp32, involucrada en el procés de fusió entre la membrana vírica i la membrana cel·lular i és, per tant, un element essencial per a l'entrada del virus a la cèl·lula (Kowalski *et al.*, 1987). La seqüència del pèptid de fusió es compon de residus hidrofòbics, i en dimetil-sulfòxid el pèptid forma agregats moleculars organitzats en forma d'estructures beta. En aigua, forma grans agregats col·loïdals. La presència de membranes, en canvi, causa la

desagregació del pèptid (Cladera *et al.*, 1999) i aquest s'insereix obliquament en la bicapa lipídica i forma una hèlix α (Martin *et al.*, 1994; Brasseur *et al.*, 1997), la qual es creu que causa la desestabilització de la membrana i el desencadenament del procés de fusió. Tal com es mostra a la figura 1, la interacció del pèptid de fusió amb membranes model (liposomes) causa una disminució de la magnitud del potencial dipolar. Aquesta s'ha mesurat en forma de mínim a 450 nm i màxim a 520 nm a l'espectre de diferència de la sonda di-8-ANEPPS (Cladera *et al.*, 1999), tot coincidint amb l'espectre de diferència originat per molècules que disminueixen el potencial dipolar, com la floretina (Franklin i Cafiso, 1993). Aquest efecte del pèptid de fusió és corroborat per la disminució de la relació de fluorescència $R(450/520)$ quan interacciona amb les membranes (figura 1b). L'efecte del pèptid sobre el potencial revela que les hèlixs α s'insereixen a la bicapa oposant el moment dipolar de l'hèlix al de la bicapa, és a dir, amb l'extrem N-terminal prop de la superfície i l'extrem C-terminal apuntant cap al centre de la bicapa. La importància de la modificació del potencial dipolar per part del pèptid de fusió quedà palesa en estudiar l'extensió del procés de fusió en funció de la magnitud d'aquest potencial (figura 1c). La variació de la magnitud inicial del potencial en membranes model s'aconseguí tractant les membranes amb 6-cetocolestanol i floretina, els quals l'augmenten i disminueixen, respectivament. Els resultat de la mesura de la fusió de les bicapes mitjançant transferència d'energia (FRET) posa de manifest que la disminució del potencial redueix l'extensió del procés de fusió, mentre que el seu augment l'incrementa. Aquest efecte pot estar relacionat amb la influència del potencial dipolar en l'orientació de les hèlixs α , i per tant, dels seus moments dipolars en el si de la bicapa, encara que caldran nous estudis per a

dilucidar aquest extrem. Aquests estudis adquireixen especial rellevància si considerem el fet que la membrana vírica conté un alt percentatge de colesterol (Aloia *et al.*, 1993), el moment dipolar del qual pot contribuir de manera important al potencial dipolar, i pot resultar, per tant, un element significatiu per al mecanisme d'entrada del virus a la cèl·lula.

INFLUÈNCIA DELS DIPOLS MOLECULARS EN LA INSERCIÓ D'UN PÈPTID SENYAL EN MEMBRANES MODEL

La unió del pèptid senyal (p25) de la subunitat IV de la citocrom oxidasa a la superfície de membranes model (liposomes), és seguida de la inserció de part de l'estructura del pèptid a l'interior de la bicapa i la formació d'una hèlix amfipàtica (Golding *et al.*, 1996), amb els residus polars i els carregats positivament agrupats a una cara de l'hèlix i els hidrofòbics a l'altra. Estudis amb membranes model marcades amb la sonda di-8-ANEPPS (Cladera i O'Shea, 1998) han demostrat que la interacció del pèptid p25 amb les bicapes causa una disminució de la magnitud del potencial dipolar (figura 3). L'ajustament matemàtic de les traces a un doble procés exponencial, revela que la constant cinètica aparent, de l'ordre de $0,29 \text{ s}^{-1}$, coincideix amb la constant cinètica del procés d'inserció del pèptid a la bicapa, calculada per altres mitjans (Golding *et al.*, 1996). D'altra banda, estudis d'espectroscòpia infraroja de transformada de Fourier indicaren que l'augment del potencial dipolar de la membrana amb la utilització de 6-cetocolestanol origina un augment del percentatge d'hèlixs α . Aquesta es una indicació clara de la importància del potencial dipolar per a la conformació de pèptids associats a bi membranes.

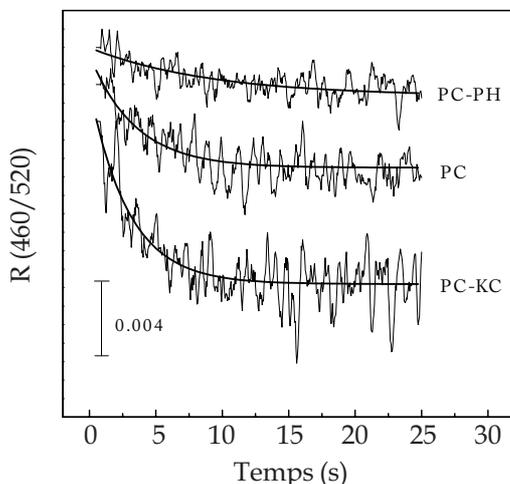


FIGURA 3. Variació temporal de la relació de fluorescència $R(460/520)$ i, per tant, del potencial dipolar, causada per l'addició del pèptid senyal p25 a una suspensió de vesícules lipídiques de fosfatidilcolina (PC), mesurada amb una tècnica de cinètica ràpida (*stopped flow*). La proporció de flotetina (PC-PH) i 6-cetocolesterol (PC-KC) és 15 mol%. Concentració de lípid: 200 μM ; concentració de pèptid: 15 μM . Temperatura ambient. PH: 7,4. Les traces s'ajustaren matemàticament a dobles processos exponencials, dels quals es dedueixen les constants cinètiques aparents.

EFFECTE DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA EN LA INTERACCIÓ DE LA PROTEASA DEL VIRUS D'IMMUNODEFICÈNCIA ADQUIRIDA I LA MEMBRANA DE CÈL·LULES CACO-2

Els dos apartats anteriors posen de manifest la importància del potencial dipolar per a la interacció de macromolècules amb membranes model. Per a determinar, però, de manera més directa i significativa, la influència d'aquest potencial en processos biològics, són necessaris estudis amb membranes cel·lulars. En un treball publicat recentment (Asawakarn *et al.*, 2001) hem encetat aquesta tasca amb l'estudi de la interacció de l'inhibidor de la proteasa del VIH, conegut com a *sa-*

quinavir, amb cèl·lules d'epiteli intestinal (cèl·lules Caco-2). En l'estudi es demostra que el marcatge de les membranes cel·lulars amb la sonda di-8-ANEPPS és factible i es pot utilitzar la disminució del potencial dipolar causada per la interacció de l'inhibidor amb les mateixes per a caracteritzar el procés d'unió. Estudis anteriors demostren que els inhibidors de la proteasa de VIH són substrats de la glicoproteïna P, una proteïna de membrana implicada en la multiresistència a medicaments mitjançant el bombeig d'aquests cap a l'exterior de la cèl·lula. Experiments d'unió competitiva efectuats per Asawarkan *et al.*, (2001) amb colquicina, un altre substrat conegut de la glicoproteïna P, corroboren aquest extrem. És sabut que la glicoproteïna P es troba, en les membranes cel·lulars, associada a microdominis lipídics rics en colesterol i esfingolípidis coneguts com a *rafts*, la importància dels quals en tota mena de processos biològics està adquirint una rellevància creixent (Simons i Ikonen, 1997). El tractament de les cèl·lules Caco-2 amb β -ciclodextrina, un segrestador de colesterol, disminueix el potencial dipolar de membrana, tal com es mostra a la figura 4 en forma de disminució de la relació de fluorescència $R(450/520)$. L'estudi de la interacció de *saquinavir* en funció de la seva concentració posa de manifest que l'eliminació del colesterol de la membrana redueix la capacitat d'unió de l'inhibidor, això és, el nombre total de molècules que s'uneixen a la membrana —nivell de variació màxima de la relació $R(450/520)$.

És sabut que l'eliminació de colesterol de la membrana provoca la destrucció dels microdominis lipídics. Els resultats, per tant, representen la primera prova de la possible relació entre el potencial dipolar de membrana i els processos biològics associats a *rafts*, en aquest cas, la capacitat d'unió d'un lligam a un receptor ubicat en aquests microdominis.

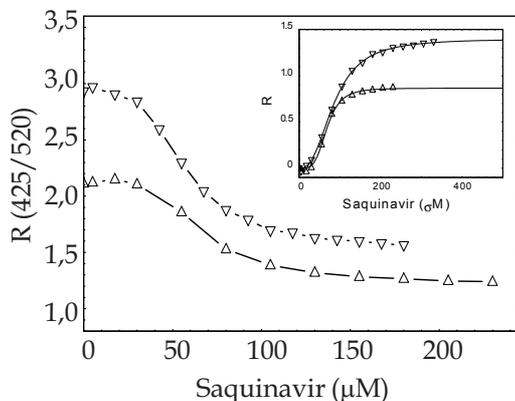


FIGURA 4. Variació de la relació de fluorescència $R(450/520)$ en funció de la concentració de *saquinavir*, afegit a una suspensió de cèl·lules Caco-2 marcades amb la sonda di-8-ANEPPS (els triangles situats cap avall) i a una suspensió equivalent de cèl·lules pretractades amb β -ciclodextrina (els triangles situats cap amunt) per eliminar el colesterol de la membrana. L'inserta representa les dues corbes després de normalitzar el valor inicial de la relació $R(450/520)$ a zero, per a facilitar la comparació de l'amplitud de la variació a concentracions saturants de *saquinavir* (diferència en la capacitat d'unió a la membrana). Concentració de cèl·lules: $40 \times 10^4/\text{ml}$. Concentració de di-8-ANEPPS: $1 \mu\text{M}$. Temperatura: 37°C ; pH: 7,4.

INFLUÈNCIA DEL POTENCIAL DIPOLAR DE MEMBRANA EN LA PENETRACIÓ DE SUBSTÀNCIES A TRAVÉS DE LA PELL

Finalment, i per posar de relleu la importància del potencial dipolar de membrana a diferents nivells de complexitat biològica, ens referirem a la influència de la seva modulació en la penetració de compostos a través de la pell humana. L'epidermis, la capa més externa de la pell, es compon de diferents capes cel·lulars. A la més externa, l'estrat corni, trobem una gran quantitat de bicapes lipídiques apilades, les quals representen una barrera formidable per a la penetració de substàncies. Des del punt de vista farmacològic, un ampli ventall de productes químics s'utilitza per a modificar la penetra-

bilitat de substàncies d'interès mèdic. Tenint en compte que molts d'aquests compostos tenen una càrrega elèctrica neta, o moments dipolars associats, és raonable pensar que el potencial dipolar de les membranes de l'estrat corni pugui influir en la seva penetració. En un estudi recent (Valenta *et al.*, 2001), es demostra que el pretractament d'epidermis humana amb liposomes carregats de floretina, la qual disminueix el potencial dipolar de membrana, intensifica la capacitat de penetració de l'anestèsic *lino-caïna*. D'altra banda, mesures de microscòpia confocal han demostrat que el tractament de l'epidermis amb 6-cetocolestanol intensifica la penetració de l'antibiòtic *bacitracina* (figura 5).

CONSIDERACIONS FINALS

De tot el que hem exposat fins ara, el potencial dipolar de membrana emergeix com un important paràmetre físic en el si de la complexitat de la interfase lípid-aigua a les membranes biològiques. La interfase, la determinació de l'estructura i aspectes dinàmics de la qual és de cabdal importància per a la descripció acurada de les interaccions entre molècules i membranes, constitueix al voltant del 50 % del gruix total de la membrana. Fins i tot en membranes model simples, la concentració en aquest espai de grups químics tan diversos com els grups fosfocolina, glicerol, carbonil i metilè (veg. White i Wimley, 1999), ens aboca a considerar la idealització de la membrana com una capa hidrofòbica que separa dues fases aquoses com una aproximació particularment inadequada. De manera especial si considerem l'efecte de factors com el potencial dipolar en processos associats a membranes, una influència que dependrà altament de la configuració geomètrica de tots aquests components químics. La complexi-

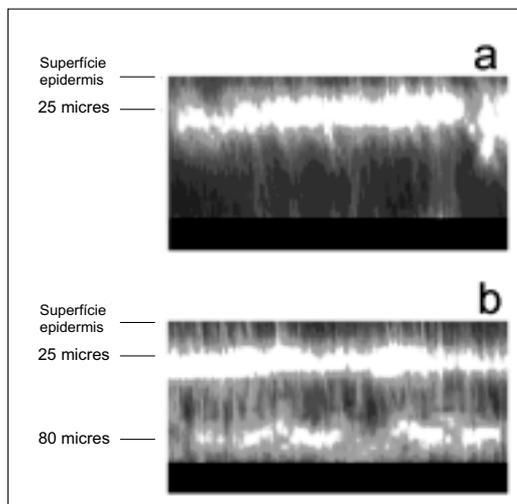


FIGURA 5. Imatge confocal (secció ortogonal a la superfície de la pell) de la penetració de l'antibiòtic *bacitracina* marcat amb fluoresceïna a través d'epidermis humana (a) i epidermis pretractada amb liposomes carregats amb 6-cetocolesterol (30 mol%) (b). Imatges obtingudes 48 després de l'aplicació de la bacitracina sobre les mostres d'epidermis. Les motres es pretractaren amb 6-cetocolesterol durant 12 hores.

tat fisicoquímica de la interfase es tradueix en un canvi molt espectacular de polaritat al llarg d'una distància molt petita, que genera així un gradient de polaritat que jugarà un paper important en la distribució dels residus polars i apolars presents en les molècules que interaccionen amb les membranes. Des del punt de vista del modelatge molecular, la disponibilitat d'eines que permetin modelar finament la riquesa de la interfase incorporant acuradament els dipols moleculars, facilitarà una predicció teòrica mínimament satisfactòria dels mecanismes d'interacció de molècules amb membranes.

Per últim, des del punt de vista de la determinació experimental de la importància del potencial dipolar de membrana, dos tipus d'estudis resultaran, en la nostra opinió, de cabdal importància en el futur proper. D'una banda, la utilització de pèptids la inserció dels quals en membranes model

— tot formant estructures helicoidals — sigui coneguda, en combinació amb tècniques com el dícroisme d'infraroig, que permetin estudiar la influència del potencial en l'orientació de les hèlixs α , un tipus estructural dominant en proteïnes de membrana. En segon lloc, estudis destinats a valorar la contribució del potencial dipolar de membrana, i en aquest sentit, la seva modulació a través de la concentració de colesterol, en els microdominis lipídics coneguts com a *rafts*.

BIBLIOGRAFIA

- ALAKOSKELA, J. I.; P. K. J. KINNUNEN (2001). «Control of a redox reaction on lipid bilayer surfaces by membrane dipole potential». *Biophys. J.*, núm. 80, pàg. 294-304.
- ALOJA, R. C.; H. TIAN; F. C. JENSEN (1993). «Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 5181-5185.
- ANTONENKO, Y. N.; T. I. ROKITSKAYA; E. A. KOTOVA (1999). «Effect of dipole modifiers on the kinetics of sensitized photoinactivation of gramicidin channels in bilayer lipid membranes». *Membr. Cell Biol.*, núm. 13, pàg. 111-120.
- ASAWAKARN, T.; J. CLADERA; P. O'SHEA (2001). «Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of caco2 cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, pàg. 38457-38463.
- BRASSEUR, R.; T. PILLOT; L. LINS; J. VANDEKERCKHOVE; M. ROSSENEU (1997). «Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability». *TIBS*, núm. 22, pàg. 167-171.
- BROCKMANN, H. (1994). «Dipole potential in lipid membranes». *Chem Phys. Lipids*, núm. 73, pàg. 57-79.
- CEVC, G. (1990). «Membrane electrostatics». *Biochim. Biophys. Acta.*, núm. 1031-3, pàg. 311-382.
- CLADERA, J.; I. MARTIN; J.M. RUYSSCHAERT; P. O'SHEA (1999). «Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes». *J. Biol. Chem.*, núm. 274, pàg. 29951-29959.
- CLADERA, J.; P. O'SHEA (1998). «Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide». *Biophys. J.*, núm. 74, pàg. 2434-2442.
- CLARKE, R. J. (2001). «The dipole potential of phospholip-

- id membranes and methods for its detection». *Adv. Colloid Interface Sci.*, núm. 89-90, pàg. 263-281.
- CLARKE, R. J.; D. J. KANE (1997). «Optical detection of membrane dipole potential: avoidance of fluidity and dye-induced effects». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1323, pàg. 223-239.
- FRANKLIN, J. C.; D. S. CAFISO (1993). «Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles». *Biophys. J.*, núm. 65, pàg. 289-299.
- GOLDING, C., S. SENIOR; M. T. WILSON; P. O'SHEA (1996). «Time resolution of binding and membrane insertion of a mitochondrial signal peptide: correlation with structural changes and evidence of cooperativity». *Biochemistry*, núm. 35, pàg. 10931-10937.
- HRISTOVA, K.; C. E. DEMPSEY; S. H. WHITE (2001). «Structure, location and lipid perturbations of melittin at the membrane interface». *Biophys. J.*, núm. 80, pàg. 801-811.
- KOWALSKI, M.; J. POTZ; L. BASIRIPOUR; T. DOTFMAN; W. CHUN GOH; E. TERWILLIGER; A. DAYTON; C. ROSEN; W. HASELTINE; J. SODROSKI (1987). «Functional regions of the envelope glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus type-1». *Science*, núm. 237, pàg. 1351-1355.
- LIBERMAN, E. A.; V. P. TOPALY (1969). «Permeability of biomolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions». *Biophysics*, núm. 14, pàg. 477-487.
- LOEW, L. M.; S. SCULLY; L. SIMPSON; A. S. WAGGONER (1979). «Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential». *Nature*, núm. 281, pàg. 497-499.
- MAGGIO, B. (1999). «Modulation of phospholipase A2 by electrostatic fields and dipole potential of glycosphingolipids in monolayers». *J. Lip. Res.*, núm. 40, pàg. 930-939.
- MARTIN, I.; M. C. DUBOIS; F. DEFRISE-QUERTAIN; T. SAERMARK; A. BURNY; R. BRASSEUR; J.-M. RUYSSCHAERT (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.*, núm. 68, pàg. 1139-1148.
- MCLAUGHLIN, S. (1989). «The electrostatic properties of membranes». *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, núm. 18, pàg. 113-136.
- MITCHELL, P. D. (1979). «Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences». *Science*, núm. 206, pàg. 1148-1159.
- MURRAY, D.; L. HERMIDA-MATSUMOTO; C. A. BUSER; J. TSANG; C. T. SIGAL; N. BEN-TAL; B. HONIG; M. D. RESH; S. MCLAUGHLIN (1998). «Electrostatics and the membrane association of Src: Theory and Experiment». *Biochemistry*, núm. 37, pàg. 2145-2159.
- NICHOLLS, D.; S. FERGUSON (1992). *Bioenergetics*. (2a edició) J. Wiley & Son, Inc. Regne Unit.
- SEELIG, J.; P. M. MACDONALD; P. G. SCHERER (1987). «Phospholipid headgroups as sensors of electric charges in membranes». *Biochemistry*, núm. 26, pàg. 7535-7541.
- SHAPOVALOV, V.; E. A. KOTOVA; T. I. ROKITSKAYA; Y. N. ANTONENKO (1999). «Effect of gramicidin A on the dipole potential of phospholipid membranes». *Biophys. J.*, núm. 77, pàg. 299-305.
- SIMONS, K.; E. IKONEN (1997). «Functional rafts in cell membranes». *Nature*, núm. 387, pàg. 569-572.
- SINGER, S. J. (1992). «The structure and function of membranes: a personal memoir». *J. Membr. Biol.*, núm. 129, pàg. 3-12.
- VALENTA; C.; J. CLADERA; P. O'SHEA; J. HADGRAFT (2000). «Effect of phloretin on the percutaneous absorption of lignocaine across human skin». *J. Pharm. Sci.*, núm. 90, pàg. 485-492.
- VOGLINO, L.; T. J. MCINTOSH; S. A. SIMON (1998). «Modulation of the binding of signal peptides to lipid bilayers by dipoles near the hydrocarbon-water interface». *Biochemistry*, núm. 37, pàg. 12241-12252.
- WANG, J.; A. ARBUZOVA; G. HANGYÁS-MIHÁLYNÉ; S. MCLAUGHLIN (2001). «The effector domain of myristoylated alanine-rich C Kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, pàg. 5012-5019.
- WHITE, S.H.; W.C. WIMLEY (1998). «Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1376, pàg. 339-352.
- WHITE, S. H.; W. C. WIMLEY (1999). «Membrane protein folding and stability: physical principles». *Annu. Rev. Biophys. Biol. Struct.*, núm. 28, pàg. 319-365.
- ZHANG, L.; A. ROZEK; R. E. HANCOCK (2001). «Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes». *J. Biol. Chem.* Jul 25 [e-pub ahead of print].