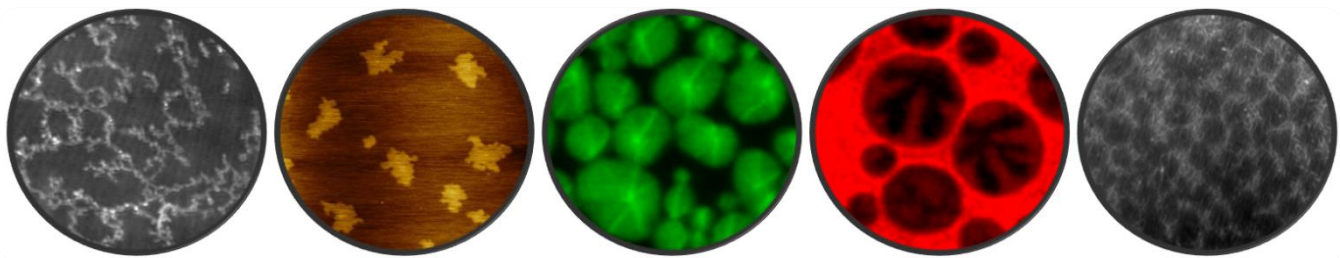


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Estudio de la interacción de péptidos bioactivos con lípidos



Alain Bolaño Alvarez

2022

Dedicado a:

-- mis queridas madre y abuela --

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Título: Estudio de la interacción de péptidos bioactivos con lípidos

Autor: Lic. Alain Bolaño Alvarez

Director: Dr. Gerardo Daniel Fidelio

Lugar: Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Córdoba, Argentina

Comisión Asesora:

Dr. Ernesto Ambroggio

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, CIQUIBIC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Córdoba, Argentina

Dra. Carla Giacomelli

Departamento de Fisicoquímica, INFIQC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Córdoba, Argentina

Dra. Mariela Fernanda Pérez

Departamento de Farmacología, IFEC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, CONICET, Córdoba, Argentina

Evaluador externo:

Dra. María Alejandra Tricerri

Instituto de Investigaciones Bioquímicas De La Plata "Prof. Dr. Rodolfo R. Brenner", INIBIOLP, CONICET, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Agradecimientos

- A mi director de Tesis (Fide) por darme la oportunidad de venir de mi país a su laboratorio a realizar el doctorado.
- A la Profe. M. Carmen.
- Al Benja por el asesoramiento experimental.
- Al Ing. Marcelo Pino por el arduo trabajo en el diseño de los circuitos y accesorios especiales.
- A Steffen Petersen por permitirme trabajar en su laboratorio en Dinamarca.
- Al Dr. Pablo Rodríguez por participar en nuestros proyectos y conectarnos a TRB Pharma que ha financiado parte de esta Tesis.
- Al Dr. Luis A. Bagatolli (QEPD) por sus valiosas sugerencias en el uso de la sonda Laurdan.
- Al Dr. Gustavo Pino y equipo de trabajo por brindarme sus conocimientos de Fluorescencia.
- A la Dra. María Lucrecia Carot por su asistencia con la técnica de AFM.
- Al CIQUIBIC-UNC y al CONICET por permitir a jóvenes de otros países hacer ciencia en Argentina. A FONCYT y SeCyT-UNC por sus aportes financieros.
- A mi Familia: *En especial a mi mamá y abuela por todo el apoyo incondicional.* A mis tías Eolia y Raiza (EPD), tío René por su ejemplo de lucha, Belkis por el cuidado de mi madre y abuela. A Natalia y Sara por todo el cariño y regalarme mi primer teléfono para que pudiera aplicar a esta beca. A mis amigos por el apoyo y la ayuda económica brindada para mis tramites de beca: Maikel-Lariza; Herlán y Familia (Oelnis); Arisledys-Sinia por la amabilidad y el gran favor a mi madre y abuela; Haile González, Yadián A. Perón; Néstor Mora; Davis C. García, El Kike. A “El Beny” por el apoyo a mi llegada a Argentina. A Juli, Meli y Laura por todo el cariño, el apollo y alegría en mis cumpleaños en Argentina. Al amigo Ever por facilitarme vivir cerca del CIGB (donde aprendí mucho) y a todos los que de alguna forma contribuyeron a mi formación incluyendo a algunos de los muchos buenos investigadores del CIGB (Gleysin C.; Annia G. H.; Yasser R.; Ania C.; Alexis. M.; Luis J. G.-Vlado-Luis A.; Hector S. M.) y mis profes de la Universidad de la Habana, Cuba.

INDICE

Objetivos	7
Abreviaturas	8
Resumen de las Publicaciones realizadas con el trabajo de tesis	9
Capítulo I: INTRODUCCION	
1.1 Enfermedad de Alzheimer: Papel de los lípidos en la fibrilación del A β amiloide	10
1.2 Concepto de transición de fase bidimensional en la formación-disolución de fibras de A β amiloide en interfases organizadas.	13
1.3 Péptidos amiloides truncados A β (1-37/38/39)	16
1.4 Interacción de la toxina Melittin con fosfolípidos	17
CAPITULO II. RESULTADOS Y DISCUSION	
2.1 Interacción del péptido amiloide A β con lípidos en capas monomoleculares de Langmuir	20
2.2.1 Implicaciones del estado de fase lipídico en la interacción con amiloides y su papel en la formación de fibras amiloides	20
2.1.1.1 Propiedades de superficies de A β (1-40) en monocapas de Langmuir mezcla con POPC y DSPC. Π -Área Isotermas y análisis de Imágenes de BAM	20
2.1.1.2 Imágenes de AFM y análisis por fluorescencia usando la sonda ThT en monocapas de POPC/A β (1-40) transferidas a un soporte de mica	26
2.1.1.3 Significancia biológica e implicaciones en el entendimiento de la formación de fibras amiloides in vitro en presencia de lípidos con diferentes características interfaciales	28
2.1.2 Análisis de fluorescencia en monocapas de Langmuir de la mezcla DMPC/A β (1-40) transferidas a un soporte de mica. Imágenes de SEM	34
2.1.3 Las transiciones de fase lipídicas y su papel en las interacciones de A β (1-40) para la formación de fibras amiloides	37
2.1.3.1 Propiedades de superficies de A β (1-40) en monocapas de Langmuir mezcla con DPPC. Isotermas π -Área, análisis de Imágenes de BAM e influencias de la temperatura en el estado de fase.	37
2.1.3.2 Prueba de la coexistencia de estructuras fibrilares con dominios irregulares en la mezcla DPPC/A β (1-40) empleando la sonda ThT y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).	43
2.1.4 Efecto de gangliósidos en el proceso de disolución de fibras amiloide de A β (1-40) en un entorno de lípidos de membrana	47
2.1.4.1 Propiedades de superficie y efecto de gangliósidos totales sobre fibras amiloides en monocapas mezclas de POPC/A β (1-40). Isotermas π -área e imágenes BAM	47

2.1.4.2. Análisis de reflectividad en BAM e intensidad de fluorescencia (ThT) de los dominios irregulares en interfases de mezcla POPC:A β (1–40):GT	54
2.1.4.3. Las fibras amiloides son disueltas dinámicamente por GT	58
2.1.4.4. Significado general de los resultados hallados por efecto de gangliósidos	60
2.1.5 Influencia de la reversión de la secuencia de los péptidos amiloides A β (1–40) y A β (1–42) en mezclas con POPC.	65
2.1.5.1 Propiedades de superficie de monocapas mezclas de POPC/A β (40–1) y POPC/A β (42–1) comparadas con POPC/A β (1–40) y POPC/A β (1–42) respectivamente. Isotermas π -Área e imágenes de BAM.	65
2.1.5.2 Importancia de la reversión de la secuencia en la formación de fibras amiloides	74
2.1.5.2 Propiedades de superficie de los péptidos amiloides truncados A β (1-37), A β (1-38) y A β (1-39)	75
2.2. Influencia del estado de fase de lípidos en la interacción del péptido Melittin y la formación de nanoestructuras en interfase agua/aire	78
2.2.1- Propiedades de superficie del péptido Melittin en monocapas mezclas con los lípidos DSPC y POPC. Isotermas π -área y análisis de imágenes de BAM	78
2.2.2 Análisis espectroscópico por ATR-FTIR de las monocapas de DSPC/Melittin que contienen fibras nano-estructuradas	85
2.2.3- Estudio de fluorescencia en presencia de ThT de estructuras fibrilares en la mezcla DSPC/Melittin al 50%	87
2.2.4- Significancia	89
2.2.5 Nano-cables del péptido Melittin revestidos con el lípido DSPC y moldeados en la interfase agua/aire	94
2.2.6- Los cambios conformacionales en monocapas de los componentes puros (DSPC, Melittin) y su mezcla como indicio de una interacción lípido-péptido organizada	94
2.2.7- Evidencias por microscopía de fluorescencia del revestimiento del péptido Melittin con lípidos DSPC moldeados en la interfase agua/aire	97
2.2.8 Aislamiento de los nano-cables DSPC/Melittin revestidos. Detección por AFM y FM	101
CAPITULO III: Materiales y Métodos	
3.1 Reactivos	104
3.2 Proceso de formación y compresión-expansión de monocapas de péptidos y lípidos. π -área Isotermas.	104
3.3 Microscopía de ángulo de Brewster.	106
3.4- Experimentos Transferidos a AFM y FM	106
3.5- Análisis de Imágenes y FM	107
3.6- Microscópica de Fuerza Atómica y SEM.	
Conclusiones	109
Apéndice con Material Suplementario	112
Referencias	113
PDF de los artículos publicados	124

Objetivo General: Establecer una relación molecular racional en la interacción lipido/péptidos bioactivos para entender la formación de amiloides en la interfase agua/aire. Las condiciones estudiadas incluyen estabilidad y miscibilidad lateral de mezclas lipido/péptido, secuencias, conformación y estructura secundaria que los péptidos adquieren en la superficie y su capacidad de formar estructuras amiloideas con lípidos de diferentes estados físicos.

Objetivos Específicos:

- I- Correlacionar el tipo de hidrofobicidad de los péptidos bioactivos ensayados con la estabilidad lateral que estos adquieren en interfases monomoleculares agua/aire.
- II- Correlacionar el tipo de conformación interfacial y su capacidad de interacción con lípidos en estado líquido-expandido y líquido-condensado y su efecto inductor de estructuras de tipo amiloides.
- III- Establecer diferencias topográficas debido al arreglo molecular en la interfaz agua/aire de péptidos anfipáticos amiloidogénicos en mezclas con lípidos (líquido expandido y líquido condensado) a diferentes proporciones péptido/lípido.
- IV- Caracterizar/describir estructuras formadas tipo amiloides en la interfase agua/aire de mezclas lípidos/péptido bioactivo. Establecer su significancia biológica (concepto de transición cooperativa de amiloides inducida por lípidos en arreglos bidimensionales).
- V- Describir cómo influye la reversión de la secuencia en péptidos bioactivos en su interacción con lípidos en la formación de estructuras en la interfase agua/aire.
- VI- Estudiar el efecto de glicoesfingolípidos complejos (gangliósidos) en la dinámica de fibrilación de β -amiloides.

Abreviaturas

POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilcolina
DSPC	1,2-diestearoil-- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilcolina
DMPC	1,2-dimiristoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilcolina
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosforilcolina
GM ₁	GM ₁ (Monosialogangliósido)
BAM	Microscopia de Ángulo de Brewster (Brewster Angle Microscopy)
SEM	Microscopia Electrónica por Scanning (Scanning Electron Microscopy)
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy)
FM	Microscopia de Fluorescencia (Fluorescence Microscopy)
PAP	Proporción de Área de Péptido
ThT	Thioflavina T
DiI-C18	(1,1'-dilinoil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianine perclorato)
Laurdan	1-[6-(dimetilamino)naftalen-2-il]dodecan-1-ona
AMM	Área Molecular Media (Mean Molecular Area)
AMP	Péptido anti-microbiano (Anti-Microbial Peptide)
LE	Líquido-Expandido
LC	Líquido-Condensado
LE→LC	Transición bidimensional de LE a LC
G _T	Mezcla de Gangliósidos Totales

**PUBLICACIONES REALIZADAS COMO CONSECUENCIA DE ESTE
TRABAJO DE TESIS Y COLABORACIONES INTERNACIONALES
REALIZADO POR ALAIN BOLAÑO ALVARES COMO
BECARIO-TESISTA**

-Melittin-solid phospholipid mixed films trigger amyloid-like nano-fibril arrangement at air water-interfase

Alain Bolaño Alvarez, Benjamín Caruso, Steffen B. Petersen, Pablo E. A. Rodríguez and Gerardo D. Fidelio.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1864 (2022) 184048.

doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184048

-Gangliosides smelt nanostructured amyloid A β (1–40) fibrils in a membrane lipid environment.

Bolaño Alvarez, Alain, Rodríguez, Pablo E.A. and Fidelio, Gerardo D.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes Volume 1864, Issue 1, 1 February 2022, 183749. doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183749

-Stitching together a nm thick peptide-based semiconductor sheet using UV light.

Alvarez, A.B., Pino, M., Petersen, S.B., Fidelio, G.D.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Volume 203, July 2021, 111734.

doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111734*

**(Este trabajo fue hecho en colaboración con un grupo danés que dirige el Dr. Steffen B Petersen de la Universidad de Aalborg, Dinamarca). Esta parte no fue incluida como parte experimental de esta Tesis.*

-A β -Amyloid Fibrils Are Self-Triggered by the Interfacial Lipid Environment and Low Peptide Content.

Alvarez, A.B., Caruso, B., Rodríguez, P.E.A., Petersen, S.B., Fidelio, G.D.

Langmuir, 2020, 36(28), pp. 8056–8065. doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00468

Capítulo I: INTRODUCCION

1.1 Enfermedad de Alzheimer: Papel de los lípidos en la fibrilación del A β amiloide

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común en las personas adultas constituyendo alrededor de un 60% a un 80% de los casos de demencia, afectando a un estimado de 24 millones de personas en el mundo [1, 2]. Aunque el factor de riesgo preponderante es la edad, la etiopatogenia y los mecanismos neurodegenerativos no son aún bien conocidos y puede desarrollarse en el cerebro incluso dos o tres décadas antes de que los primeros síntomas se vuelvan perceptibles [3]. Sin embargo, en muestras de tejido post mortem, la EA se caracteriza por dos lesiones neuropatológicas encontradas en el cerebro, placas neuríticas acompañadas de un núcleo extracelular insoluble de péptidos amiloides (**péptidos A β**) y agregados filamentosos intracelulares de proteínas tau fosforiladas denominados ovillos neurofibrilares [3, 4].

Se conoce que los péptidos A β amiloides (de 1-40 y 1-42 residuos de aminoácidos) se generan a partir de un probadamente mal procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide (por sus siglas en ingles “APP”) por dos modos diferentes: las vías *no amiloidogénicas* y *amiloidogénicas* [3, 5]. En la vía *no amiloidogénica*, la APP se escinde secuencialmente por la enzima *secretasa α* y la *secretasa γ* y se somete a endocitosis, lo que da como resultado una producción endosomal del péptido P3 no amiloidogénico. La vía *amiloidogénica* se caracteriza por una “sobre producción” de fragmentos de **péptidos A β** insolubles y neurotóxicos (1-40 y 1-42) a partir de la escisión de APP por las secretasa β y secretasa γ , lo que resulta en la formación de los péptidos A β (dominios hidrofóbicos transmembrana de APP) que son los precursores de las placas agregadas [6]. Esta visión se conoce como la hipótesis del A β amiloide, defendida por décadas [3].

Por estudios previos se ha propuesto que el proceso proteolítico de APP para generar péptidos A β está necesariamente asociado con el entorno de la membrana; sin embargo, se ha descuidado la implicación de los lípidos de membrana en los eventos tempranos de agregados patológicos o, mejor dicho, se les ha dado un rol más pasivo a los lípidos de membrana en dichos eventos. En este sentido, las “balsas lipídicas de membrana” (o su definición más precisa como nanodominios lipídicos transitorios) [7] se ha implicado en la acumulación de péptidos **A β** y la posterior participación en la patogénesis molecular de la EA [8-10].

La abundancia relativa de los lípidos varía en las membranas biológicas de diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) es un lípido fundamental en las membranas naturales por su importancia en la estructura y función de las membranas celulares [9]. Por otro lado se ha reportado que el POPC (ácidos grasos de cadena saturada) es el fosfolípido más abundante en el cerebro humano representando ~ 54% en comparación con el resto de fosfolípidos, por lo que su homeostasis tiene un rol fundamental en la función normal neuronal [11]. De allí el interés en conocer su abundancia relativa. En este sentido se ha informado que el nivel de fosfolípidos en el cerebro disminuye con la edad en casi un 50% entre los 40 y los 100 años [12]. Este aparente cambio “fisiológico” con la edad ha inducido a algunos investigadores a sugerir que la disminución de los niveles de fosfolípidos en el cerebro podría estar relacionada con EA [9], específicamente el fosfolípido POPC [13, 14]. Siguiendo esta línea de análisis se han realizado estudios en el líquido cefalorraquídeo humano (LCR) -que es la muestra biológica más informativa para monitorear los procesos patológicos en el cerebro-; los resultados han sugerido que un aumento en la hidrólisis del POPC podría estar asociado con EA [15].

Según la hipótesis del amiloide A β (comentada anteriormente), la “acumulación no fisiológica” de los péptidos A β desencadenaría una oligomerización temprana así como daños neuronales que llevarían a una mayor diseminación de la EA [3]. Ahora bien; *¿Hay una relación entre POPC con la “acumulación no fisiológica” de A β amiloide?* Dado que se conoce que la APP es una proteína transmembrana, y que la interacción adecuada con los fosfolípidos de la membrana o el procesamiento asociado a ella sin la liberación de péptidos A β contribuye a la dis-homeostasis en el cerebro [3, 16], se puede plantear que esa “acumulación no fisiológica” puede ser resultado directo de la modificación relativa en el contenido o la variación en el balance del contenido lípido/proteína en la membrana neuronal.

Se propone entonces que los fosfolípidos proporcionan un entorno óptimo para la función de las proteínas de membrana contribuyendo a su normalidad funcional, de allí que muchos autores han centrado sus estudios en la interacción de péptidos A β amiloides y derivados con lípidos utilizando sistemas modelo de membrana. En particular, se ha estudiado la interacción electrostática de segmentos 25-35 del péptido A β con vesículas de fosfolípidos cargados negativamente [17] y la secuencia completa de A β (1-40) con monocapas lipídicas aniónicas [18].

Los sistemas modelo de membranas son muy útiles para este tipo de estudios; un ejemplo concreto son las monocapas de Langmuir, una técnica adecuada para investigar el comportamiento interfacial de péptidos, lípidos y mezclas de ambos. Leblanc y colaboradores [19] han destacado el potencial de esta técnica para estudiar las propiedades superficiales de los péptidos A β amiloides. Por otra parte, permite estudiar la influencia del estado físico de lípidos y el grado de empaquetamiento lateral, así como propiedades superficiales de mezclas lípidos/péptidos imitando una interfase de membrana biológica.

Como antecedentes de estudios del grupo se ha descrito que A β (1-42) forma monocapas insolubles en la interfase aire/agua con una estabilidad lateral de alrededor de 30 mN·m⁻¹ y un área molecular a un empaquetamiento máximo de 2,5 nm²/molécula [20]. Además, se ha investigado interacciones de A β (1-42) con vesículas unilamelares gigantes (“GUVs” por sus siglas en inglés) donde se reportaron dos efectos importantes: (i) la reducción de las fuerzas cohesivas de la membrana lateral y (ii) ruptura del gradiente de transbicapa (GUV) que causa una liberación dependiente del tiempo de solutos encapsulados dentro de las GUVs [20].

Otros estudios recientes mostraron que los péptidos A β puros forman capas monomoleculares de hoja β estables y estructuradas en la interfase aire/agua y presentan un módulo de cizallamiento de alta reología particularmente alto en comparación con la toxina peptídica α -hélice melittin puro [21]. Recientemente se informó un comportamiento similar para la adsorción del C-terminal intrínsecamente desordenado de la nucleoproteína del virus Hendra (NTAIL) en la interfase aire/agua [22].

El concepto de Proporción de Área de Péptido (PAP) (que hace referencia a la contribución del área superficial del péptido relativa al lípido) es importante cuando las moléculas formadoras de monocapas tienen áreas moleculares individuales muy diferentes [23]. El porcentaje de PAP se puede calcular a partir de la siguiente fórmula: $PAP = 100(n_P A_P / (n_L A_L + n_P A_P))$, donde n_P y n_L son los moles de péptidos y lípidos en la mezcla y A_P y A_L son las áreas moleculares individuales de péptidos y lípidos, respectivamente.

Como parte de este trabajo de tesis se muestra que el péptido amiloide A β (1-40) forma estructuras fibrilares a bajas proporciones en sistemas mezcla con el lípido POPC. Estas proporciones, están entre 2,5% y 10% de A β amiloide respecto a lípido, estas estructuras fibrilares fueron evidenciadas mediante fluorescencia usando la sonda Thioflavina T (ThT), microscopía de ángulo de Brewster (BAM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Además, también se demuestra que el efecto de fibrillogénesis inducido por POPC en la interfase aire/agua es sensible al estado físico de los fosfolípidos puesto que el comportamiento de mezcla del péptido A β con 1,2-distearoil-fosfatidilcolina (DSPC), un lípido en el estado líquido-condensado a temperatura ambiente, muestra inmiscibilidad lateral sin formación de estructuras fibrilares. De manera general las condiciones interfaciales en las que la mezcla de péptido A β amiloide/POPC inducen estructuras fibrilares dependen del estado físico del lípido (líquido-expandido) y de la proporción de A β amiloide.

1.2 Concepto de transición de fase bidimensional en la formación-disolución de fibras de A β amiloide en interfases organizadas.

Pese a la gran cantidad de información acumulada sobre los eventos moleculares asociados a la enfermedad de Alzheimer, aún existe gran desconocimiento que impide llegar a una comprensión más profunda y específica del mecanismo molecular por el cual los amiloides inducen disfunción celular y finalmente la muerte neuronal [24, 25]; tampoco está claro si la mera presencia de las estructuras fibrilares de A β amiloides son los causantes de los eventos iniciales en la patogenia de la enfermedad, aunque este hecho es ampliamente debatido y nos puede llevar a hacernos la siguiente pregunta: *¿Qué pasaría si se disuelven las estructuras fibrilares usando moléculas del ambiente natural de membrana?* Para contestar esta pregunta importante introducir un concepto recientemente conocido como: **“transición de fase estructural”** que caracteriza las rupturas bruscas de la asimetría de una disposición molecular acompañada de una disfunción celular. Esta definición incluye la transición de fase (patológicas) de los amiloides, cuando la separación en una o más fases coexistentes puede ocurrir en el citosol [24]. En el campo de la biofísica de bio-membranas, la coexistencia de fases es bien conocida desde hace mucho tiempo [7, 26], y un cambio en el dinamismo de la membrana puede causar “salud” o “enfermedad” en relación a la homeostasis de la célula [27]. Teniendo en cuenta lo anterior, podemos extender los conceptos de Mathieu et al. [24] a biomembranas. Por lo tanto, si la generación de los A β amiloides tiene lugar en la superficie de la membrana (como se explicó anteriormente), estos pueden indicarse como "eventos tempranos" que alteran la homeostasis de la membrana y conducen a la muerte celular y, lentamente, a la patogénesis irreversible de la EA. Por otro lado, existen evidencias de defectos en la transición de fase de proteínas individuales a condensados de múltiples componentes que

forman estructuras fibrilares en citosol que pueden conducir a la neurodegeneración [24]. En este sentido, si aplicamos el mismo concepto en las membranas que presentan biomoléculas como los lípidos POPC (en estado líquido-expandido), que junto con los péptidos A β son capaces de formar estructuras fibrilares a baja proporción peptídica [28]; podríamos comprender mejor la formación de fibras de A β amiloide a nivel molecular.

Por lo tanto, conociendo la importancia de la proporción de péptido amiloide en la estructuración fibrilar de A β , es importante destacar que el procesamiento proteolítico enzimático de la proteína precursora de amiloide (APP) para producir péptidos A β tiene lugar en el entorno de la membrana neuronal con su diversidad adecuada [3] lo que también puede depender del largo de la cadena hidrofóbica de lípidos de igual estado físico (líquido expandido como: DMPC y POPC). POPC es uno de los principales fosfolípidos constituyentes de las membranas de neuronas [11]. Físicamente, el POPC tiene un carácter líquido expandido en la interfase aire/agua y una temperatura de transición de $-3,7^{\circ}\text{C}$ [29].

En la comunidad científica ha sido muy debatido el papel de los gangliósidos en el proceso de formación de estructuras fibrilares de tipo amiloides, los gangliósidos son glicoesfingolípidos complejos que contienen ácido siálico en su grupo polar, están presentes de forma natural en la membrana plasmática de la mayoría de las células de los vertebrados, son particularmente abundantes en el sistema nervioso, donde constituyen hasta el 10 % de la masa lipídica total del cerebro [30]. Los gangliósidos tienen un resto de ceramida como porción hidrófoba unida a una cadena de oligosacárido que sobresale como grupo polar hidrófilo (**Figura 1.1**); estos glicolípidos anfifílicos complejos tienen un carácter líquido-expandido en la interfase aire-agua [31, 32] y un rango de temperatura de transición que oscila entre 19 y 35°C [31, 33, 34]. Además, se insertan en la hemicapa externa de los dominios de la membrana y su fuerte carácter anfifílico juega un papel en la estabilización de las bicapas lipídicas [35, 36]. Los dominios de membrana que contienen gangliósidos también están enriquecidos en colesterol y tienen un bajo contenido de proteínas [37].

Teniendo en cuenta la heterogeneidad y las cargas negativas involucradas en la fracción oligosacárido dadas por el ácido siálico, pueden ocurrir algunas interacciones específicas con proteínas en la superficie neuronal [33, 38-40].

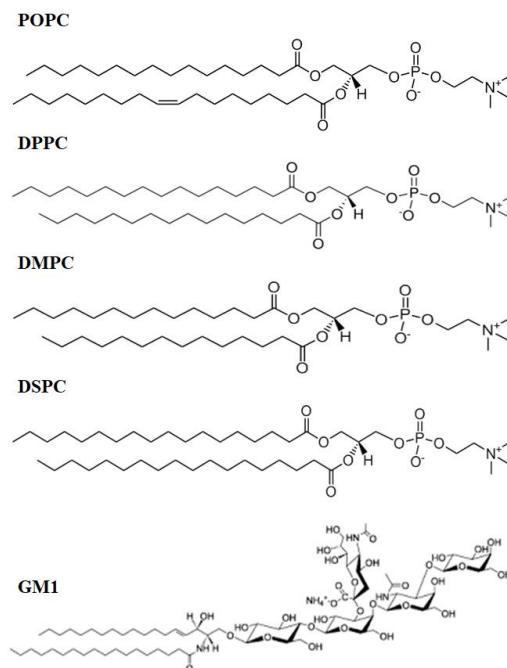


Figura 1.1: Representación estructural de los lípidos POPC, DPPC, DMPC y DSPC así como del glicoesfingolípidio gangliósido GM₁.

Por estudios teóricos y experimentales de membranas artificiales, se sugirió que la interacción gangliósido-lípido puede inducir la formación de un dominio de membrana debido a: i) la red de enlaces de hidrógeno en la interfase lípido-agua; ii) interacción carbohidrato-agua; iii) la geometría de los grupos de cabeza hidrofílicos de los gangliósidos, así como su capacidad para interactuar con el agua y iv) el contenido específico de cadenas alquílicas saturadas [37]. Con respecto a la interacción gangliósido-lípido, mediante estudios de resonancia paramagnética de electrones, puede ocurrir un evento especial de separación de fase en el lípido POPC inducido por gangliósidos, debido a una interacción cooperativa lateral entre las moléculas de gangliósido que reducen la fluidez en las bicapas de POPC [36, 41]. Además, se informó que el resto hidrofóbico del gangliósido tiene un papel en la separación de la fase lipídica que depende de la longitud de la cadena hidrofóbica, así como del grado de insaturación [41-43]. En esta tesis se muestra evidencia experimental que busca una comprensión directa sobre los mecanismos moleculares biofísicos involucrados en la dinámica de disolución (“**transición de fase estructural**”) en la interfase agua/aire, de las estructuras fibrilares que puede transformar de oligómeros a monómeros y viceversa en un entorno de membrana, lo que puede ser regulado por el contenido relativo de gangliósidos. Nuestro estudio intenta trazar una guía de futuros

diseños experimentales para precisar cuál es realmente la estructura o arreglo protéico que puede dañar la membrana neuronal provocando finalmente la muerte celular.

Dependiendo de la entidad molecular del amiloide (oligómeros o estructura similar a fibrillas) que es dañina para las células neurales, los gangliósidos pueden ser vistos como beneficiosos o promotores del daño de la membrana. En vista de nuestros resultados y teniendo en cuenta que la hipótesis de la toxicidad de los oligómeros es muy discutida [44]; si los gangliósidos disuelven y facilitan la transición del estado fibrilar al estado de oligómeros, puede ser perjudicial si las especies tóxicas son los oligómeros en la membrana. De lo contrario, si la estructura tóxica que está preformándose en la membrana neural es una estructura de tipo fibrilar entonces, los gangliósidos pueden ser beneficiosos para la homeostasis de la membrana.

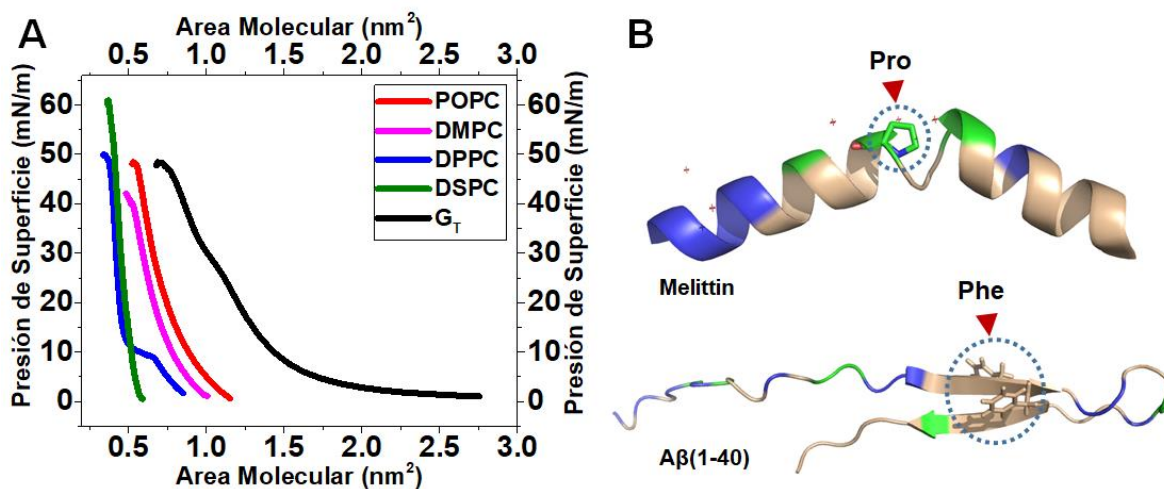


Figura 1.2: Isothermas de compresión lateral los lípidos y gangliósidos totales. Estructuras de péptidos estudiados. **A:** Isothermas de los lípidos POPC, DMPC, DPPC (25 °C), DSPC y Gangliósidos Totales (G_T) estudiados en mezclas con péptidos. **B:** Estructuras 3D de los péptidos melittin y Aβ(1-40). En color azul se marcan los aminoácidos polares cargados, en verde los polares neutros y en color trigo los aminoácidos hidrofóbicos. Las puntas de flechas rojas señalan: 1- Como el aminoácido **Pro** en el péptido Melittin quiebra la α-hélice. 2- El aminoácido **Phe** que forma parte de la región hidrofóbica en el péptido Aβ(1-40); esta región es importante para la fibrilación y el marcaje con ThT. Las representaciones de los péptidos se realizaron usando el visualizador PyMol.

1.3 Péptidos amiloides truncados Aβ(1-37/38/39)

Los péptidos Aβ truncados de 37, 38 y 39 aminoácidos son variantes obtenidas a partir de los Aβ(1-40) y Aβ(1-42), los mismos han sido encontrados en el LCR [45, 46] y en el plasma sanguíneo [47] de manera que en estos fluidos hay una importante heterogeneidad en cuanto al contenido de Aβ amiloides [48]. Sin embargo, están en mucho menor proporción que los Aβ de

40 y 42 aminoácidos [46]. Es importante destacar que estas variantes truncadas pueden dañar la vasculatura del cerebro produciendo angiopatías amiloidogénicas de cerebro [49, 50] y particularmente la variante A β (1-38) se ha visto incrementada en un tipo de EA como es la EA-familiar [50]. Pese a todas estas evidencias se ha planteado estas variantes no están asociadas con la demencia en la EA pero si con un declive de la capacidad cognitiva [51]. Recientemente se ha estudiado que el A β (1-38) experimenta interacción con el A β (1-42) teniendo un importante rol en la formación de agregados [48].

1.4 Interacción de la toxina Melittin con fosfolípidos

Algunos péptidos antimicrobianos (AMP, siglas en inglés) anfifílicos y catiónicos han sido bien estudiados por sus propiedades amiloidogénicas ya que pueden ser estructurados en forma de fibras, entre estos están dermaseptin S9, longipin y protegrin-1 que es un péptido procedente de leucocitos humanos. Teniendo en cuenta esta relación AMP-Amiloide, nos podrían sugerir que los péptidos amiloides humanos tienen un rol fisiológico que va más allá de ser agentes patológicos lo cual incluye efectos desestabilizantes específicos sobre la membrana neuronal [52-54]. De acuerdo a lo anteriormente planteado los AMP han sido usados para estudiar su actividad tóxica y amiloidogénica [55] lo que muestra una clara conexión entre AMP y la formación de amiloides revelando la existencia de una nueva clase de péptidos bioactivos. Dichos péptidos pueden adoptar conformación en hoja β al unirse a membranas de acuerdo a resultados de FT-IR y fluorescencia usando la sonda ThT [53, 56]. Por otra parte, otros investigadores resaltan que los eventos de separación de fase basados en una interacción lípido/péptido específica [57, 58] podrían guiar el ensamblaje de pequeños oligómeros para favorecer la formación de canales en la membrana (esto ha sido planteado para péptidos amiloides [59]), este efecto ha sido observado en protegrin-1 mediante AFM y simulaciones de dinámica molecular [56]. Estudios en interfase agua/aire para evaluar interacciones lípido/proteínas han mostrado la importancia de los procesos de oligomerización-fibrilación. Sin embargo, los datos publicados son divergentes ya que algunos investigadores destacan la dependencia de la carga y la insaturación de fosfolípidos como (POPG) en el proceso de interacción como ha ocurrido en el caso de PrP una proteína prionica estudiada en modelos de membrana de monocapas lipídicas [60]. Sin embargo, de acuerdo a Caillon et, al. [54], el péptido

dermaseptin S9 se inserta más eficientemente en monocapas de POPC que en monocapas de POPG, lo que demuestra que las interfaces aniónicas no determinan la especificidad del péptido. De manera que la idea principal es tratar de encontrar alguna conexión entre el mecanismo de acción de las proteínas amiloidogénicas y los péptidos antimicrobianos, dejando claro que ambos péptidos son capaces de producir muerte celular a través de una interacción lípido/péptido específica. Aunque la unión de los péptidos puede no estar asociada a ruptura de la membrana y el daño a la membrana puede depender de una particular mezcla de lípidos [61] se deduce que ciertas propiedades interfaciales deben juntarse para llevar a un daño de la membrana.

Uno de los péptidos bioactivos de membrana más estudiados es el melittin que como la mayoría de los AMPs (ver base de datos en [62]) es catiónico y anfifílico con un espectro de acción contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas [63]. El melittin fue descubierto en el 1970 y es un importante componente del veneno de abejas (también es llamado apitoxina) europeas *Apis mellifera* [64, 65]. Este péptido tiene 26 aminoácidos es su estructura lineal: Gly₁-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln₂₆-NH₂ con una carga neta de 6+ a pH fisiológico [63, 66]. Melittin tiene dos α -hélices conectadas mediante un residuo de Pro en el aminoácido 14 y con un residuo hidrofóbico y otro hidrofílico en las regiones N-terminal y C-terminal respectivamente [64] (**Figura 1.2B**). Los efectos citotóxicos de melittin fueron también explorados contra células cancerosas, como han mostrado recientemente varios autores [67-69] debido a sus rápidos y directos efectos en membrana de células de cultivo [70]. Sin embargo, el desarrollo de estrategias de direccionamiento (delivery systems) es de gran importancia debido a sus efectos líticos inespecíficos a nivel celular [71]. Pese a todos estos estudios, el mecanismo de acción de melittin no está bien claro y es algo controversial. Algunos autores afirman que actúa mediante la formación de poros mientras que otros sostienen que la ruptura de la membrana ocurre a través de un mecanismo tipo detergente [72, 73]. Este pobre entendimiento del mecanismo de acción de melittin con membranas celulares es debido a su pequeño tamaño, a la formación de oligómeros dado por efectos cooperativos de interacción lípido/péptido en la interfase así como a la composición lipídica de la membrana [66, 74], además de diversos factores experimentales tales como temperatura, fuerza iónica concentración de péptidos en solución entre otros [72, 75, 76]. Otra variable no menos importante es la relación lípido/péptido empleada. En el mecanismo propuesto en dos etapas para la inserción en membrana (desde un

estado isotrópico y soluble a uno donde el péptido está insertado y organizado en la membrana) se destaca que la transición toma lugar cuando la relación lípido/péptido sobrepasa un umbral [77, 78], este umbral es sensible a la composición lipídica [79]. En este sentido, estudios de simulaciones moleculares por grano grueso plantean que dependiendo de la relación lípido-(POPC)/melittin el sistema puede adoptar diferentes arreglos que describen interacciones lípido/péptido. Particularmente relaciones altas lípido/melittin donde se manifiesta un “efecto de extracción de lípidos” se plantea como un re-arreglo micelar en 3D [80].

Por otra parte, el estado físico del lípido también puede afectar la interacción del péptido en la membrana [81] como lo hace la diferencia de composición lipídica entre las dos hemicapas de bicapas, impactando en la asimetría de la membrana dado por interacciones de melittin con cadenas de ácidos grasos de los lípidos [82, 83]. Un estudio computacional donde se usaron varios lípidos de diferentes estados físicos desde un estado líquido-expandido a un estado líquido-condensado tales como DHPC, DLPC, DPPC y DSPC, mostró una mayor fortaleza de unión en la interacción DSPC/melittin [81]. En este sentido se mostró una reducción significativa de la energía libre en procesos de difusión transmembrana (flip-flop) para el lípido DSPC en presencia de melittin. En este estudio los autores proponen una asociación de la región polar del lípido con los residuos hidrofóbicos del péptido facilitando la inserción de una mitad de la membrana a la otra mitad, lo que resulta en una disminución en el espesor de la membrana inducido por los procesos de flip-flop favoreciendo la inserción del péptido [84].

En este trabajo de tesis pretendemos demostrar que el estado físico del lípido (líquido-expandido vs. líquido-condensado) y la proporción de la mezcla lípido/péptido son altamente determinantes para inducir fibrilación en péptidos amiloides como los A β (1-40/42) y también en AMP como la toxina melittin. Nuestros resultados muestran un estudio completo en monocapas de Langmuir de film mezclas de estos péptidos (A β (1-40/42), A β (1-37/38/39) y melittin con cuatro fosfolípidos zwitteriónicos que difieren en su estado físico a temperatura ambiente: en estado líquido-expandido POPC y DMPC y en estado líquido-condensado DSPC. Además, utilizamos el DPPC que muestra transición de fase de LC a LE. Por otra parte, probamos el efecto de gangliósidos totales en la inhibición de la formación de fibras, así como la disolución de fibras previamente formadas.

Para verificar la formación de estructuras fibrilares se utilizó la sonda fluorescente ThT que permite mostrar un arreglo estructural similar a péptidos amiloides. Se utilizaron condiciones experimentales en termino de fuerza iónica equivalentes a condiciones fisiológicas (145mM de

NaCl) y la formación de estructuras fibrilares en la interfase agua/aire se realizó a temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$). De manera que la inducción de las fibras en la interfase agua/aire no requirió la presencia de solventes orgánicos que pueden generar condiciones de microambiente drásticas.

CAPITULO II. RESULTADOS Y DISCUSION

2.1 Interacción del péptido amiloide A β con lípidos en capas monomoleculares de Langmuir

2.1.1 *Implicaciones del estado de fase lipídico en la interacción con amiloides y su papel en la formación de fibras amiloides*

2.1.1.1 *Propiedades de superficies de A β (1-40) en monocapas de Langmuir mezcla con POPC y DSPC. II-Área Isotermas y análisis de Imágenes de BAM*

Las monocapas insolubles de moléculas anfifílicas pueden formarse en la interfase agua aire [85]. Con el empleo de una cuba de Langmuir dichas monocapas insolubles pueden ser sometidas a procesos de compresión-descompresión usando barreras móviles para generar cambios proporcionales en la presión de superficie y el área molecular media permitiendo construir las Isotermas de compresión Langmuir. La presión de superficie definida como $\pi = \gamma_0 - \gamma$ es la diferencia entre la tensión superficial de la subfase pura (γ_0) y la tensión superficial de la superficie cubierta de moléculas anfifílicas (γ) que depende del empaquetamiento lateral, concentración de moléculas en la superficie y del comportamiento de miscibilidad de los componentes de la monocapa [85-88]. Una visión más moderna sobre el origen de los valores de la presión superficial está relacionada con los cambios en la actividad del agua superficial en la interfase [89]. De acuerdo con resultados previos publicados por el grupo, ambos péptidos A β (1-42) y A β (1-40) tienen idénticos comportamientos en monocapas en la interfase agua/aire [20, 21]. Las monocapas puras formadas en la interfase agua/aire por estos péptidos amiloideos A β tienen una estabilidad lateral de aproximadamente de $30 \text{ mN/m} \pm 1.5 \text{ mN/m}$ y un área molecular a máximo empaquetamiento de $2.5 \text{ nm}^2/\text{molécula} \pm 1.5\% \text{ nm}^2/\text{molécula}$ (**Figura 2.1**). Es importante destacar que la estabilidad máxima de A β puro esta entre el valor de estabilidad del péptido melittin (ver **punto 2.2**) que muestra $\sim 19 \text{ mN/m}$ y la estabilidad de fosfolípidos puros en estado líquido expandido de alrededor de $\sim 40 \text{ mN/m}$ [90], pese a que los

péptidos A β puros muestran un comportamiento típico de estado sólido en monocapas y con propiedades reológicas muy peculiares [21]. Las imágenes de BAM obtenidas a partir de monocapas de péptidos A β puro son homogéneas sin formación de estructuras fibrilares (Figura 2.1). Los componentes amiloides puros mostraron un comportamiento ThT negativo (ver Figura 2.4).

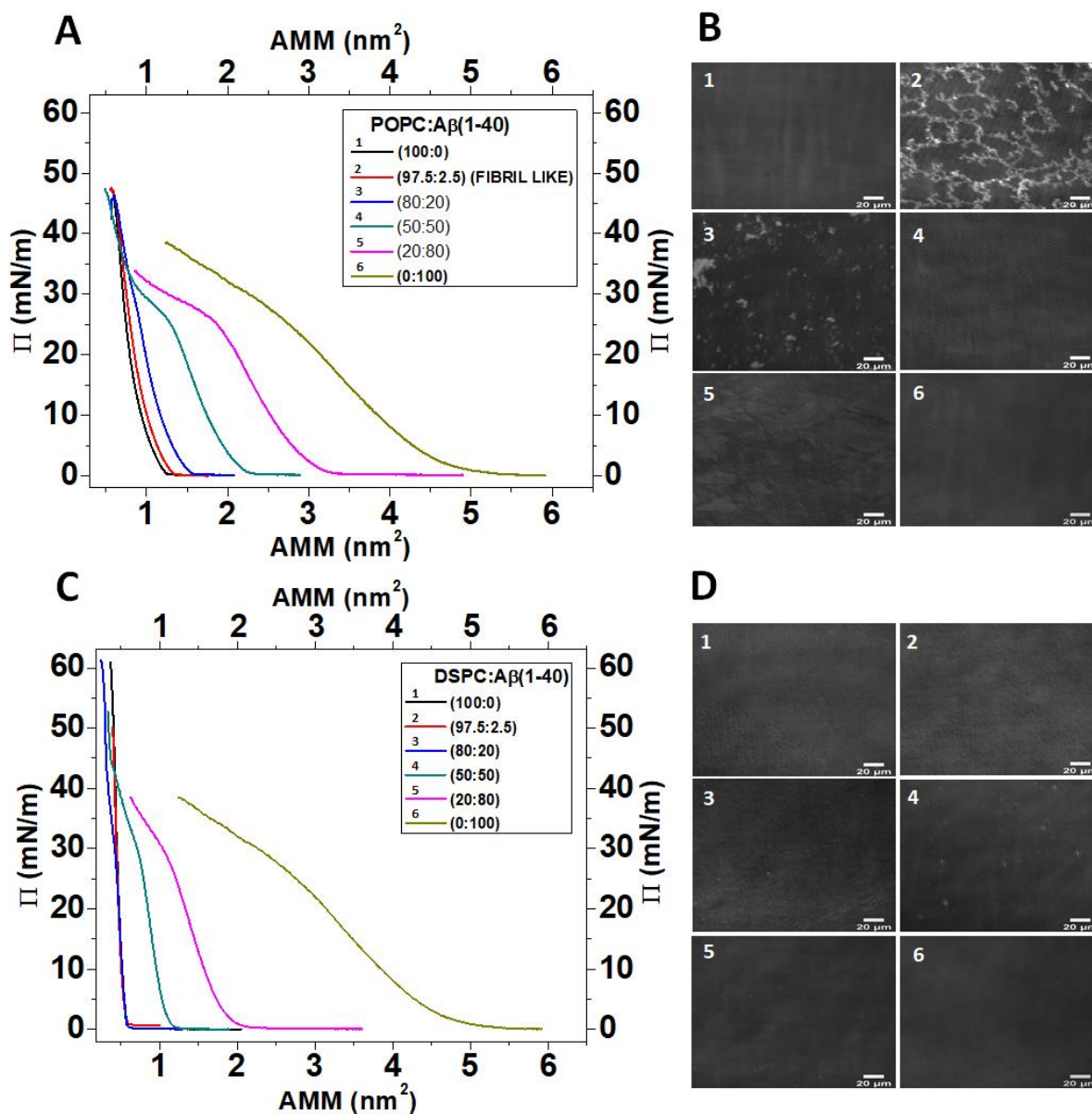


Figura 2.1: Comportamiento superficial del péptido A β (1-40) en monocapas de Langmuir mezclas. Isothermas Π -área correspondientes a mezclas de (A) POPC/A β (1-40) o (C) DSPC/A β (1-40) y sus respectivas imágenes de BAM (B,D) obtenidas a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en monocapas puras y mezcla a los porcentajes indicados de PAP. La fracción molar de lípido/péptido en la mezcla POPC/A β (1-40) para cada isoterma fueron de 1:0; 0,995:0,005; 0,952:0,047; 0,835:0,164; 0,558:0,441 y 0:1, respectivamente. Mientras que para la mezcla DSPC/A β (1-40) fueron de 1:0; 0,997:0,003; 0,971:0,029; 0,892:0,108; 0,674:0,326 y 0:1 respectivamente. En la mezcla POPC/A β (1-40) a 97,5:2,5 de proporción área péptido, la mezcla muestra estructuras similares a

fibras (imagen B-2), sin embargo la imagen B-3 en 80:20 de PAP muestra dominios, lo que es indicativo de un comportamiento de inmiscibilidad diferente a la proporción de 97,5:2,5. Por el contrario en la mezcla de DSPC/A β (1-40) se apreciaron comportamientos diferentes con homogeneidad a las mismas proporciones (inmiscibilidad sólido-sólido). AMM: Área Molecular Medio, la barra sólida en las imágenes representa 20 μ m.

En este trabajo de tesis estudiamos el comportamiento en interfase agua/aire de mezclas del péptido amiloide A β (1-40) con tres fosfolípidos que difieren en su estado físico en monocapa a temperatura ambiente en interfase aire/NaCl 145 mM de subfase. El primero es el POPC cuyas isothermas muestran un comportamiento líquido expandido (**Figura 2.1A y S1**), el segundo es DSPC que cuyas isothermas informan de su estado líquido condensado (**Figura 2.1C**) mientras que el tercero es el DPPC que experimenta transiciones de fases desde la fase fluida hasta fase gel a temperatura ambiente, en este caso estudiamos la formación de fibras desde la fase fluida hasta el inicio de la fase gel a diferentes temperaturas.

Para apreciar con más detalle el eje X de las isothermas de la figura 2.1 ver **Figura S1**. Con el fin de evaluar la influencia de las proporciones de A β (1-40) en la mezcla se utilizó las siguientes PAP en la mezcla con ambos lípidos 97.5:2.5, 80:20, 50:50 y 20:80 calculadas de acuerdo a lo indicado anteriormente. A cada valor de proporción de área de péptido le corresponde un valor de fracción molar para POPC de 0.995; 0.952; 0.835 and 0.558 respectivamente (**ver Figura 2.1**). El concepto de proporción de área de péptido adquiere gran significado cuando se mezclan proteínas con lípidos, debido a que existe una gran diferencia en sus áreas moleculares individuales por lo que una pequeña fracción molar de proteínas puede corresponder con una gran superficie ocupada en la monocapa, teniendo así una gran influencia en el comportamiento interfacial de la mezcla [23, 90].

Contrariamente a lo que ocurre con el POPC y de acuerdo a lo observado en las imágenes de BAM, la mezcla de DSPC/A β (1-40) no evidenció la formación de estructuras fibrilares independientemente de la proporción de péptido amiloide en la mezcla (**Figura 2.1D**). Como consecuencia todas las mezclas de DSPC/amiloide mostraron inmiscibilidad sólido-sólido y su punto de colapso mostro valores similares al del péptido puro (**Figura 2.1C, 2.2 y S1**). Para un mayor detalle en la **Figura 2.1D** se muestran las isothermas π -A de la mezcla DSPC/A β (1-40) con las correspondientes imágenes de BAM tomadas a 10 mN/m. A este empaquetamiento lateral (10 mN/m) el área molecular del péptido A β (1-40) es de 3.92 nm²·molec⁻¹, el área molecular de POPC es de 0.94 nm²·molec⁻¹ y la de DSPC de 0.52 nm²·molec⁻¹, de manera que las isothermas mezclas se mueven hacia mayores valores de áreas moleculares a medida que la fracción molar del péptido A β (1-40) se incrementa.

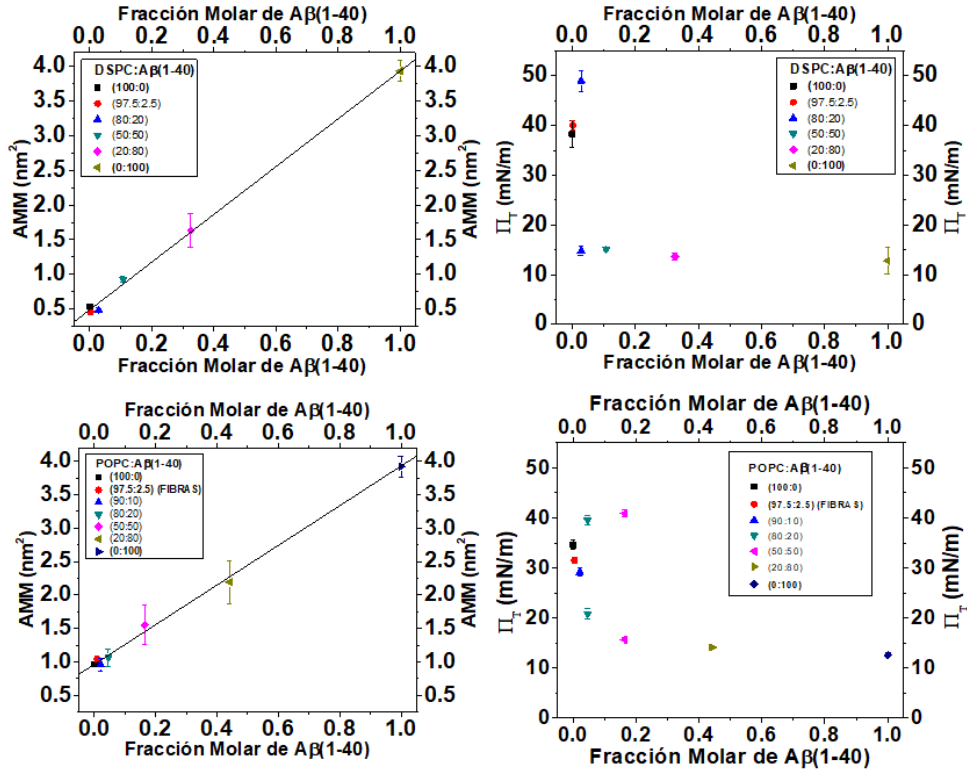


Figura 2.2. Diagrama de fase y de miscibilidad del péptido A β (1–40)/fosfolípido.

Parte superior: diagrama de fase para mezclas DSPC/A β (1–40) que muestra la inmiscibilidad lateral; a la izquierda: AMM vs. la fracción molar tomada a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; a la derecha: primer punto de colapso en la isoterma π -área. **Parte inferior:** Diagrama de fase para las mezclas POPC/A β (1–40). Izquierda: AMM vs. fracción molar tomada a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; derecha: primer punto de colapso en la isoterma π -área. La mezcla POPC/A β (1–40) muestra un comportamiento de miscibilidad complejo. Aquí, incluimos una mezcla adicional (90:10) para una descripción más completa del análisis de miscibilidad. En las mezclas POPC/A β (1–40) a (80:20) y (50:50) de Proporción de Área de Péptido (PAP), la mezcla muestra un comportamiento de inmiscibilidad lateral. A una proporción más baja de péptido A β , la mezcla muestra un comportamiento de miscibilidad parcial en el que el primer punto de colapso correspondería a la fase enriquecida con proteína en un valor superior al observado para el amiloide puro (consulte las **Figuras 2.1** y **S1** para obtener más detalles). La presión de transición (Π_T) significa el primer punto de discontinuidad calculado por la segunda derivada de la isoterma π -área con respecto al área. En proporciones de péptido intermedias, también observamos una segunda presión de transición (punto de colapso) relacionada con la fase enriquecida con lípidos (Sección experimental y la **Figura S2**). La línea negra recta en las partes superior e inferior izquierdas corresponde al área molecular de mezcla ideal (ver la Sección Experimental para más detalles). Las barras de error hacen referencia a la desviación estándar de entre 3 y 5 experimentos.

En cambio, el comportamiento de miscibilidad con POPC es completamente diferente apreciándose en las imágenes de BAM estructuras fibrilares a la proporción de 2.5 % de PAP (**Figura 2.1B** y **2.2**). A esta PAP la fracción molar de amiloide corresponde a 0.005. Dichas

estructuras fibrilares también se observaron hasta un 10 % de PAP donde las fibras formadas mostraron un comportamiento ThT positivo (**Figura 2.4**). Si la proporción de A β (1-40) incrementa por encima de un 10 % de PAP desaparecen las estructuras fibrilares y el análisis de ThT se torna negativo.

A partir de las isotermas, tanto de las mezclas como de los componentes puros, se pueden construir diagramas de fases [91] como el mostrado en la **Figura 2.2**. En el caso de la mezcla DSPC/A β (1-40) el primer punto de colapso (primer punto de discontinuidad en la isoterma Π -área, ver **Figura S2**) es compatible con la fase de proteína y aparece independiente de la proporción de A β (1-40), indicando una inmiscibilidad solido-solido a todas las proporciones de péptido A β usadas (ver **Figura 2.2** parte superior).

Sin embargo, para la mezcla POPC/A β (1-40) el comportamiento de miscibilidad es más complejo. A bajas proporciones de A β (1-40) (por debajo del 10% de PAP o menos del 0.03 de fracción molar de péptido amiloide), el análisis de miscibilidad sugiere que las mezclas son miscibles o tienen miscibilidad parcial porque el primer punto de colapso tiene un valor intermedio entre POPC puro y el péptido A β (1-40) puro, lo que coincide con la formación de estructuras fibrilares, que también fueron observadas por AFM y marcadas fluorescentemente con ThT (**Figura 2.4**). A mayores a mayores proporciones de A β (1-40) el comportamiento de la mezcla fue ideal (**Figura 2.2** parte inferior).

Debido a que el comportamiento de la mezcla POPC/A β (1-40) es más complejo realizamos un análisis de mayor precisión a partir de las imágenes de BAM. En este análisis determinamos la variación de reflectividad con la compresión de la monocapa mezcla de modo que podemos discriminar tres grupos de valores bien definidos de reflectividad (**Figura 2.3A** resaltado con diferentes colores). En la **Figura 2.3A** los valores mayores de reflectividad corresponderían al péptido A β (1-40) puro, mientras que los menores valores de reflectividad son similares a los calculados para POPC puro (fase de lípido puro), el tercer conjunto de valores calculados mostró reflectividades intermedias, lo que es atribuible a una mezcla más enriquecida en proteínas que incluyen las estructuras fibrilares. A las proporciones 80:20 y 20:80 la monocapa mezcla también mostro valores de reflectividades intermedios (**Figura 2.3A**) similar a lo que ocurre a la proporción 97.5:2.5 de PAP (fracción molar de A β (1-40) de 0.005) donde se apreciaron estructuras fibrilares (**Figura 2.3B**).

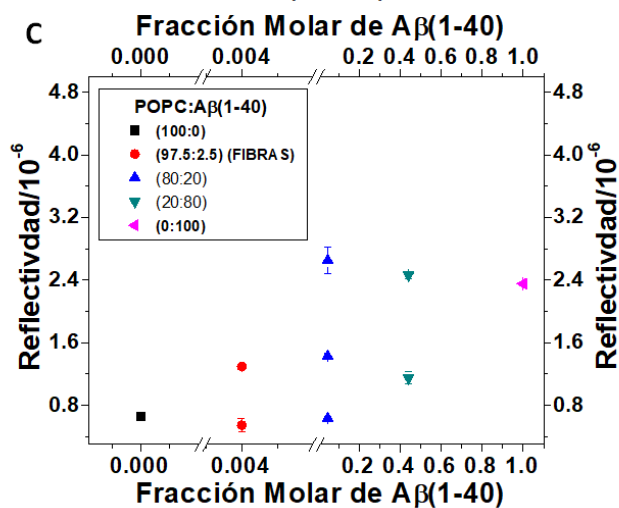
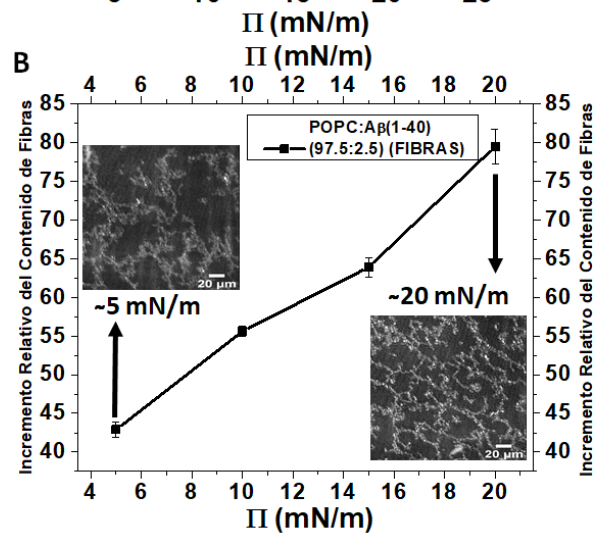
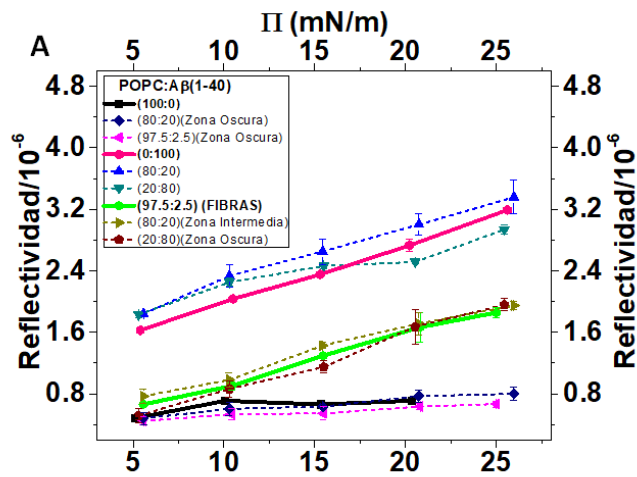


Figura 2.3: Análisis de reflectividad BAM de monocapas mixtas de POPC/A β (1-40).

A: Valores de reflectividad que indican los tres regiones apreciables en intensidad de imágenes BAM de mezclas POPC/A β (1-40) indicadas con tres colores diferentes. Los valores más bajos están cerca de los valores del lípido POPC puro (negro); los valores del rango de alta reflectividad fueron similares a los péptidos A β (1-40) puros (magenta); y los valores intermedios de reflectividad corresponden a estructuras fibrilares o fases enriquecidas con proteínas (verde claro). El recuadro muestra el origen de los datos indicando la Proporción de Área de Péptido (PAP) y la zona en las imágenes donde se tomaron los valores de reflectividad graficados.

B: Incremento Relativo del Contenido de Fibras a medida que aumenta la presión superficial en la mezcla POPC/A β (1-40) a la PAP de 97,5:2,5; recuadro izquierdo: imagen de estructuras fibrilares tomadas a baja presión superficial, recuadro derecho: imagen de estructuras fibrilares tomadas a alta presión superficial. El porcentaje de contenido relativo de fibrillas en **B** se calculó digitalmente para cada imagen, entre un estado totalmente negro (0 %) y otro estado donde todo era brillante en la escala de grises (100 %) utilizando el software Fiji ImageJ. **C:** Valores de reflectividad de las imágenes de BAM de POPC puro, A β (1-40) puro y de las diferentes proporciones de POPC/A β (1-40) tomados en los dominios apreciables a 15 mN·m⁻¹. Las barras de error hacen referencia a la desviación estándar de entre 3 y 5 experimentos.

Es importante destacar que a esta proporción crítica de amiloides, las estructuras fibrilares muestran un incremento relativo que es proporcional al incremento de la presión superficial (**Figura 2.3B**). Por otra parte a la proporción de 20% de A β (1-40) mostró valores intermedios de reflectividad sin la aparición de fibras, pero se detectaron dominios con valores altos de reflectividad. Mientras que a la proporción de 50% de A β (0.047 de fracción molar de amiloide) la mezcla se comportó similar A β puro (**Figura 2.3C**).

2.1.1.2 Imágenes de AFM y análisis por fluorescencia usando la sonda ThT en monocapas de POPC/A β (1-40) transferidas a un soporte de mica

Es bien conocido que el fluoróforo ThT tiene propiedades fluorescentes particulares cuando interactúa con fibras amiloides en solución [92, 93] o en superficies cuando se usa microscopia de fluorescencia (FM, *siglas en inglés*) de reflexión interna total [94]. Para este trabajo de tesis hemos adaptado un método para transferir monocapas mezcla a un soporte de mica, seguido de una incubación con una gota de solución acuosa de ThT por 10 min, para luego observar por FM (ver Sección Experimental). Dicha metodología la hemos utilizado rutinariamente para chequear si las estructuras fibrilares se forman en la mezcla POPC/A β (1-40) a 97.5:2.5 de PAP y observadas por BAM son ThT positivas. En este sentido la monocapa transferida a esta proporción muestra un patrón de fluorescencia similar a estructuras fibrilares de tipo amiloides, mientras que las monocapas de los componentes puros (controles negativos) mostraron un comportamiento ThT negativo (**Figura 2.4B**) al cuantificar la intensidad de fluorescencia tanto de la mezcla como de sus componentes. Por otra parte, usamos fibras de α -sinucleína formadas

en solución como control positivo para chequear la técnica de transferencia y la interacción de ThT con las fibras amiloides y comparar con los valores obtenidos para la mezcla transferida al soporte de mica (**Figura 2.4B**).

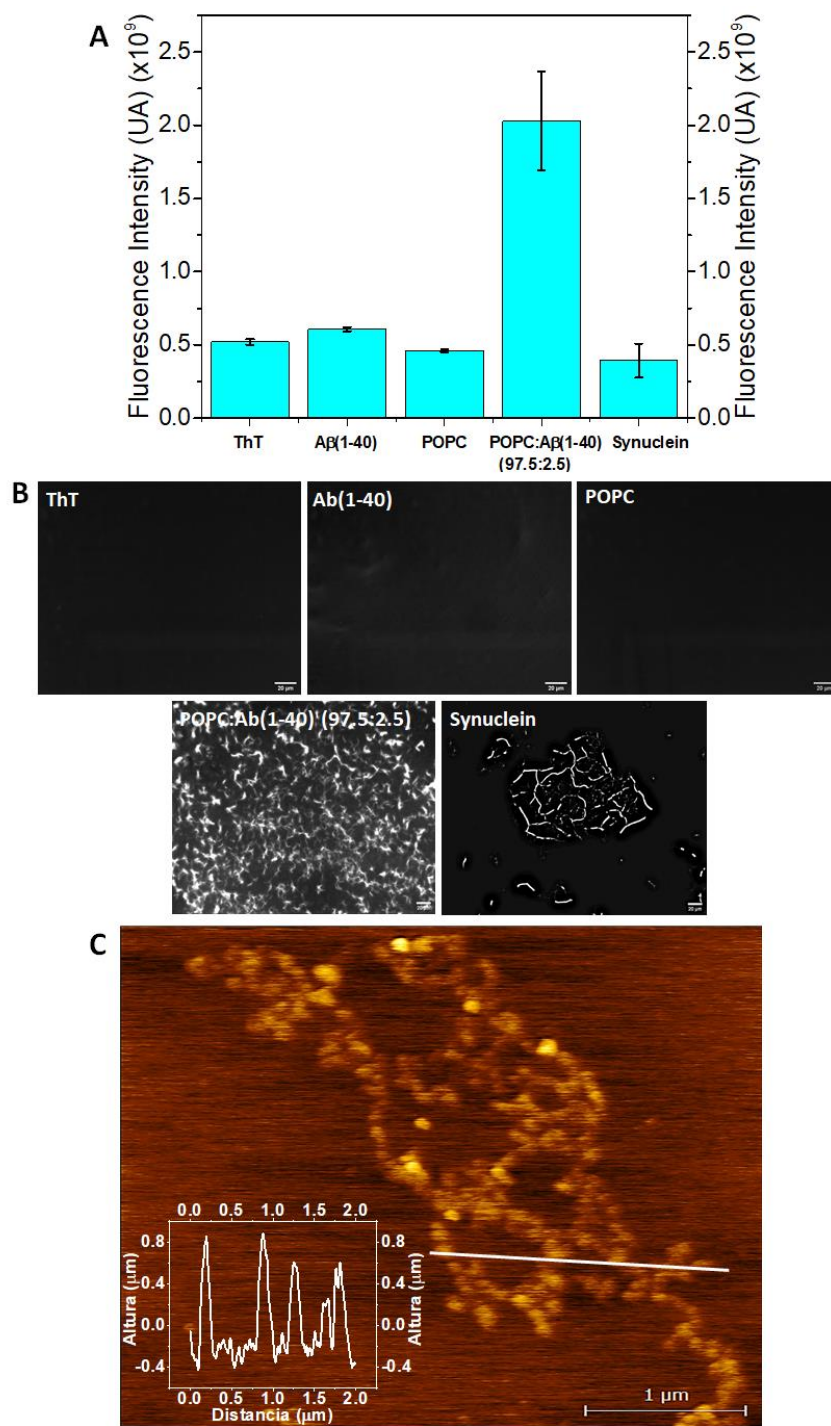


Figura 2.4. Confirmación ThT y observación por AFM de fibrillas amiloide A β (1–40) inducidas por POPC en la interfase aire-agua.

(A) Valores de intensidad de fluorescencia de monocapas transferidas desde la cuba de Langmuir (comprimidas a 20 mN·m⁻¹) al soporte de mica después de la incubación con ThT. Controles ThT: monocapa de péptidos A β (1–40) pura transferida, monocapa de POPC pura transferida; intensidad de fluorescencia. Se muestran señales sin procesamiento de imágenes. (B) Imágenes de fluorescencia de controles negativos y la estructura tipo fibrilla de POPC/A β (1–40) mezclada a 97,5:2,5 de PAP comprimida hasta 20 mN·m⁻¹ y luego transferida al soporte de mica. El control positivo de α -sinucleína se formó a granel y se transfirió a un soporte sólido y se incubó con ThT para la observación de FM. En la esquina inferior derecha, la barra blanca representa 20 μ m. (C) Imágenes de topografía (obtenidas en modo contacto) AFM de POPC/A β (1–40) mixtos en una proporción de PAP de 97,5:2,5, comprimidas hasta 20 mN/m y luego transferidas al soporte de mica; en el recuadro, se muestra la periodicidad de la estructura similar a la fibrilla a lo largo de 2 μ m de longitud (ver la barra blanca grande). Vale la pena señalar que la imagen de AFM es de 4 \times 4 μ m, mientras que la imagen de BAM es de 200 \times 250 μ m (consulte la Sección Experimental para obtener más detalles).

2.1.1.3 Significancia biológica e implicaciones en el entendimiento de la formación de fibras amiloides in vitro en presencia de lípidos con diferentes características interfaciales

Cualquier hipótesis que trate de explicar la formación de fibras amiloides *in vivo* debe tener en cuenta las condiciones fisiológicas. El efecto de co-solventes, altas temperaturas, largos periodos de tiempos de incubación con agitación o combinaciones de ellos no son condiciones normales “fisiológicas” para desencadenar la formación de fibras amiloides en el cerebro, debido a que la mayoría de los autores coinciden en que la formación y acumulación de péptidos A β es iniciada en un ambiente de membrana [3].

Recientemente se ha resaltado una fuerte interrelación de los lípidos de membranas y los péptidos A β en el proceso de formación de agregados o auto-ensamblaje de fibras amiloides que puede llevar a la pérdida de la homeostasis celular [95]. Tanto el A β (1–40) como el A β (1–42) son fuertemente hidrofóbicos ya que forman parte del segmento transmembrana de la proteína APP [3], de manera que ambos péptidos pueden formar capas monomoleculares en la interfase agua/aire similar a lípidos de membrana y con una alta estabilidad lateral [20, 21].

En resultados anteriores de nuestro grupo se demostró que el péptido A β amiloide es capaz de romper las bicapas lipídicas de liposomas gigantes en solución. Además, el comportamiento de miscibilidad de lípido/A β amiloide es complejo con una tendencia a la immiscibilidad lateral [20], lo que puede estar relacionado con el hecho de que los péptidos A β amiloides muestran un predominio de estructuras en hoja β en la interfase agua aire [96–98]. Aunque dependiendo del sistema experimental usado la estructuración de la conformación en hoja β puede sufrir ciertos cambios con intermediarios distinguibles al comparar con la interfase agua/aire, pasando

por estructuras en forma de monómeros desordenados (solución) → α -hélice (subcapa) → hoja β (interfase) [99] o en condiciones de solución pasaría por monómeros amorfos (solución) → agregados similares a coloides (solución) → oligómeros de hoja β ordenados (solución) → fibras (solución) [100]. La miscibilidad de los péptidos A β /lípidos en monocapas de Langmuir parece no seguir las mismas reglas de otros péptidos hidrofóbicos con estructura de hoja β . Por ejemplo, los péptidos hidrofóbicos con propiedades de secuencia señal se mezclan muy bien con lípidos independientemente de la fase lipídica [101]. Otra característica de monocapas de péptido A β amiloide puro es su gran fuerza de cizalla dado por su alta reología de superficie que se comporta con una red sólida bidimensional con un coeficiente de difusión interfacial muy bajo ($D \sim 0.005 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) similar o menor a un lípido en fase líquido condensado [21]. En la primera parte de este capítulo confirmamos que las monocapas del péptido A β amiloide puro no forman estructuras fibrilares [21] ni fueron sensibles al marcaje con ThT (**Figura 2.4**). Por otra parte, la presencia en la monocapa mezcla (lípido/péptido) de un lípido en estado líquido-condensado, como es el caso del DSPC (un fosfolípido saturado que a la temperatura de trabajo de la monocapa (23 °C) está por debajo de su temperatura de transición crítica (54,9 °C) [102]. No promueve la fibrilación manteniendo el estado sólido del péptido A β amiloide y mostrando un comportamiento de inmiscibilidad solido-solido a todas las proporciones de DSPC/A β (**Figura 2.1**).

Es bien conocido que POPC es uno de los principales fosfolípidos presentes en el tejido cerebral [9, 11]; tiene un carácter completamente líquido expandido en la interfase aire-agua [103] y una temperatura de transición crítica de -3,7 °C [29].

Todas estas características del lípido POPC son compatibles con un estado más cercano a lo fisiológico en la interfase agua/aire hacen que actúe como inductor de estructuras fibrilares (ver las **Figuras 2.1B y 2.3B**). Este comportamiento particular, bien caracterizado, solo se observa para un 2,5-10% de PAP, un pequeño rango de proporción de péptido equivalente a 0,005-0,01 de fracción molar de A β (1-40) en la mezcla (**Figura 2.1B**). Este proceso de formación de fibras depende de la presión superficial armando una red estructural fibrilar bien definida a 20–30 mN/m (**Figura 2.3B**). Estos valores de presión lateral son equivalentes a la presión promedio de bicapas y compatible con las membranas biológicas [104]. Por otra parte, en nuestras condiciones experimentales las estructuras fibrilares que se forman como consecuencia de las condiciones interfaciales dependen de la proporción lípido/A β amiloide, del tipo de lípido y del empaquetamiento lateral de la mezcla; mostraron un comportamiento ThT positivo (ver **Figura**

2.4B). En la comunidad científica es muy aceptado que la interacción de ThT con fibras de A β acompañada de emisión de fluorescencia, es uno de los requisitos que debe cumplir un agregado para ser considerado como amiloide [93].

En nuestra condición experimental, las fibras de A β amiloide ThT positivas solo requieren de 2-5 min para formarse sobre una subfase de solución salina fisiológica (NaCl 145mM a 23 °C), mezcladas con un componente de lipídico de membrana abundante en neuronas como el lípido POPC y comprimida a una presión de superficie equivalente a la presión de membrana biológica. Por lo tanto, no es necesario el uso de condiciones extremas como altas temperaturas, agitación fuerte, uso de co-solventes para la formación de fibras amiloides ni tampoco largos periodos de incubación. En conexión con esto, otros autores han reportado previamente que la interfase agua/aire libre de lípidos acelera la formación de fibras tanto del péptido A β amiloide como de α -sinucleína [105, 106]. Quedando claro que las condiciones típicas usadas por otros investigadores para la formación de fibras son bastante diferentes a las ensayadas por nosotros. De modo que nuestro enfoque introduce un sistema modelo de membrana más cercano a las condiciones biológicas con solo la presencia de un componente fosfolípido común y natural de membranas biológicas.

A partir de experimentos de adsorción, se ha reportado que el péptido A β (1-40) interactúa en monocapas con los grupos polares de lípidos cargados negativamente tal como la mezcla POPG/POPC, pero sin penetración en la interfase lipídica [107]. De estos resultados se interpreta que la superficie cargada actúa como un sistema de retención y el contenido de hojas β o de α -hélice depende de la proporción lípido/péptido [107]. Sin embargo, las condiciones experimentales ensayadas están lejos de "imitar" un entorno de membrana fisiológica porque se empleó una fuerza iónica baja y relaciones POPG/POPC altas. Sin embargo, estos resultados coinciden con los nuestros debido a que los autores observaron que la toxicidad del péptido A β (1-40) está mediada por interacciones fisicoquímicas no específicas en la interfase de la membrana. Por lo tanto, todos estos datos convergen en que es posible resaltar que una determinada condición particular de la membrana tenga un papel más activo y dañino en la inducción de fibrillogénesis de tipos de A β amiloide tóxicos. Como muestran nuestros resultados, aunque los péptidos A β amiloide forman monocapas insolubles y reproducibles [20, 21] no se mezclan con todos los fosfolípidos. Como hemos demostrado en mezclas con DSPC lípido de estado sólido, el péptido A β amiloide muestra inmiscibilidad a todas las proporciones ensayadas. Dicho comportamiento de inmiscibilidad sólido-sólido para esta mezcla

lípido/péptido en particular en monocapas de Langmuir puede atribuirse al estructuración en hoja β del A β amiloide en la interfase manteniendo una solvatación interfacial baja y propiedades reológicas particulares [21]. De manera que en este arreglo molecular de hojas β en la interfase el péptido A β amiloide puro es ThT negativo y no forma estructuras fibrilares observables por BAM ni AFM. La concentración de un arreglo de proteína en monocapa formadas en la interfase agua/aire y a un empaquetamiento lateral compatible con biomembranas ($20\text{-}30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) es sorprendentemente alta. Para nuestro caso particular y teniendo en cuenta que el área molecular del péptidos A β (1–40) a $25\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ es de unos 3 nm^2 y suponiendo un grosor interfacial de unos 2 nm (considerando el grosor medio de la imagen obtenida por AFM, ver la **Figura 2.4**); el volumen molecular superficial medio es de 6.000 nm^3 y la concentración interfacial real del péptido A β puro alcanzaría un valor alrededor de $0,26\text{ M}$. Esta concentración en la superficie corresponde a una densidad de péptido A β de alrededor de $1,15\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, que es aproximadamente el 80% del valor informado para el interior de una proteína (alrededor de $1,35\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) [108]. Esto indica que la baja solvatación local y la alta concentración del péptido A β (1–40) en la interfase agua/aire no son suficientes para formar fibras de amiloide. Por lo que para desencadenar la formación de fibras amiloide en la interfase agua/aire, es necesaria la presencia de fosfolípidos en estado líquido-expandido observando miscibilidad parcial en presencia del lípido POPC en la mezcla. Para la proporción de $97,5:2,5$ en la mezcla POPC/A β (1–40) (significa que el péptido A β contribuye con un $2,5\%$ del área total disponible de la interfase para mezcla de lípido/péptido), vemos claramente la aparición de estructuras fibrilares con comportamiento ThT-positivo. Especialmente a esta proporción, observamos interacciones repulsivas según el análisis de miscibilidad (AMM por encima del área de mezcla ideal, **Figura 2.2** parte inferior). Estos resultados convergen con el análisis de reflectividad a partir de las imágenes de BAM donde los valores son diferentes para las estructuras fibrilares en comparación con la proteína pura, lo que indica que el estado líquido-expandido de POPC induce un cambio en la conformación del péptido A β que favorece la formación de fibras amiloides. Es válido destacar que la fibrilogénesis producida por el péptido A β amiloide en la interfase agua/aire se produce también por la presencia del grupo polar del lípido POPC que es más hidratado en comparación con el lípido DSPC de estado líquido-condensado. Estudios de nivel de hidratación interfacial de fosfolípidos en diferentes estados físicos de monocapas ya fue reportado por Brewer et al. 2010, mediante el uso de las propiedades de relajación de la sonda fluorescente LAURDAN [104]. Los que reportaron que

para interfases líquidas-expandidas (por encima de la transición de fase del fosfolípido), el valor de polarización generalizada (GP) de LAURDAN es de alrededor de -0.3 , mientras que, para fosfolípidos en estado líquido-condensado, el valor de GP en presencia de la sonda LAURDAN es cercano a 0.5 [104]. Estos valores de GP son importantes para determinar la actividad del agua interfacial en las interfases de fosfolípidos de modo que al combinar los anteriores valores para interfases de fosfolípidos en estado líquido-expandido propuestos por Damodaran [89], la actividad del agua equivalente a nuestra condición desencadenante de amiloide estaría alrededor de 0.3 , mientras que para interfases de fosfolípidos en estado líquido-condensado se espera que sea cercana a 0 . Lo que nos informa que interfases mezcla de fosfolípidos en estado líquido-condensado que no están solvatadas difícilmente rompen las disposiciones sólidas del péptido A β . En cambio, una interfase de fosfolípidos en estado líquido-expandido induce los cambios conformacionales necesarios de A β amiloide para inducir estructuras fibrilares con características ThT positivas y compatible con lo observado por AFM/BAM.

Esta hipótesis de que el estado de la actividad del agua interfacial (grado de hidratación de los lípidos) puede modular la formación de estructuras fibrilares en un entorno de lípidos de estado líquido-expandido, es convergente con el incremento de las estructuras fibrilares con la compresión de la monocapa. (**Figura 2.3B**). En este sentido es sabido que, para interfases formadas por fosfolípidos líquidos-expandidos, los valores de GP de LAURDAN van de -0.55 a -0.3 con un cambio en la actividad de agua interfacial entre 0.9 y 0.3 cuando la monocapa se comprime de 2 a $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [89, 104].

Hemos obtenido resultados similares con 1, 2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), un fosfolípido de ácido graso saturado más corto (C-14) con propiedades interfaciales equivalentes a POPC (**ver sección 2.1.2**), lo que indica que tanto el estado físico del fosfolípido condicionado por el largo de la cadena de ácido graso es crítico para la fibrilación del péptido A β . Una interpretación del sistema observado, debido a esta particular interacción lípido/péptido A β , ha sido modelado en una organización 2D en su estado fibrilar de acuerdo con los datos obtenidos (**ver Figura 2.5**).

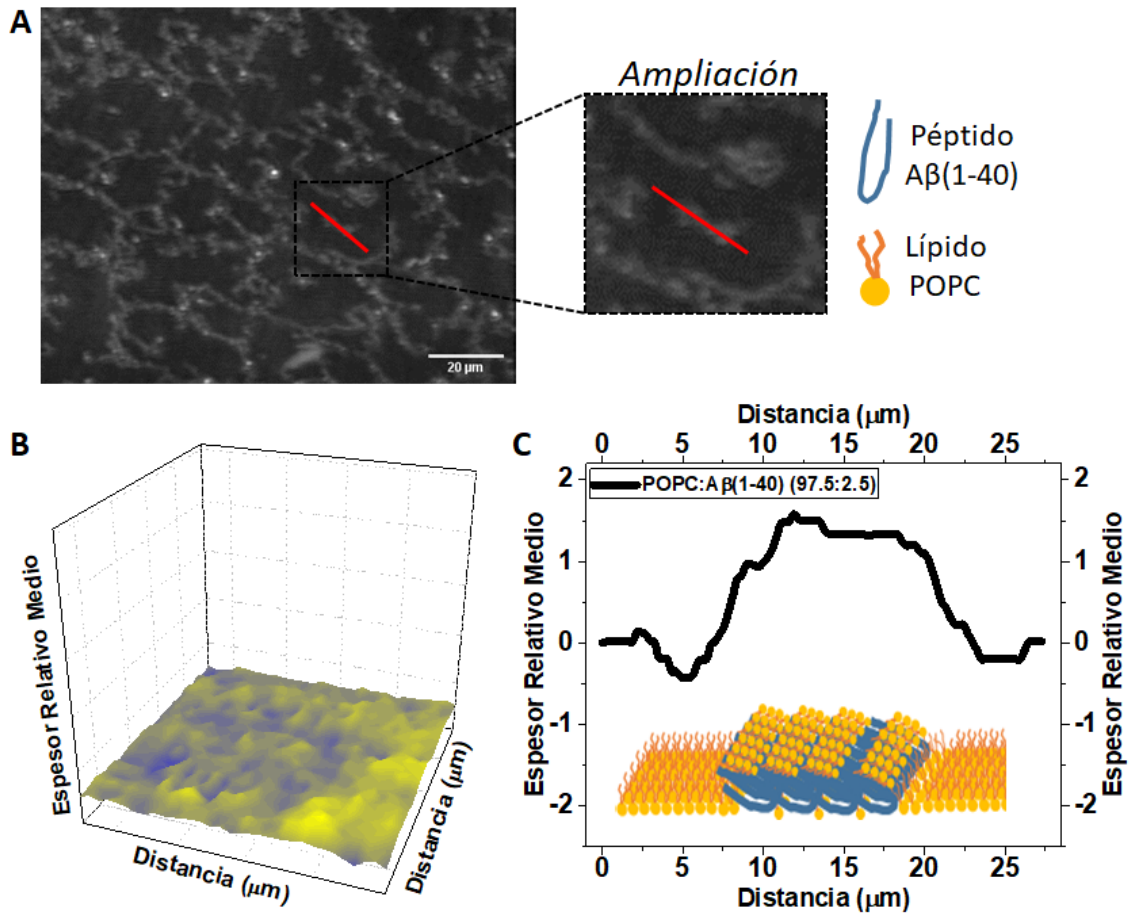


Figura 2.5: Modelado de la estructura observada de las fibras formadas por el péptido A β (1–40) impuesto por las condiciones interfaciales de POPC. (A) (Panel izquierdo) Imágenes de BAM obtenidas en POPC/A β (1–40) (97,5:2,5 de PAP) que muestran las estructuras fibrilares interconectadas (mayor reflectividad) que limita la fase enriquecida en POPC más (menor reflectividad); (panel derecho) ampliación del cuadrado de la línea de puntos negros que muestra los detalles, la línea roja transversal indica el paso del grosor relativo trazado en (C) en la línea negra. (B) Representación tridimensional utilizando el programa FIJI que muestra el espesor relativo a lo largo de la imagen A con colores falsos, el color verde es la altura máxima, mientras que el color amarillo es la mínima. (C) Vista de un posible modelo de la estructura formadas por co-ensamblaje rico en lípidos con péptidos A β (1-40) que mantienen un grosor relativo de aproximadamente 12 μm de longitud \times 0,2 μm de altura.

Es importante destacar que las condiciones interfaciales impuestas por el líquido POPC (con mayor grado de hidratación) brindan un entorno químico de superficie adecuado para promover la formación de estructuras fibrilares del péptido A β (1-40), donde el lípido también participa formando parte estructural de las fibras amiloides con valores de reflectividad entre el lípido puro y el péptido puro, así como un distinguible punto de colapso intermedio (ver el valor del punto de colapso de esta “fase intermedia” correspondiente al punto rojo en la **Figura 2.2** parte

inferior derecha, de $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y la imagen 2 de BAM en **Figura 2.1B**). Otra característica importante a destacar de la fase fibrilar es que tiene una estabilidad lateral inferior a la de la POPC pura de alrededor de $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Es bien sabido que los péptidos amiloide $A\beta$ afectan la integridad de la membrana [20]. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual rompen la membrana así como la inducción de fibrillas amiloides asociadas a las membranas aún no está claro [95]. Aunque el rol de las membranas que conducen a la agregación del péptido amiloide ha sido propuesta por otros autores para los péptidos $A\beta$ [95, 109] y para la α -sinucleína [110]. Estudios computacionales de dinámica molecular, han postulado la importancia de la “calidad de la superficie” de las bicapas lipídicas en la interacción con péptido $A\beta$ amiloide y la formación de fibras [111]. La participación de POPC en el proceso de fibrilación está experimentalmente respaldada por el hecho de que este lípido se ha encontrado en depósitos de fibrillas amiloides extraídos por técnicas histopatológicas en cerebro de pacientes fallecidos con Alzheimer o enfermedad de Parkinson [112, 113]. Nuestras evidencias experimentales aportan evidencias biofísicas que apoyan el rol de los fosfolípidos organizados, en el proceso de formación de fibras amiloides en un ambiente mimético de membrana.

2.1.2 Análisis de fluorescencia en monocapas de Langmuir de la mezcla DMPC/ $A\beta$ (1-40) transferidas a un soporte de mica. Imágenes de SEM.

Como hemos mostrado anteriormente el péptido $A\beta$ (1-40) forma estructuras fibrilares a baja proporción en mezcla con POPC (lípido líquido-expandido con 18 carbonos en sus ácidos grasos); dichas nanoestructuras son ThT positivas. Según esos resultados su formación depende del estado de fase del lípido (líquido-expandido) así como de la proporción del péptido en la mezcla interfacial agua/aire [28]. Teniendo en cuenta lo anterior se decidió evaluar la influencia que tiene un lípido con propiedades superficiales similares (líquido-expandido) pero con menor tamaño de cadena hidrofóbica como es el caso del DMPC que tiene 14 átomos de carbonos en sus ácidos grasos.

Según los estudios realizados observamos la formación de estructuras fibrilares a una proporción entre 15 y 25 % del péptido $A\beta$ (1-40) con el lípido DMPC, lo que representa un incremento de unas cinco veces la cantidad de $A\beta$ (1-40) necesaria para formar fibras comparado a la mezcla con el lípido POPC. Sorpresivamente, en esta mezcla DMPC/ $A\beta$ (1-40) si bien aparecieron estructuras fibrilares, estas mostraron heterogeneidades en comparación con las observadas con un lípido de mayor largo de cadena como POPC observándose formaciones de

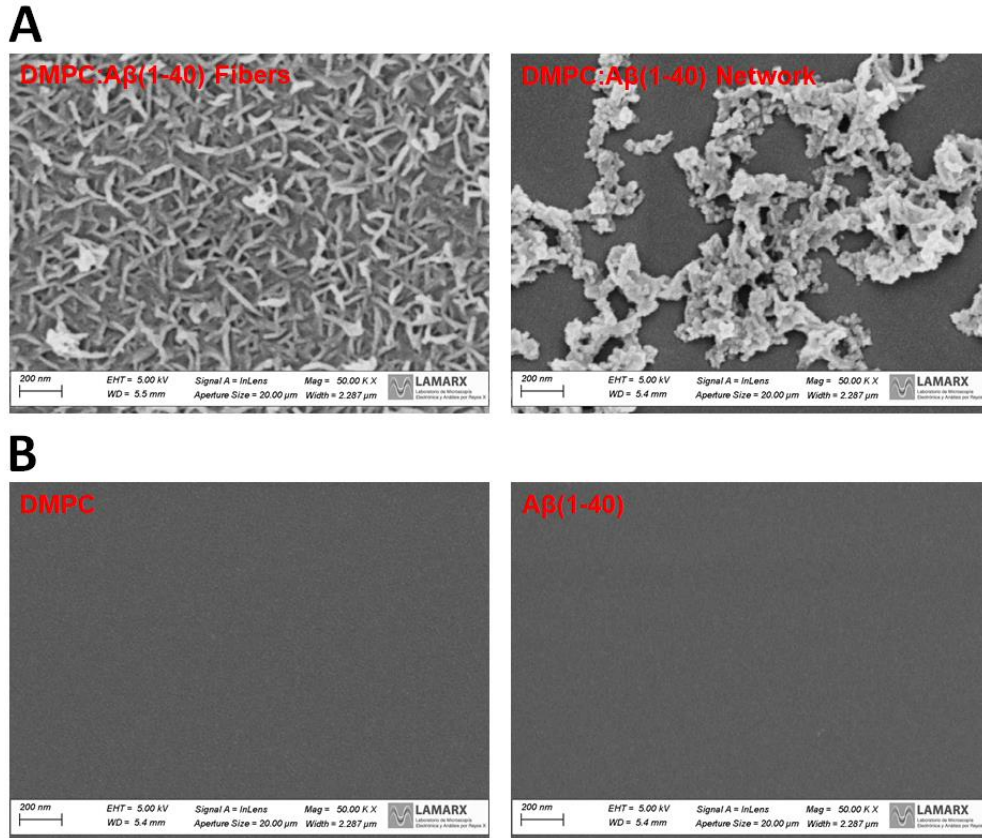


Figura 2.6: Imágenes de SEM de la mezcla DMPC/A β (1-40) y sus respectivos controles negativos DMPC puro y A β (1-40) puro.

A: Imagen de estructuras fibrilares (parte izquierda) y estructuras en forma de Network (parte derecha) **B:** Imágenes correspondientes a los controles negativos DMPC puro (parte izquierda) y A β (1-40) puro (parte derecha). En la parte inferior izquierda de las imágenes se muestra la escala correspondiente a unos 200 nm.

fibras alargadas y otras en forma de Network (red) con notables diferencias en su arreglo interfacial (ver **Figura 2.6**).

Es conocido que para considerar fibras como de tipo amiloides es un requisito que interaccione con el fluoróforo ThT y que la emisión de fluorescencia esté cercana a los 482 nm [92, 93]. Los análisis tanto espectrales como de imágenes de fluorescencia se realizó usando microscopia confocal para lo cual empleamos fibras preformadas de α -sinucleína como control positivo.

Según el análisis espectral ambos tipos de estructuras mostraron comportamiento ThT positivo con un máximo de emisión centrado en los 482 nm el que es comparable con el espectro de α -sinucleína (**Figura 2.7A**).

Sin embargo, las estructuras en forma de Network no solo mostraron diferencias estructurales en comparación con las estructuras fibrilares, sino que también apareció un espectro más complejo con un segundo pico de emisión claramente diferenciado y centrado en los 550 nm (Figura 2.7B). Estas diferencias espectrales y estructurales presentes en la misma mezcla nos

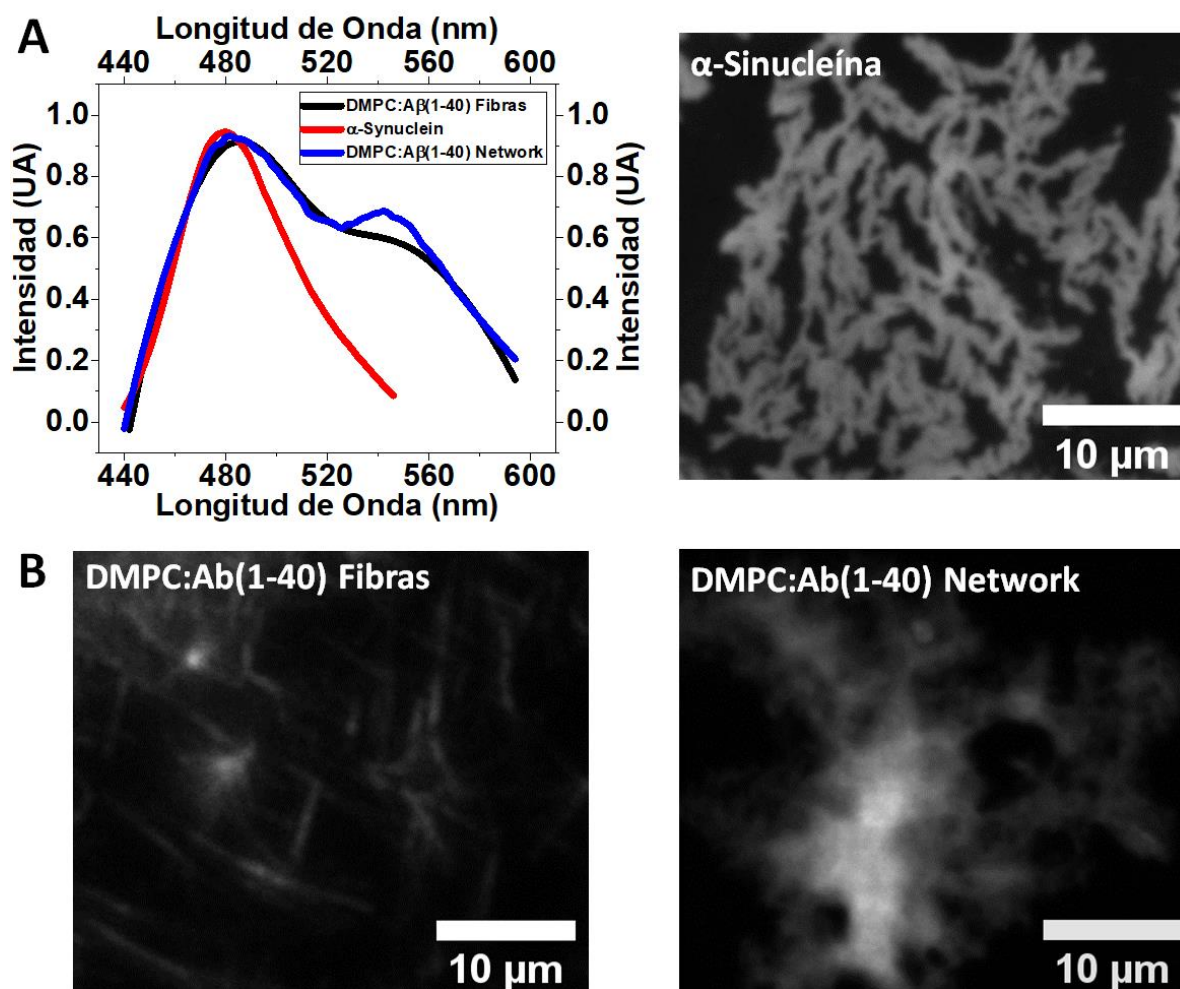


Figura 7: Espectros e imágenes de fluorescencia de la mezcla DMPC/A β (1-40) en presencia de la sonda ThT.

A: Espectros de emisión de fluorescencia de estructuras fibrilares, estructuras en forma de Network comparados con la α -Sinucleína (control positivo). **B:** Imágenes obtenidas por FM confocal y asociadas a los espectros mostrados en A. La longitud de onda de excitación de 405 nm y se colecto la emisión en un rango de 440 nm a 600 nm donde aparecieron dos máximos uno centrado en los 482 nm típico de fibras amiloides y otro alrededor de los 550 nm. En la parte inferior derecha de las imágenes se muestra la escala correspondiente a unos 10 μ m.

permiten deducir que la formación de fibras amiloides es un proceso complejo que no solo depende del estado físico de los lípidos sino del largo de su cadena hidrofóbica. Lo que puede estar determinando la generación de regiones hidrofóbicas que determinan que el

acomodamiento del ThT sea diferente en cada caso llevando a este comportamiento en la emisión de fluorescencia. Esto es compatible con las heterogeneidades esperadas en un ambiente natural de membrana dado por los diferentes tipos de lípidos que la componen.

2.1.3 Las transiciones de fase lipídicas y su papel en las interacciones de A β (1-40) para la formación de fibras amiloides

2.1.3.1 Propiedades de superficies de A β (1-40) en monocapas de Langmuir mezcla con DPPC. Isotermas Π -Área, análisis de Imágenes de BAM e influencias de la temperatura en el estado de fase.

Como se indicó previamente, los péptidos A β puros forman una monocapa insoluble en la interfase agua/aire con un área molecular a alto empaquetamiento (alta presión superficial) de alrededor de 2.5 nm²/molécula con una estabilidad lateral cercana a los 30 mNm⁻¹ [21, 28]. También se describió que el péptido A β amiloide fibrila o no dependiendo del tipo de estado físico-químico del fosfolípido. Por lo tanto, parece interesante ver el comportamiento de estos péptidos amiloides con un fosfolípido que tenga transición bidimensional líquido-expandido \rightarrow líquido-condensado (LE \rightarrow LC) a temperatura ambiente. De manera que, es relevante el estudio en monocapas mezcla de A β (1-40) con un fosfolípido que tiene una transición de fase bien diferenciable como es el caso del lípido DPPC, y que además su punto de transición varía con la temperatura (**Figura 2.8A**). Este fosfolípido (DPPC) contiene dos cadenas de ácido palmítico de 16 carbonos con un grupo polar de fosfatidilcolina. Teniendo en cuenta que su punto crítico de transición es de 41 °C; cuando la temperatura de la monocapa está por encima de los 41 °C, DPPC permanece en fase líquida-expandida, mientras que, en el rango de 15-37 °C, el fosfolípido sufre transición LE \rightarrow LC que depende de la temperatura de trabajo [114].

En la presente sección mostramos un estudio de las propiedades de superficie del lípido DPPC puro y en su mezcla con el péptido A β (1-40) a diferentes temperaturas desde 15 °C hasta 40 °C (**Figura 8A, parte superior**). Utilizamos este lípido teniendo en cuenta su capacidad de experimentar cambios de fase desde el estado líquido expandido (fluido) hasta el estado líquido condensado (equivalente a fase gel) para explorar como se induce la fibrilación del péptido A β (1-40) en estos estados de transición.

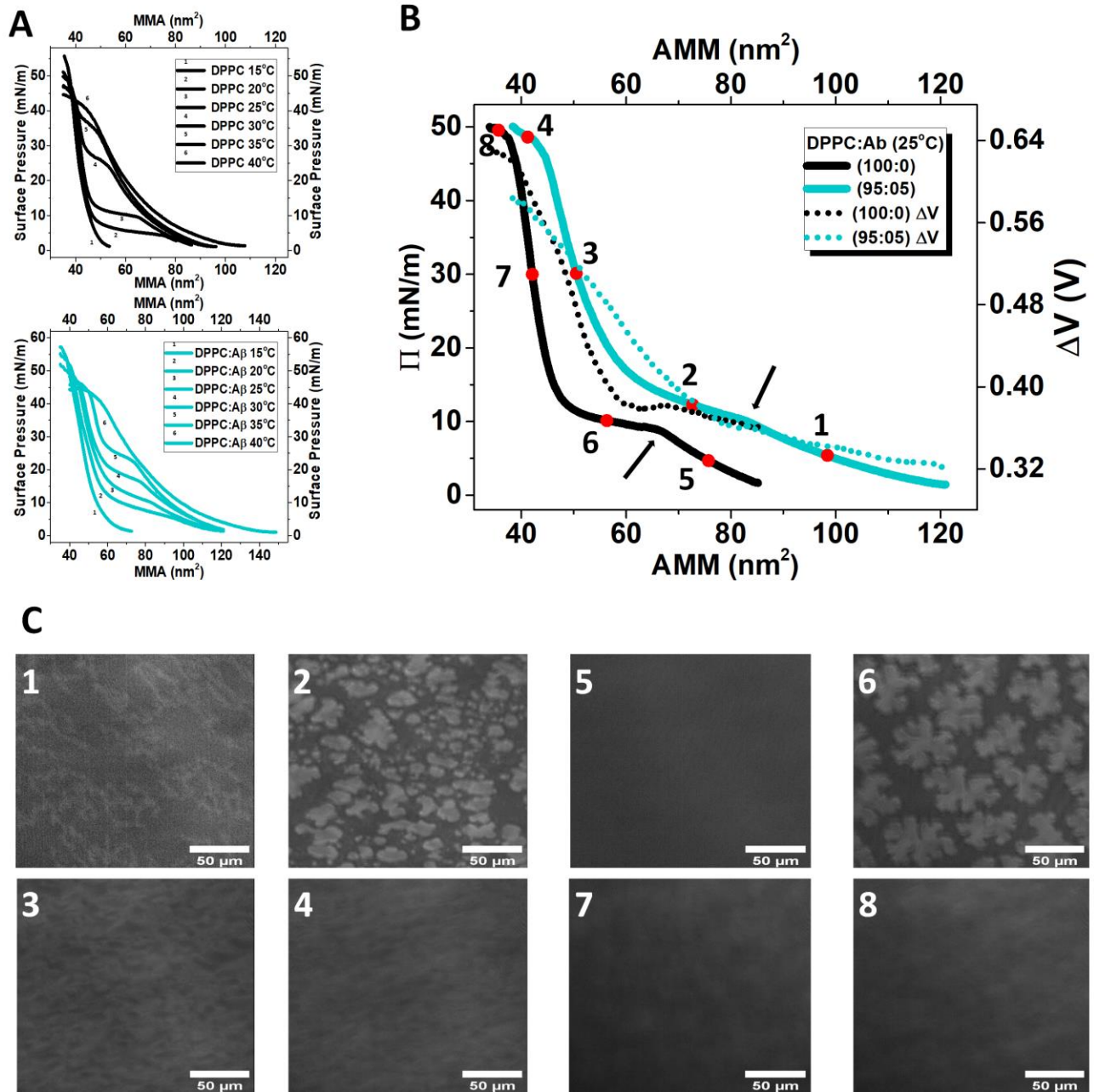


Figura 2.8: Comportamiento en interfase agua/aire e imágenes BAM de lípidos DPPC puros y mezclas DPPC/Aβ(1-40) a diferentes temperaturas. A: Isothermas dependientes de la temperatura del lípido DPPC puro (parte superior) y mezcla DPPC/Aβ(1-40) (95:05) (parte inferior). **B:** Isothermas (línea continua) y curvas de potencial de superficie (línea punteada) de lípido DPPC puro (negro) y mezcla de DPPC/Aβ(1-40) (95:05) (azul) a 25 °C. Las flechas negras señalan el punto de transición del estado LE al estado de LC. Los puntos rojos marcan la presión superficial en las diferentes fases donde se tomaron las imágenes BAM. **C:** imágenes de BAM de DPPC puro (parte inferior) y mezcla DPPC/Aβ(1-40) (parte superior). Las imágenes corresponden a los puntos rojos que se muestran en B. El lípido DPPC y el péptido Aβ(1-40) se mezclaron a (95:05) de PAP donde observamos estructuras similares a fibrillas desde la fase fluida hasta el inicio de la fase gel incluso con la presencia de dominios lipídicos que se tornaron irregulares.

Si bien hemos demostrado que la fibrilación de A β ocurre en el estado líquido-fluido en mezclas POPC/A β amiloide y no en el estado líquido-condensado en la interfase agua/aire; este proceso no está estudiado en lípidos donde coexistan fases o hagan transiciones. De manera que se podría demostrar que la dependencia de la fibrilación del estado lipídico interfacial en un arreglo experimental continuo gracias a las propiedades de cambio de fase de DPPC en un rango definido de temperaturas.

En la **Figura 2.8C** se muestran imágenes obtenidas mediante BAM de DPPC puro tomadas a 25 °C; como se aprecia son totalmente homogéneas sin estructuras observables en la fase líquida-expandida (4 mN/m a 10 mN/m) (**Figura 2.8C, imagen 5**). Sin embargo, en la fase de transición LE \rightarrow LC (11 mN/m a 20 mN/m), hemos observado dominios irregulares característicos de DPPC en fase sólido los cuales con el aumento de la presión superficial comienzan a percolar hasta la fusión de los mismos en la fase completamente LC (21 mN/m a 40 mN/m) donde se vuelve una interfase homogénea (**Figura 2.8C imagen 6, 7 y 8**). Según resultados anteriores (ver **Sección 2.1**), el A β (1-40) es capaz de formar estructuras fibrilares cuando se mezcla con lípidos en estado líquido-expandido como es el caso de POPC con la particularidad de que estas fibras aparecen a un bajo contenido de péptidos en la interfase mezcla [28]. Sin embargo, cuando el lípido en la mezcla es el DMPC que al igual que POPC tiene un estado líquido expandido en interfase agua/aire, pero con dos átomos de carbono menos en sus cadenas hidrofóbicas, las estructuras fibrilares aparecen a una mayor proporción esencialmente entre 15% y 25% de contenido de péptido en la monocapa mezcla (ver **Sección 2.1.3**).

El comportamiento en interfase agua/aire de la mezcla DPPC/A β (1-40), al igual que en DPPC puro, mostró un desplazamiento del punto de transición hacia valores mayores de presión superficial, siendo proporcional al incremento de la temperatura en la monocapa (**Figura 2.8A, parte inferior**). Sin embargo, como en el caso de POPC/A β (1-40) las imágenes obtenidas en BAM para la mezcla DPPC/A β (1-40) mostraron estructuras fibrilares claramente visibles en la fase líquido-expandido incluso a la misma proporción en la que el péptido A β las formó con POPC (**Figura 8C, parte superior**). Este comportamiento se mantuvo desde los 20 °C (fase LE por debajo de 5 mN/m) hasta los 40 °C a lo largo de toda la fase fluida o LE (**Figura 8A, parte inferior**).

A 20 °C la fase LC, tanto para el lípido puro como para la mezcla con A β , se caracteriza por la aparición de dominios típicos de DPPC (**Figura 2.8C, imagen 6**), los que se tornan muy

irregulares en presencia del péptido A β (**Figura 2.8C, imagen 2**). Sorprendentemente, en la transición, para la mezcla de DPPC/A β (1-40) se apreciaron estructuras fibrilares formadas entre los dominios irregulares (**Figura 2.8C**). Es decir, las fibras se mantienen en la fase LE que coexiste con la fase LC que se está formando como consecuencia de la compresión. Por lo tanto, en la fase de transición LE \rightarrow LC (11 mN/m a 20 mN/m) se mantiene las condiciones de microambiente molecular interfacial que permitieron observar las estructuras fibrilares que inicialmente se formaron en la fase completamente líquido-expandida (1 mN/m a 10 mN/m) (**Figura 2.8C, imagen 2**). Dichas estructuras fibrilares desaparecen totalmente tanto en el colapso como al superar la fase de transición LE y entrar en la fase LC, donde se aprecia un progresivo proceso de percolación de los dominios irregulares de manera que las interfases se tornan homogéneas a todas las temperaturas evaluadas, según las imágenes obtenidas por BAM (**Figura 2.8C, imagen 4**).

Como hemos visto la formación de estas estructuras fibrilares en la interfase agua/aire si bien requiere de condiciones específicas de microambiente molecular interfacial, aportado por el estado líquido de ciertos lípidos, no deja de considerarse un proceso complejo y poco explorado [28]. Para lograr una mejor comprensión de este evento molecular particular, desarrollado en la interfase agua/aire para la mezcla DPPC/A β (1-40), realizamos un análisis de reflectividad a partir de las imágenes obtenidas por BAM.

La variación de la reflectividad depende de cambios en el índice de refracción de los componentes que forman la monocapa y a la vez los cambios de índice de refracción dependen del arreglo molecular en la interfase agua/aire, lo que da información del espesor de la monocapa [115] y pueden sufrir variaciones relativas con la presión superficial durante la compresión. Los índices de refracción se calculan a través de las imágenes de BAM y nos permiten inferir la naturaleza de los componentes diferencialmente apreciables en las imágenes provenientes de una monocapa mezcla, comprándolos con los valores de reflectividad de sus componentes individuales puros [28].

Para la mezcla DPPC/A β (1-40) que estamos analizando, la variación de la reflectividad calculada a partir de imágenes BAM fue muy útil tanto para determinar la naturaleza de las estructuras fibrilares como para seguir su comportamiento desde la fase de transición líquido-expandido hasta la fase líquido-condensado, durante la compresión bidimensional de la monocapa. Según este análisis se pudo apreciar cómo dichas fibras desaparecen mientras los dominios lipídicos percolan al comprimirse la monocapa (**Figura 2.9B y 2.9C**). Además, hemos

podido diferenciar un comportamiento de reflectividad específico para cada estructura observada en los tres estadios por los que pasa el lípido DPPC (LE→Transición→LC) en mezcla con el péptido A β (1-40) en la interfase agua/aire (**Figura 2.9C resaltada con diferentes colores**).

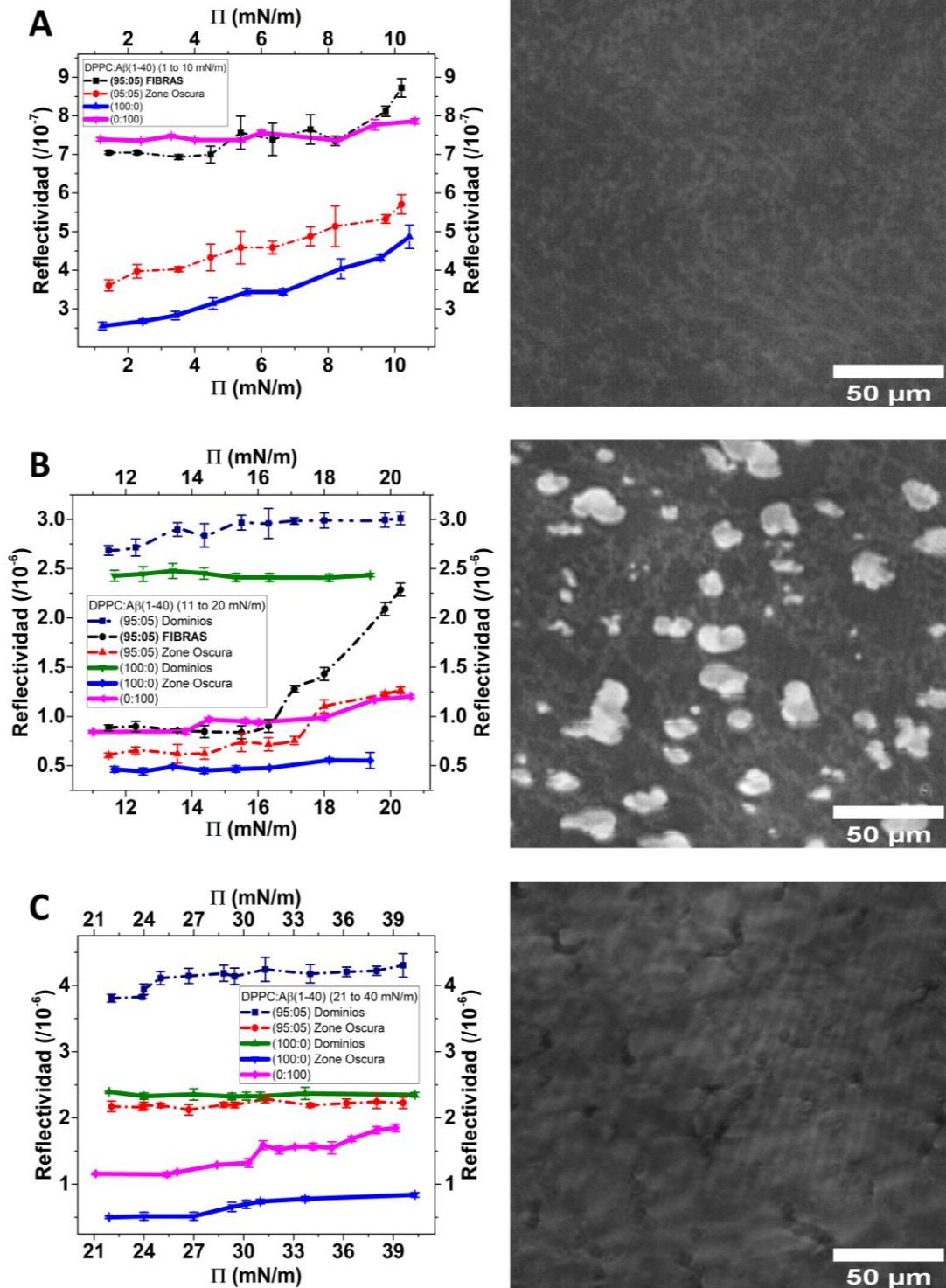


Figura 2.9: Análisis de reflectividad e imágenes BAM de la mezcla DPPC/A β (1-40) a 25 °C.

A: valores de reflectividad de la fase líquida expandida que definen dos regiones distinguibles en imagen BAM de 1 mN/m a 10 mN/m. Los valores bajos de reflectividad corresponden al lípido DPPC puro (color azul); Los valores altos de reflectividad corresponden a A β (1-40) puro (color rosa). Es apreciable que la línea negra punteada representa el comportamiento de reflectividad de las estructuras fibrilares. **B:** valores de reflectividad de la fase de transición líquido-condensado donde se indican tres zonas distinguibles en las imágenes de BAM tomadas entre 11 mN/m y 20 mN/m. Los valores de reflectividad más bajos en color azul representan la zona oscura en imágenes del lípido DPPC puro. Los valores intermedios de reflectividad corresponden a A β (1-40) puro (color rosa). Los valores altos de reflectividad están cerca de la zona de los dominios en el lípido DPPC puro (color verde). **C:** valores de reflectividad de 21 mN/m a 40 mN/m de fase LC que muestra las tres zonas diferenciadas en imágenes de BAM representadas en **B**.

En la parte inferior del análisis de reflectividad se muestran las imágenes BAM correspondientes a la fase LE, fase de transición LE \rightarrow LC (donde se aprecian los dominios) y la fase LC.

El análisis de reflectividad realizado en la fase líquido expandida (1 mN/m a 10 mN/m) mostró dos grupos de valores bien diferenciados. Los valores más bajos (línea azul) se corresponden a los calculados para el lípido DPPC puro a presiones equivalentes, mientras que los valores de reflectividad más altos (línea rosa) fueron calculados a partir de las imágenes de BAM en monocapas de péptido A β (1-40) puro. Seguidamente se calcularon los valores de reflectividad de las estructuras fibrilares (ver **Figura 2.9A** imagen parte inferior), los que mostraron un comportamiento similar a las reflectividades calculadas para el péptido puro. Por lo que es válido destacar que en esta fase LE las estructuras fibrilares están enriquecidas en el péptido A β (1-40), aunque no descartamos la presencia de lípidos en ese arreglo molecular en monocapas (**Figura 2.9A**). Teniendo en cuenta que en la región de transición LE \rightarrow LC (11 mN/m a 20 mN/m) comienzan a aparecer dominios irregulares (**Figura 2.8C, imagen 2**) los que coexisten con las estructuras fibrilares que se apreciaron inicialmente en la fase LE; el análisis de reflectividad se realizó tomando como referencia tanto a las imágenes del lípido DPPC puro (línea azul) como las imágenes del péptido A β (1-40) puro (línea rosa); además se agregaron como referencia del análisis los valores de reflectividad correspondientes a los dominios irregulares apreciados en la mezcla DPPC/A β (1-40). Como se puede apreciar en la **Figura 2.9B** los valores de reflectividades correspondientes a las estructuras fibrilares mostraron un comportamiento similar al del péptido A β (1-40) puro desde los 11 mN/m hasta los 16 mN/m. A partir de este valor comenzó distinguirse claramente un incremento en las reflectividades de dichas estructuras fibrilares, mostrando una tendencia a converger con los valores de reflectividades correspondientes los dominios irregulares tanto del lípido puro (línea verde) como de la mezcla DPPC/A β (1-40) (línea azul punteada) observados en las imágenes de

BAM (**Figura 2.9B**). Este comportamiento claramente revela que los dominios irregulares en la mezcla DPPC/A β (1-40) experimentan un proceso de percolación dependiente de la presión lateral, que conlleva a una fusión de las estructuras en esta fase hasta alcanzar la homogeneidad en la fase LC (**Figura 2.9C**).

El análisis de reflectividad correspondiente a la fase LC (21 mN/m a 40 mN/m) muestra una convergencia de los calores de reflectividad, calculados a partir de las imágenes del DPPC puro en la zona de dominios simétricos (línea verde) con los valores de reflectividad de la zona oscura en la mezcla DPPC/A β (1-40). Sin embargo, los valores de reflectividad calculados a partir de la mezcla DPPC/A β (1-40) mostraron un comportamiento ligeramente ascendente en comparación con el resto de los valores calculados los que claramente tienden a converger. Partiendo de lo anteriormente planteado, se puede interpretar que las imágenes de BAM en la fase LC (21 mN/m a 40 mN/m) de la mezcla DPPC/A β (1-40) están mostrando un proceso de percolación paulatino de los dominios irregulares, hasta alcanzar un estado homogéneo muy cerca del colapso por encima de los 45 mN/m (**Figura 2.9C, imagen 2**).

Como se puede observar, los valores de reflectividad calculados desde las imágenes de BAM en los dominios simétricos del lípido DPPC puro son menores que los valores de reflectividad calculados para la zona de dominios irregulares (asimétricos) en la mezcla DPPC/A β (1-40). Esta tendencia podría estar indicando que en dichos dominios irregulares coexisten tanto lípidos DPPC como péptidos A β (1-40), en estados conformacionales que favorecen este arreglo molecular (dominios) en monocapas.

2.1.3.2 Prueba de la coexistencia de estructuras fibrilares con dominios irregulares en la mezcla DPPC/A β (1-40) empleando la sonda ThT y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Siguiendo esta novedosa observación sobre la coexistencia de estados conformacionales en moléculas de diferente naturaleza química (tales como lípidos y proteínas), que permiten la separación de fases en la interfase agua/aire, procedimos al uso de la sonda fluorescente ThT que es típicamente usada para marcar estructuras amiloides organizadas en forma de fibras [93, 116]. Como describimos anteriormente en la (**Sección 2.1**), hemos adaptado un método para detectar fibras amiloides con la sonda ThT, transfiriendo la monocapa a un soporte de mica seguido de la marcación y posterior observación visual y obtención de una imagen, la que puede ser acompañada con un espectro o análisis de intensidades de fluorescencia.

Este procedimiento fue estrictamente seguido en todas las regiones de la mezcla DPPC/A β (1-40), desde la LE pasando por la fase de transición LE \rightarrow LC y completamente LC hasta el colapso, como se señaló anteriormente en la isoterma de la **Figura 2.8B**. Las imágenes de fluorescencia en presencia de la sonda ThT se observaron homogéneas en la fase gel-sólido y en el colapso (**Figura 2.10C, imágenes 3 y 4**). Sin embargo, tanto en la fase LE como en la fase de transición LE \rightarrow LC las estructuras fibrilares mostraron un comportamiento ThT positivo (**Figura 2.10C, imágenes 1 y 2**). En el caso particular de la región de transición LE \rightarrow LC donde aparecen dominios irregulares, éstos en las imágenes de fluorescencia se muestran como zonas oscuras contrastadas con las estructuras fibrilares, las que claramente están embebidas en los dominios irregulares (fase LE) (**Figura 2.10B**). Por lo tanto, como se había deducido a partir de los análisis de reflectividad, las estructuras fibrilares coexisten con los dominios irregulares apreciados en esta fase de transición LE \rightarrow LC lo que puede estar explicando la asimetría de los dominios de DPPC en presencia del péptido A β (1-40) (**Figura 2.8C, imagen 2**).

Este patrón de coexistencia de fibras con dominios irregulares, observado por FM en presencia de la sonda ThT, mostró un máximo de emisión centrado en los 472 nm, lo cual está corrido unos 10 nm respecto a la emisión típica de fibras amiloides centrado en los 482 nm; como control positivo se realizó un espectro a fibras de α -sinucleína (**Figura 2.10A**).

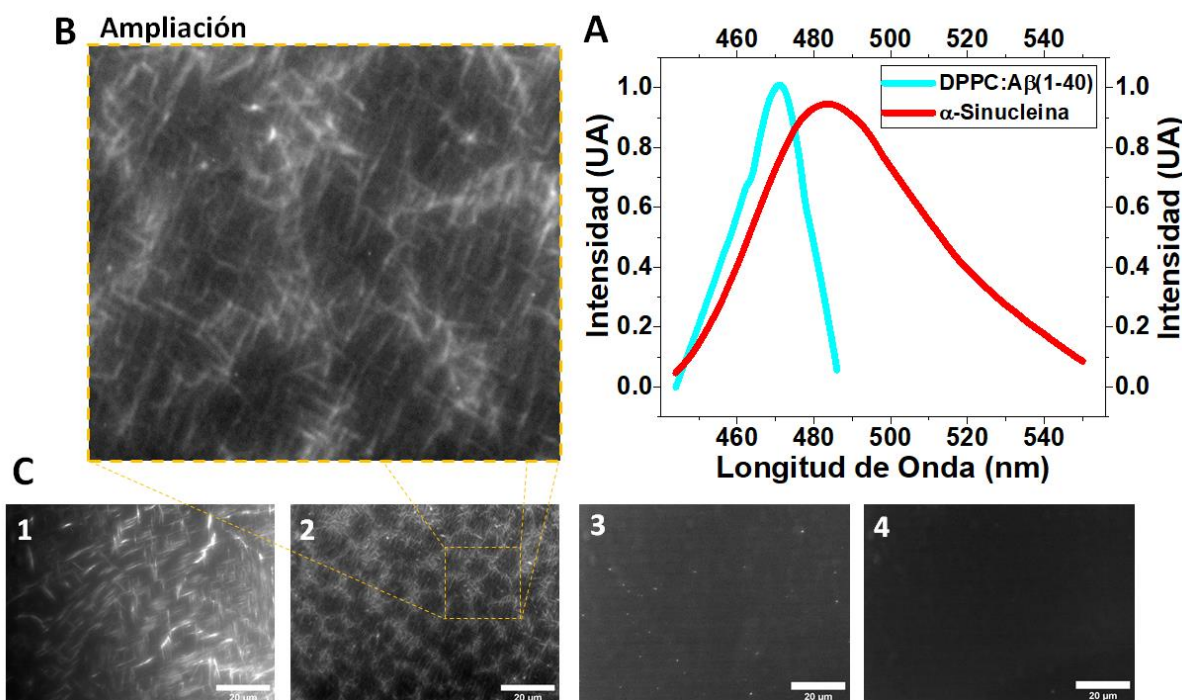


Figure 10: Espectros de emisión e imágenes de microscopía de fluorescencia de la mezcla DPPC/A β (1-40) en presencia de ThT. **A:** Espectros de emisión de fluorescencia de las estructuras fibrilares de DPPC/A β (1-40) en la fase de transición LE \rightarrow LC ($\lambda_{em} = 472$ nm). La proteína α -sinucleína se ha utilizado como control positivo ($\lambda_{em} = 482$ nm). **B:** Ampliación de la imagen 2 de microscopía de fluorescencia de DPPC/A β (1-40) en la fase de transición LE \rightarrow LC, las zonas oscuras corresponden a los dominios enriquecidos en el lípido DPPC que no está marcado por ThT. **C:** Imágenes de FM de ThT en distintas regiones de la isoterma mezcla DPPC/A β (1-40); LE (**imagen 1**), transición LE \rightarrow LC (**imagen 2**), LC (**imagen 3**) y colapso (**imagen 4**).

El mecanismo molecular de marcaje del ThT sobre fibras amiloides esencialmente ocurre debido a interacciones hidrofóbicas del ThT (anillo de benzotiazol y benzamina) con regiones hidrofóbicas de la proteína formada por aminoácidos aromáticos esencialmente triptófano en el arreglo fibrilar [93], aunque recientemente se ha resaltado el rol de interacciones electrostáticas entre ThT y el arreglo fibrilar [117]. Debido a la presencia de lípidos en las estructuras fibrilares, el nuevo ambiente hidrofóbico generado determina que la interacción del ThT no este limitada a efectuarse solamente con aminoácidos hidrofóbicos, sino que también recibe la influencia del microambiente generado por DPPC. Este entorno químico propio, moldeado en la interfase agua/aire, podría estar explicando el corrimiento en la longitud de onda de emisión del ThT sobre las estructuras fibrilares encontradas en esta mezcla.

La AFM es una técnica que nos permite conocer con exactitud características topográficas y valores dimensionales de estructuras escaneadas luego de transferidas a un soporte de mica [118]. En nuestro sistema experimental hemos implementado la transferencia de monocapas formadas en la interfase agua/aire a un soporte de mica previo al análisis topográfico por AFM. Esta técnica en particular fue utilizada para caracterizar topográficamente la mezcla en la región de transición de fase LE-LC donde coexisten estructuras fibrilares con dominios irregulares (**Figura 2.11**).

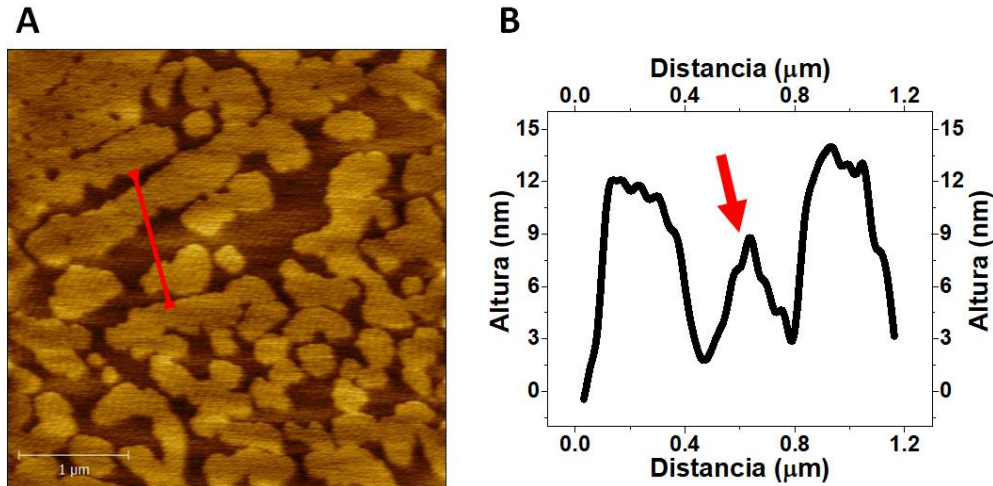


Figura 2.11: Altura de los dominios irregulares en coexistencia con fibras e imagen de topografía AFM de la mezcla DPPC/A β (1-40) en la región de transición LE→LC. A: Imagen de topografía de la fase de transición LE→LC transferida a un soporte de mica. La ampliación muestra la presencia de estructuras fibrilares entre los dominios. La línea blanca marca la zona de alturas medidas para cada estructura y su correspondiente altura en **B** denotadas con números. **B:** Altura de uno de los dominios 12 nm y de las estructuras fibrilares (flechas rojas) organizadas entre ellos con una altura promedio 9 nm.

El escaneo de la superficie de mica con la monocapa transferida se realizó al máximo valor de área de escaneo para el equipo de AFM usado, el cual fue de 11x11 micrómetros. Teniendo en cuenta lo anterior y que, como la separación de los dominios irregulares varía con la presión superficial, la transferencia la realizamos al límite superior de la fase LE (donde puede comenzar a apreciarse percolación de los dominios), de este modo garantizamos que en el área de escaneo del AFM aparecieran tanto los dominios irregulares como las estructuras fibrilares (**Figura 2.11A**). Una vez obtenidas las imágenes de topografía, determinamos las alturas promedios tanto de dominios irregulares como de las fibras, según lo mostrado en la **Figura 2.11B** la altura promedio de los dominios está alrededor de los $\sim 12 \pm 1$ nm, mientras que las fibras son en promedio más pequeñas con un valor de aproximadamente $\sim 9 \pm 1$ nm.

Esta diferencia de altura entre dominios lipídicos y fibras en la región de transición LE→LC muestran la coexistencia de estas estructuras indicando que hay un arreglo molecular probable donde el eje de la hoja β es paralelo al plano de la interfase donde las fibras se organizan quedando embebidos entre los dominios lipídicos. Este arreglo concuerda con lo encontrado anteriormente por FM empleando la sonda ThT (**Figura 2.10B**).

2.1.4- Efecto de gangliósidos en el proceso de disolución de fibras amiloide de A β (1-40) en un entorno de lípidos de membrana

2.1.4.1-Propiedades de superficie y efecto de gangliósidos totales sobre fibras amiloides en monocapas mezclas de POPC/A β (1-40). Isotermas π -área e imágenes BAM

Como se hizo mención anteriormente,

los péptidos A β puros forman monocapas insolubles en la interfase agua/aire, con un comportamiento reológico particular en comparación con otros péptidos anfifílicos no amiloidogénicos [20, 21]. Además, en la **Sección 2.1.1** se mostró que el péptido amiloide A β (1-40) mezclado con POPC (fosfolípido en estado líquido expandido) forma estructuras fibrilares en la interfase agua/aire [28].

En esta sección se presenta cómo estas estructuras fibrilares formadas por la mezcla POPC/A β (1-40), experimentan cambios estructurales hasta disolverse en presencia de gangliósidos totales (G_T) de cerebro en la interfase agua/aire. Las propiedades superficiales de los gangliósidos individuales puros han sido ampliamente estudiadas [31, 32] incluyendo descripciones de las propiedades de hidratación de su voluminoso grupo polar [119-121]. En este caso hemos utilizado gangliósidos totales porque es una mezcla fisiológica que se encuentra en el tejido cerebral [30].

Según los datos descritos anteriormente en nuestro grupo de investigación, los gangliósidos totales de cerebro se comportan como una monocapa líquida-expandida típica, con un punto de colapso alrededor de los 40 mN·m⁻¹ [31, 32]. Es conocido también que tienen un módulo de compresibilidad (K) de alrededor de 30 mN·m⁻¹ que está asociado a la inclinación en el grupo de oligosacáridos de la cabeza polar tras la compresión [122]. Sin embargo, esta leve discontinuidad está actualmente en discusión para conocer si representa una verdadera transición de fase bidimensional de dos estados, debido a que la imagen BAM de monocapas de G_T puras es completamente homogénea sin dominios observables (ver **Figura 2.12**). Por otra parte, se conoce que las propiedades superficiales individuales de G_T fueron independientes del solvente en el que fueron disueltos, ya sea DMSO puro o una mezcla de solventes (ver **Sección 2.1.4.4**).

Como hemos descrito en la **Sección 2.1** el lípido POPC induce estructuras fibrilares en mezcla con el péptido amiloide A β (1-40) en una baja proporción [28]. Aquí, estudiamos el efecto de

G_T sobre las estructuras fibrilares (proporción fija de POPC/ $A\beta(1-40)$) formando una mezcla ternaria a diferentes proporciones de G_T en la interfase agua/aire (**Figura 2.12**). Las diferentes proporciones de gangliósidos fueron ponderadas como superficie cubierta por gangliósidos (SCG) que la definimos como el porcentaje de superficie cubierta por gangliósidos con respecto al fosfolípido. Este concepto es más abarcador que el de fracción molar en monocapas mezclas debido a que las áreas moleculares superficiales individuales ocupadas por cada componente son diferentes [28].

La proporción de gangliósidos en la mezcla ternaria (fosfolípido:amiloide:gangliósidos) que hemos utilizado vista como porcentaje de SCG fueron de 95:05:05, 95:05:10, 95:05:15 y 95:05:20, como se indica en el capítulo 3 (Materiales y Métodos). De manera que para cada valor de SCG corresponde a una fracción molar específica de G_T de 0,046, 0,092, 0,139 y 0,186, respectivamente, en lo que influyen las diferentes áreas moleculares individuales de los componentes puros (ver **Figura 2.12**).

Como se puede apreciar en la **Figura 2.12** las isothermas de las mezclas ternarias tienen un carácter líquido-expandido en la interfase aire/NaCl 145 mM desplazándose hacia áreas moleculares más altas a medida que aumenta el contenido de G_T en la mezcla.

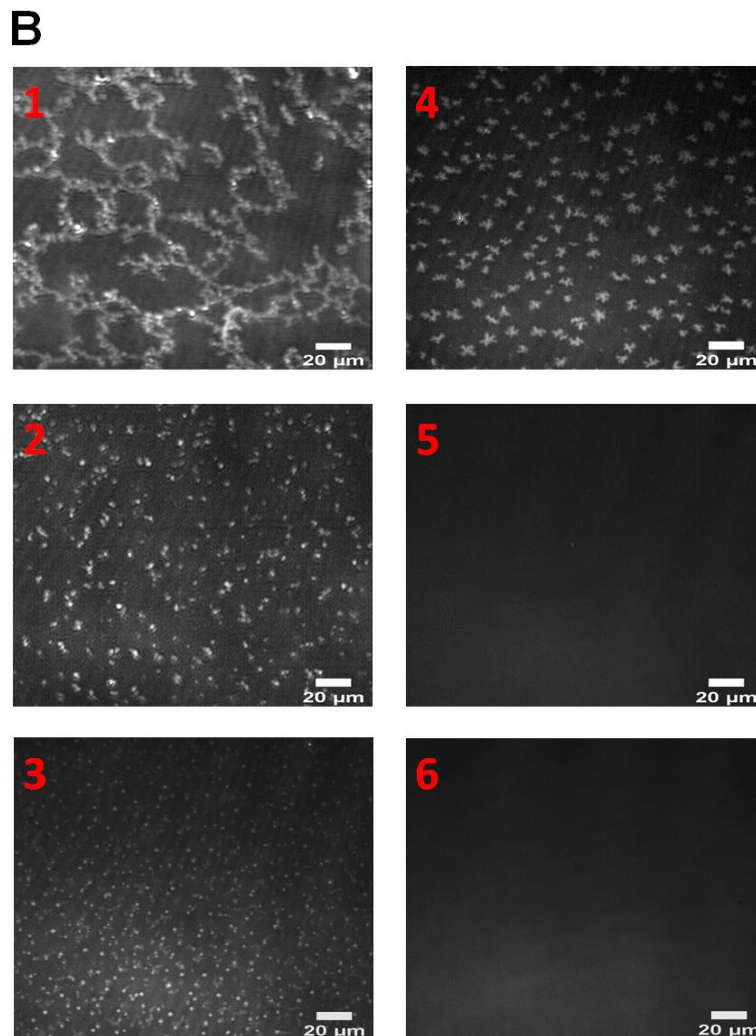
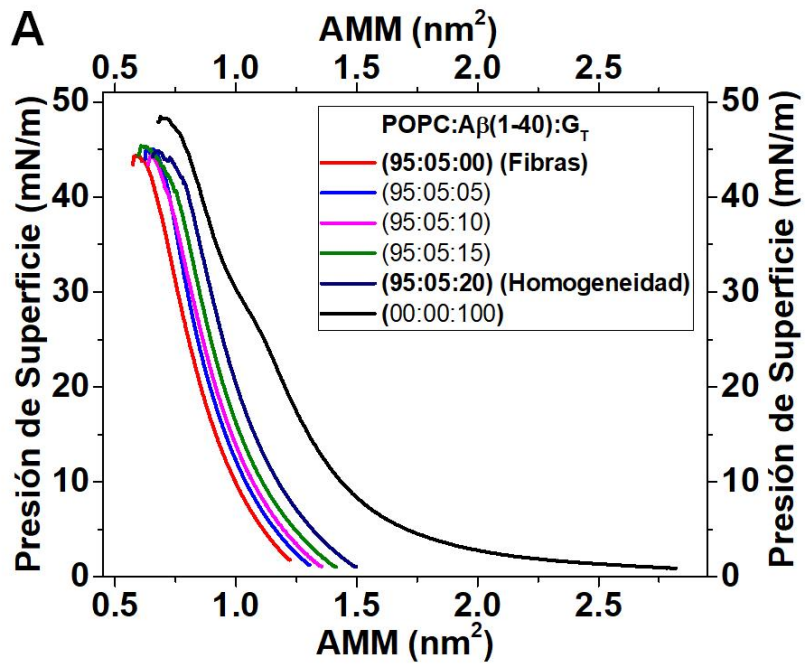


Figura 2.12: Comportamiento en interfase agua/aire de G_T en monocapas que contienen fibras amiloides. Efecto de inhibición de las fibras por los G_T . **A:** Isotermas π -área de mezclas ternarias de POPC/ $A\beta(1-40)$ /gangliósidos totales. **B:** Imágenes BAM obtenidas a $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en monocapas nanoestructuradas que contienen fibras que se afectan con mezclas en el porcentaje indicado de G_T . La imagen B1 es POPC/ $A\beta(1-40)$ en 95:05:0 que muestra estructuras fibrilares, mientras que las imágenes B2, B3, B4, B5 y B6 corresponden a las proporciones (95:05:05), (95:05:10), (95:05:15), (95:05:20) y (00:00:100) de SCG respectivamente donde se muestran dominios que son indicativos de un comportamiento de inmiscibilidad. Por el contrario, la mezcla POPC/ $A\beta(1-40)$ / G_T al (95:05:20) de SCG muestra una homogeneidad total en comparación con G_T puro. Se calcularon las áreas moleculares medias (AMM) de las monocapas mixtas, (ver materiales y métodos). Las respectivas fracciones molares de G_T en las mezclas (95:05:05), (95:05:10), (95:05:15) y (95:05:20) de SCG son 0,046, 0,092, 0,139 y 0,186. La barra sólida de escala en las imágenes representa $20 \mu\text{m}$.

Las fibras amiloides inducidas por POPC en $A\beta(1-40)$ se "disuelven lateralmente" y de manera gradual a medida que aumenta la proporción de G_T , llegando a desaparecer por completo cuando la mezcla ternaria alcanzan el 20% de SCG, cercano a las proporciones fisiológicas reales de fosfolípidos/gangliósidos que se encuentra en el tejido cerebral normal [30].

Las imágenes BAM mostraron que las estructuras fibrilares cambian con el aumento de la proporción de G_T a dominios redondeados e irregulares y se disuelven completamente por el efecto de los gangliósidos hasta que son indetectables al 20% de SCG (ver **Figura 2.12B**).

Es importante señalar que el efecto de "**inhibición lateral**" tiene lugar sin la desorción del péptido $A\beta(1-40)$ en la subfase, ya que las isotermas mantienen el área molecular desde inicio hasta el colapso. Además, el efecto de "**inhibición lateral**" se mantiene con los cambios observados en la topografía de la imagen AFM y la microscopía de fluorescencia ThT (ver más abajo).

Hasta 15% de SCG (hasta 0,139 de fracción molar de G_T) se observa un comportamiento bifásico de las monocapas (mezclas ternarias con fibras). Sin embargo, al 20% de SCG, se aprecia claramente una fase homogénea (sin fibras) con valores de reflectividad similares a los observados para G_T puro (**Figura 2.14A**) según la imagen BAM (**Figura 2.12B**). El perfil de las isotermas del π -área nos permite construir experimentalmente un diagrama de miscibilidad de las interfases mezclas [91] (ver **Figura 2.13**).

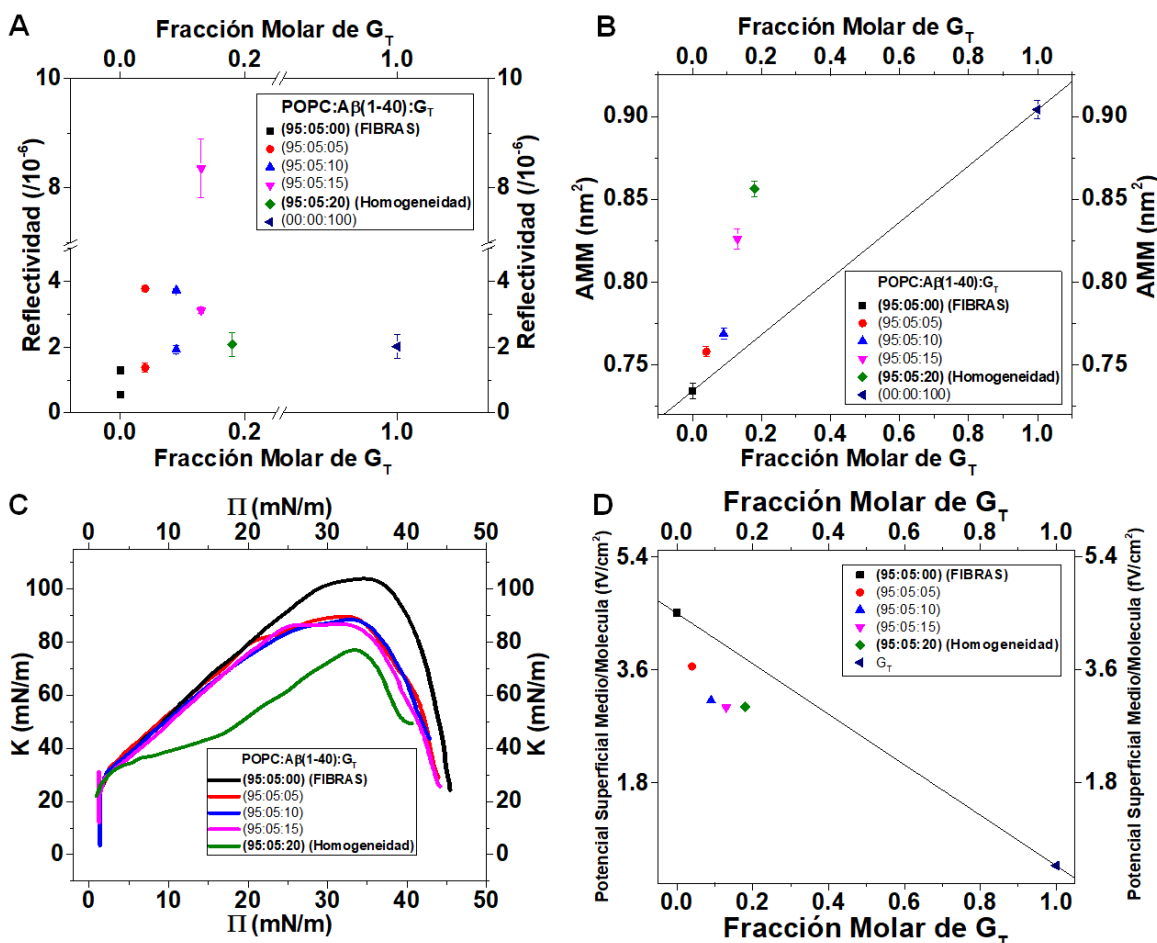


Figura 2.13: Comportamiento interfacial de la mezcla POPC/Aβ(1-40)/GT. **A:** Diagrama de fase de la mezcla POPC/Aβ(1-40)/GT, muestra la transición de fase en función de la reflectividad. **B:** Análisis de inmiscibilidad lateral; AMM vs. fracción molar de GT tomada a ~20 mN·m⁻¹. **C:** Módulo de compresibilidad vs. Presión superficial. El análisis muestra el comportamiento particular de los gangliósidos totales en comparación con sus mezclas. **D:** Análisis de Potencial de superficie vs. AMM, muestra el comportamiento de potencial de superficie/molécula por encima del 5% de SCG. La mezcla POPC/Aβ(1-40)/GT tiene un comportamiento peculiar de separación de fases entre el 5% y el 15% de GCS mostrando dominios irregulares, mientras que al 20% de SCG se aprecia homogeneidad total.

En nuestro caso particular tenemos que considerar cuatro aspectos moleculares relacionados con el peculiar comportamiento superficial de las mezclas de G_T/POPC estudiadas en su interacción con el péptido amiloide Aβ(1-40). Estos son: **i)** la longitud de las cadenas hidrofóbica y la coincidencia (matching) entre la porción hidrofóbica de los gangliósidos y POPC; **ii)** tanto POPC como G_T tienen similar carácter líquido-expandido en la interfase aire/agua; **iii)** POPC es considerado como un inductor de fibra de Aβ(1-40) cuando el péptido está a baja proporción en la mezcla [28] pero no gangliósidos puros por sí mismos (**Figura 2.15B**); **iv)** el grupo polar del oligosacárido complejo, la carga negativa dada por el ácido

siálico, su respectivo estado de hidratación así como su organización dipolar (potencial de superficie) son propiedades distintivas de los gangliósidos (**Figura 2.13D**).

La combinación de estas dos últimas propiedades moleculares de los gangliósidos puede ser la responsable de desencadenar el proceso de inhibición de la formación de las estructuras fibrilares y de dominio irregulares conduciendo a una homogeneidad completa de la interfase mezcla (es decir no detectables a escala BAM o AFM) al 20% de SCG (**Figuras 2.12B y 2.13B**). Es válido destacar que la separación de fases es un fenómeno importante en biología de sistemas para explicar el ensamblaje de proteínas asociado con enfermedades neurodegenerativas [24]. En este sentido, estamos aportando evidencias experimentales de que el mismo concepto puede extenderse para un sistema de entorno de membrana. Basándonos en el análisis de reflectividad, mostramos cómo es posible que las fibras amiloides nanoestructuradas se rompan o se disuelvan en dos fases coexistentes mediante un proceso cooperativo inducido por moléculas con distintivas propiedades laterales, como parecen hacer los gangliósidos. Adicionalmente, el fenómeno ocurre sin alterar la estabilidad global de la monocapa formada por una mezcla ternaria, porque si ocurría lo contrario se produciría una pérdida de presión superficial por desorción de los componentes que forman la interfase en la interfase.

El análisis del comportamiento de las mezclas POPC/A β (1-40)/G_T es complejo y sugiere dos aspectos diferenciables: una inmiscibilidad lateral entre el 5% y 15% de SCG que se vuelve completamente homogénea al 20% (**Figuras 2.13B y 2.14**). Sin embargo, al 10 % de SCG, el análisis de superficie mostró que POPC/A β (1-40)/G_T siguen siendo inmiscibles con la formación de dominios irregulares observables mediante las técnicas, BAM y AFM (ver más abajo y la **Figura 2.14**). Estos dominios redondeados son ThT positivos (**Figura 2.17**) similares a las estructuras fibrilares [28]. Al 5% de SCG todavía observamos dominios que indican inmiscibilidad lateral, pero sin una desviación apreciable en las áreas moleculares (**Figura 2.13B**).

Teniendo en cuenta la complejidad del sistema es necesario profundizar las propiedades de la monocapa para una mejor descripción. Para ello se determinó la pendiente de las isothermas π -área, esto nos permite calcular la compresibilidad de la interfase en la mezcla, y su recíproco definido como módulo de compresibilidad superficial (K). El cual se estima de acuerdo a: $K = -A(\partial\pi/\partial A)$ donde A es el área molecular interfacial (a la presión superficial π) y π es la presión superficial de la monocapa [85].

Durante la compresión de la monocapa se apreció la aparición de dominios irregulares al 5%, 10% y 15% de SCG volviéndose homogéneos al 20% de SCG según las imágenes de BAM y AFM (Figura 2.14).

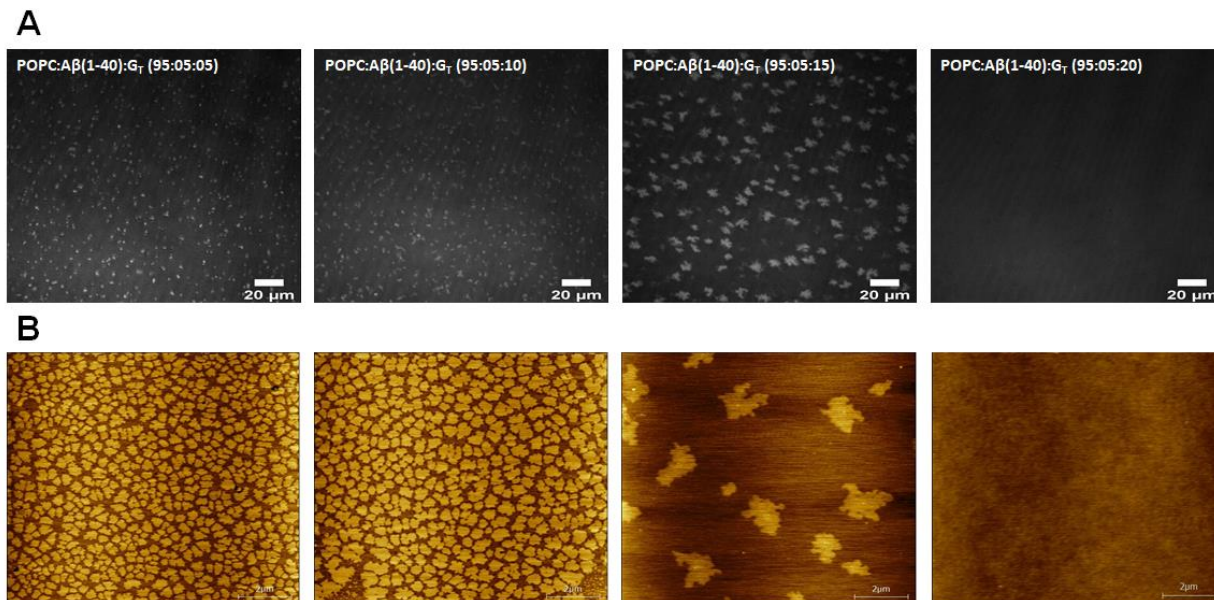


Figura 2.14: Imágenes BAM y las respectivas imágenes topográficas AFM de POPC/Aβ(1-40)/GT. A: Imágenes BAM de mezclas POPC/Aβ(1-40)/GT en el GCS indicado. B: Imágenes de topografía AFM de mezclas POPC/Aβ(1-40)/GT en GCS indicado. Las películas mixtas se comprimieron hasta $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^2$ y se transfirieron a la mica apoyo. Se muestran los dominios irregulares a lo largo de $2 \mu\text{m}$ de longitud (ver la barra blanca). Vale la pena señalar que la imagen de AFM es de $11 \times 11 \mu\text{m}$, mientras que la imagen de BAM es de $200 \times 250 \mu\text{m}$ (consulte la Sección Experimental para obtener más detalles).

El módulo de compresibilidad (K) al 5%, 10% y al 20% de SCG presentó un máximo en ~ 31.1 , ~ 32.7 y $\sim 33.4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, al 15% de GCS presentó dos máximos bien definidos de K en $\sim 25,7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ y $\sim 31,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figura 2.13C). Estos puntos de K , en las isothermas nos están indicando el establecimiento de la coexistencia de dos fases en la interfase formada por la monocapa ternaria en la que se establece un nuevo reordenamiento entre las moléculas formadoras de estructuras amiloides que se van disolviendo progresivamente en una nueva fase a medida que aumenta la SCG, hasta ser completamente homogéneo al 20% de la SCG (Figuras 2.12B, 2.13C y 2.14).

Es importante evaluar el comportamiento del AMM y el Potencial Superficial Medio (PSM) por molécula comparado con los valores ideales [85] en las mezclas donde se produce la formación/disolución de fibras amiloides. En la Figura 2.13 se muestra una vista completa de

los datos de miscibilidad. En la región de SCG (15-20% con tendencia a la fusión de amiloide) se detecta un área molecular experimental más alta, compatible con una forma más monomérica del amiloide en comparación con las estructuras fibrilares observadas al 95:05:00 de SCG (**Figura 2.13A**), de acuerdo con una disminución en los valores del PSM/molécula. Estos hechos indican claramente que no hay desorción de las moléculas del péptido A β (1-40) de la interfase ya que la mezcla de gangliósidos previene la formación de la estructura fibrilares de amiloide pero sin inducir pérdida de material interfacial.

2.1.4.2. Análisis de reflectividad en BAM e intensidad de fluorescencia (ThT) de los dominios irregulares en interfases de mezcla POPC:A β (1-40):G $_T$

Luego de comprender mejor el comportamiento de miscibilidad en monocapas de mezclas ternarias (lípidos/péptido/gangliósidos) a través de evaluaciones de K, AMM y PSM/molécula se realizó un análisis más exhaustivo de las imágenes de BAM obtenidas para dichas mezclas. El mismo consistió en calcular la reflectividad en diferentes zonas de las imágenes incluyendo los dominios irregulares. Este enfoque lo hemos utilizado anteriormente para atribuir qué tipo de moléculas en la monocapa son responsables de una determinada reflectividad (intensidad del brillo de la monocapa [28]). De esta manera, hemos discriminado tres patrones bien definidos de reflectividad. El primero, se refiere a los valores de reflectividad más altos que se identifican con el péptido A β (1-40), los valores de reflectividad bajos corresponderían a la fase de POPC pura, y el tercer patrón de valores intermedios de reflectividad similares a los encontrados para G $_T$ puro, (**Figura 2.15A**). Este análisis general nos permite atribuir los valores más altos de reflectividad en la monocapa mezcla ternaria a una fase más enriquecida en péptido que corresponde a los dominios irregulares separados del resto de la fase enriquecida en lípidos (ver **Figura 2.15A** líneas de puntos).

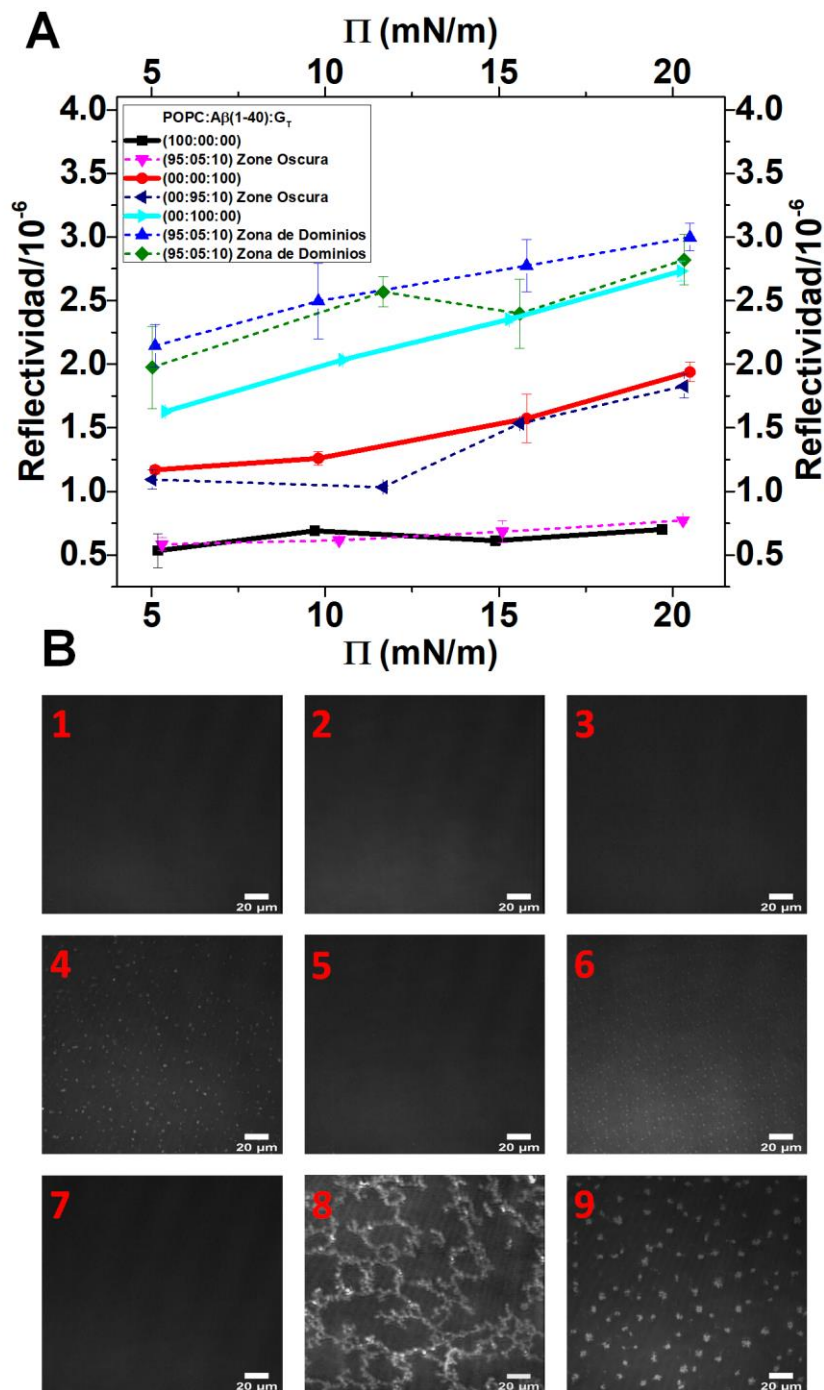


Figura 2.15: Análisis de reflectividad para detectar el origen de los dominios irregulares en las mezclas POPC:Ab(1-40):G_T. **A:** Valores de reflectividad que indican las tres regiones (tres colores) con diferentes intensidades en las imágenes de BAM de las mezclas POPC/Ab(1-40)/G_T. Los valores bajos de reflectividad están cerca del lípido POPC puro (negro); los valores altos de reflectividad fueron similares a los péptidos Ab(1-40) puros (azul); y los valores intermedios de reflectividad corresponden a G_T puro. Mientras que los dominios irregulares tienen valores de reflectividad similares a los del péptido Ab(1-40). **B:** Imágenes de BAM que muestran los componentes puros en monocapas así como sus mezclas a diferentes proporciones. Las proporciones mostradas en las imágenes fueron: 1) POPC

puro, 2) G_T puro, 3) $A\beta(1-40)$ puro, 4) POPC/ $A\beta(1-40)/G_T$ (95:05:10), 5) POPC/ $A\beta(1-40)/G_T$ (95:05:20), 6) $A\beta(1-40)/G_T$ (90:10), 7) POPC/ G_T (90:10), 8) POPC/ $A\beta(1-40)$ (95:05), 9) POPC/ $A\beta(1-40)/G_T$ (95:05:15).

Es importante enfatizar que el efecto de disolución de los G_T necesita la participación sinérgica de POPC en la interfase mixta. En ausencia total de POPC y en presencia de G_T puro mezclado con el péptido $A\beta(1-40)$, se observaron pequeños dominios redondeados que son ThT negativos (**Figura 2.15B, parte central derecha**), pero nunca una estructura fibrilar similar a la inducida por POPC mezclado con $A\beta(1-40)$ en mezcla binaria. (**Figura 2.15B, imagen B8**). Sin embargo, las fibras amiloides formadas en presencia de POPC puro se funden gradualmente a medida que aumenta la proporción de G_T hasta que se alcanza una homogeneización completa al 20% de G_T con respecto a POPC (**Figura 2.12B imagen B5 y Figura 2.15B, imagen B5**). En la comunidad científica es ampliamente aceptado que la particular reactividad de la sonda fluorescente ThT con fibras de $A\beta(1-40)$ es uno de los requisitos que debe cumplir un agregado de este péptido para ser considerado amiloide [93]. En secciones anteriores informamos sobre la técnica adaptada para visualizar si las fibras amiloides formadas como consecuencia de la interacción del péptido $A\beta(1-40)$ con POPC en monocapas de Langmuir, se tornan ThT positivos al transferir la monocapa empaquetada a un soporte de mica, seguido de una incubación en presencia del ThT y finalmente observación por microscopía de fluorescencia [28]. Usando un enfoque similar, encontramos que los dominios irregulares observados a través de imágenes obtenidas por BAM de la mezcla ternaria POPC/ $A\beta(1-40)/G_T$ (95:05:10) fueron ThT positivos. Las imágenes de las monocapas transferidas al soporte sólido mostraron un patrón de fluorescencia que mantiene los dominios con la geometría irregular similar a los observados en las imágenes topográficas de BAM y AFM. El hecho de que la morfología de los dominios y las estructuras similares a fibrillas sean bastante similares mediante el uso de microscopía de fluorescencia (ThT), BAM, AFM está indicando que las estructuras amiloides permanecen casi sin alteración a pesar de la manipulación técnica de la interfase.

En este sentido y a modo de control negativo observamos que ni las monocapas de los componentes individuales puros de la mezcla fueron ThT positivas (**Figura 2.16B**) [28]. Por lo tanto, los controles negativos anteriores se usaron para cuantificar, por comparación, el patrón de intensidad de fluorescencia ThT de los dominios irregulares (**Figura 2.16B**). Como comprobación adicional usamos como control positivo, fibras de α -sinucleína las que emitieron fluorescencia en presencia de ThT sometida a tratamiento similar (**Figura 2.16B, imagen B3**).

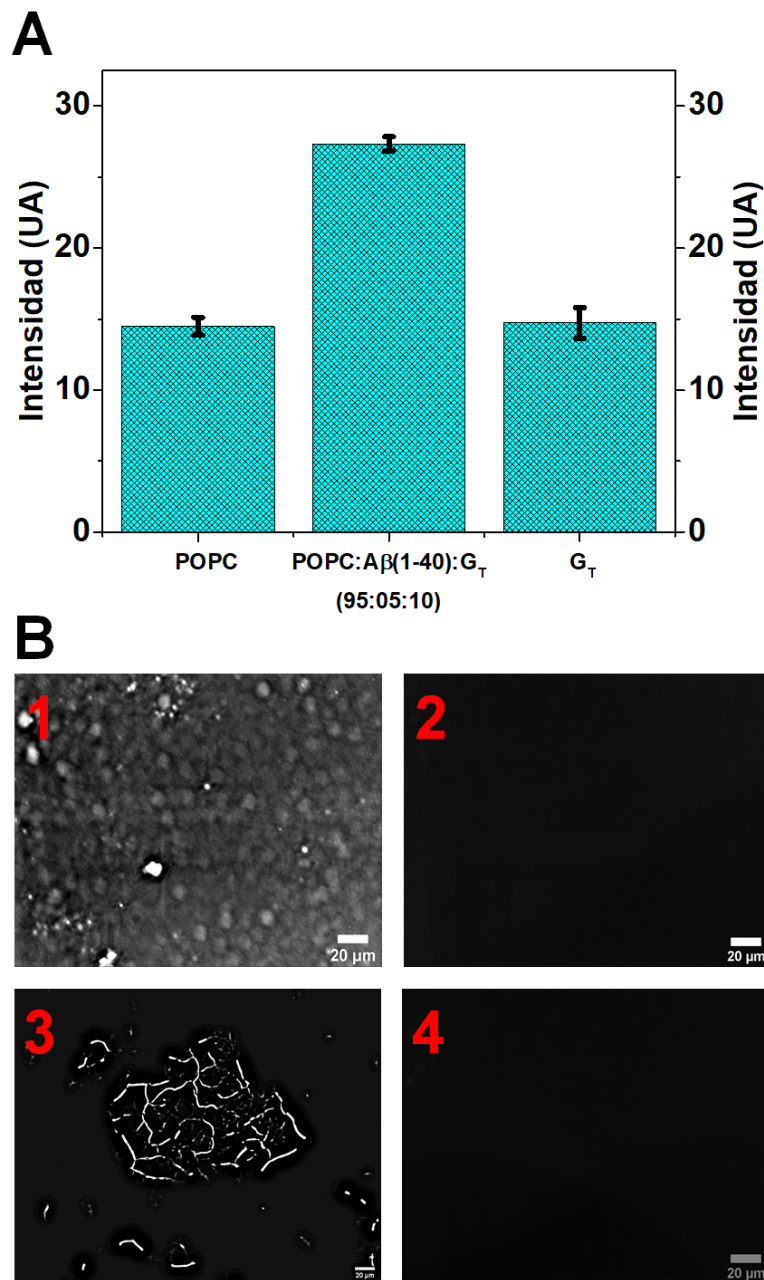


Figura 2.16: Confirmación de ThT de dominios irregulares de amiloide A β (1-40) inducidos por GT en la interfase aire-agua. A: Análisis de los valores de intensidad de fluorescencia de films transferidos desde la monocapa de Langmuir al soporte sólido de mica después de la incubación en una solución con ThT a temperatura ambiente. Se transfirieron films mezclas, G_T puro y POPC puro. La intensidad promedio corresponde a todas las señales de fluorescencia sin procesamiento de imágenes. **B:** Las imágenes de fluorescencia de los controles negativos (G_T puros y POPC puros) y los dominios irregulares de POPC/A β (1-40)/G_T mezcla a (95:05:05) se obtuvieron después de transferirlos al soporte de mica. La α -sinucleína se usó como control positivo formada en solución, luego se transfirió a un soporte sólido y se incubó con ThT. En la esquina inferior derecha, la barra blanca representa la escala de 20 μ m.

2.1.4.3. Las fibras amiloides son disueltas dinámicamente por G_T

La naturaleza de las interacciones moleculares que subyacen de las transformaciones progresivas de las estructuras fibrilares en la interfase agua/aire por el incremento de la proporción de gangliósidos, nos llevó a diseñar un experimento más dinámico en el que sería posible seguir el curso temporal del proceso de disolución inducido por G_T en una única monocapa mezcla. En la **Figura 2.17 (A y B)** mostramos un diagrama de la configuración experimental usada en monocapa agua/aire para seguir dinámicamente el proceso de disolución de las estructuras fibrilares de amiloide.

Para realizar los experimentos dinámicos dividimos la cuba de teflón acoplada al BAM, en dos monocapas confinadas y separadas en la superficie por una barrera móvil en sentido vertical (ver **Figura 2.17, parte superior izquierda**) que permite mezclar ambas monocapas separadas simplemente levantando la barrera. En el compartimento derecho se esparció la monocapa de POPC:A β (1–40) 95:05 y se fijó la presión de superficie a $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, donde se observan claramente las estructuras fibrilares. En el compartimento izquierdo, se extendió una monocapa de G_T puros y se comprimió hasta $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en una cantidad equivalente de moléculas de glicoesfingolípidos para alcanzar una monocapa mezcla total de POPC:A β (1–40): G_T 95:05:20 después de la mezcla lateral. Luego, la barrera móvil vertical de separación se levantó con cuidado permitiendo la mezcla lateral de los componentes superficiales debido al efecto Marangoni (la masa de anfifilos se mueve rápidamente sobre la superficie debido al gradiente de tensión superficial [123] (ver **Figura 2.17**).

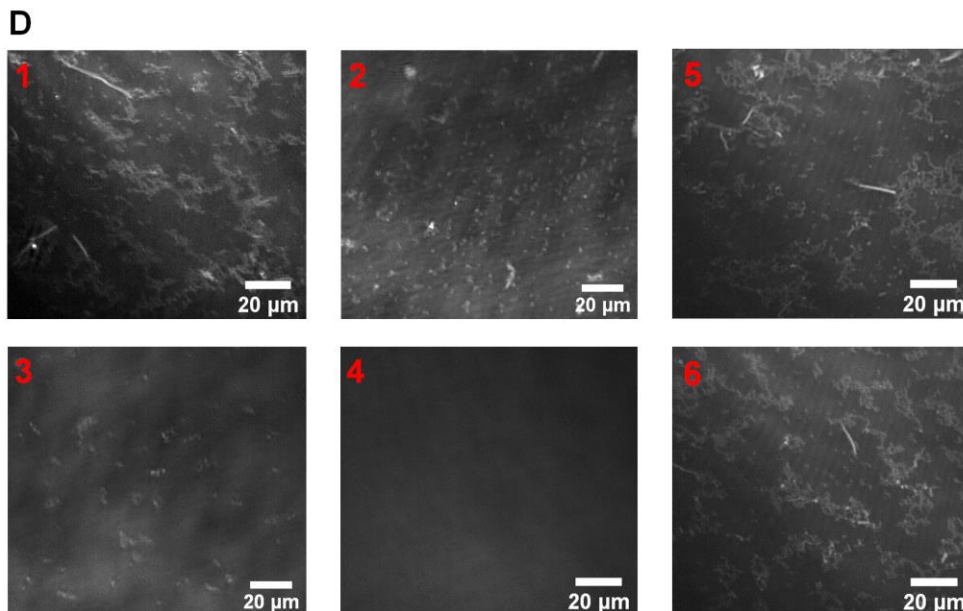
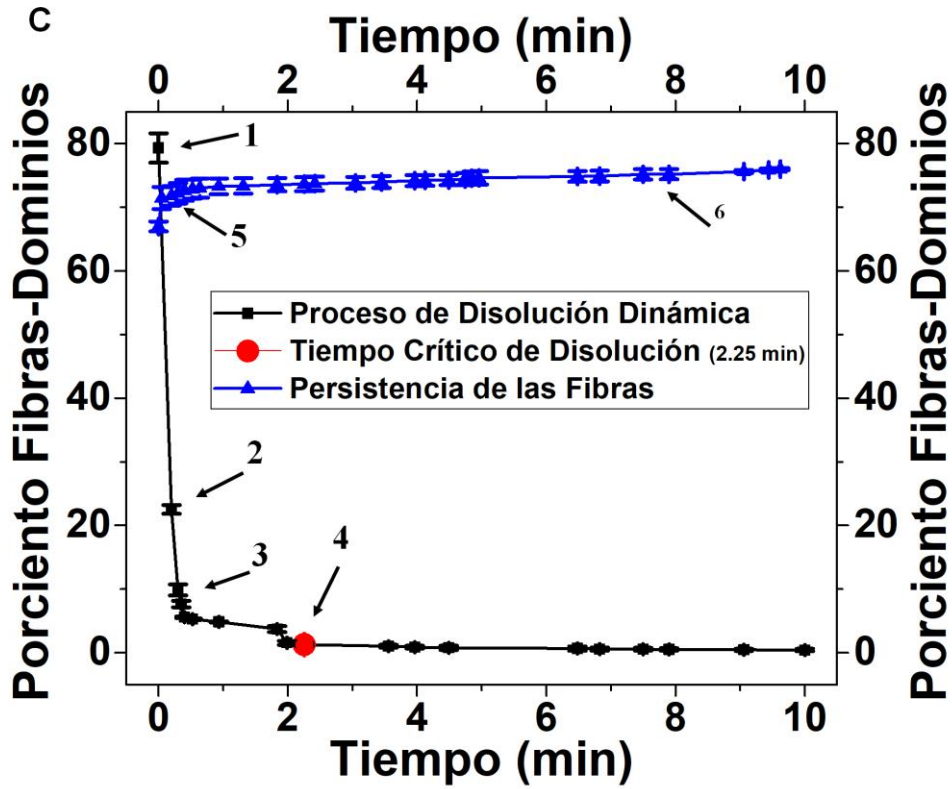
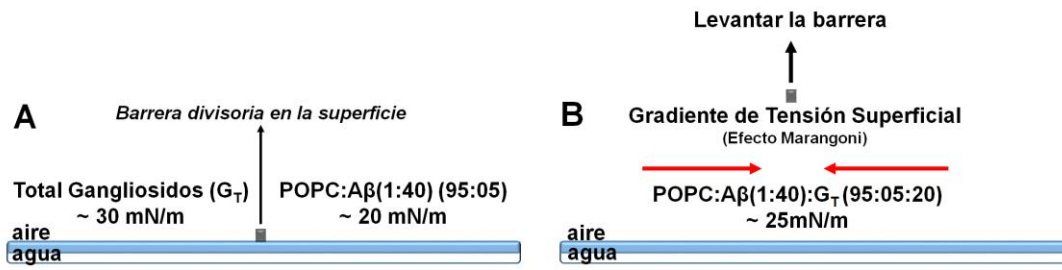


Figura 2.17: Visualización del proceso de disolución dinámica desencadenado por la difusión lateral de gangliósidos. Parte superior: configuración para mediciones dinámicas acopladas a BAM, **A:** Dispersión de G_T pura a ~ 30 mN/m en el compartimento izquierdo y POPC/ $A\beta(1-40)/G_T$ (95:05:00) con nanoestructuras fibrilares (~ 20 mN/m) confinadas en el compartimento derecho separado por una barrera móvil. **B:** Al levantar la barrera móvil permite la mezcla rápida de ambas superficies debido a la presión superficial inicialmente desigual (efecto Marangoni). **C:** Cuantificación del proceso de disolución desde 0 min (justo antes de levantar la barrera móvil) hasta 10 min cuando en el compartimento izquierdo se colocó G_T (línea negra, Dynamic Smelt Process) o POPC puro (línea azul, Dynamic Fibrils Keeping). **D:** Imágenes BAM correspondientes a los tiempos indicados en **C** en el proceso de disolución dinámica (**imagen 1 a la imagen 4**) así como la persistencia de las fibras (**imagen 5 a la imagen 6**).

Tan pronto como la barrera de separación se mueve hacia arriba, las moléculas de ambas monocapas preformadas entran en contacto entre sí y la presión superficial se equilibra rápidamente al valor aproximado de $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, formando ahora una monocapa de tres componentes. De manera que observamos un efecto de disolución rápida inducido por los gangliósidos. El ensayo se testeó en dos situaciones experimentales diferentes para descartar un efecto debido a la posible perturbación mecánica dado por el rápido mezclado lateral. En el compartimento izquierdo de la cuba donde se esparció G_T puro inicialmente, se colocó POPC puro, mientras que en el derecho se mantuvieron las estructuras fibrilares; al levantar la barrera las estructuras fibrilares se conservaron después de mezclar ambas superficies (**Figura 2.17C y D**). La disolución de las fibrillas provocada por los gangliósidos es un proceso rápido donde al cabo de unos 3 min ya no se aprecian prácticamente estructuras fibrilares observables por BAM. El tiempo de disolución crítico calculado fue de 2,35 min, este es el tiempo necesario para disolver completamente las fibrillas de $A\beta$ preformadas.

2.1.4.4. Significado general de los resultados hallados por efecto de gangliósidos

Es conocido que la región interfacial de la membrana aparece como el entorno natural en el que los péptidos $A\beta$ se procesan y pueden acumularse en mayor o menor medida dependiendo de la composición de la membrana, que puede actuar como catalizador o inhibidor de la agregación de amiloide [3, 124].

Recientemente, se ha destacado que la membrana tiene una fuerte influencia como promotor de la agregación amiloide o como formador de co-agregados amiloide-lípido [95]. En este sentido, hemos demostrado en secciones anteriores que la formación de estructuras fibrilares de $A\beta$

amiloide puede inducirse en la interfase agua/aire dependiendo del estado físico del fosfolípido y la proporción lípido/péptido amiloide [28].

Varios autores han reivindicado el supuesto papel de los gangliósidos como posibles agentes amiloidogénicos. En particular, GM₁ que se ha identificado como la molécula probable de unión al péptido amiloide A β en las membranas de las células neuronales [8, 111, 125, 126]. Más recientemente, se ha demostrado que en bicapas lipídicas formadas por POPC y GM₁ disminuye la fuerza de unión del péptido amiloide A β [127], lo que sugiere que la interacción de POPC:gangliósidos podría dar una propiedad adicional en la interacción amiloide-membrana. En este sentido, se ha planteado que GM₁ mejora la unión del péptido A β (1-42) en una proporción baja de gangliósidos insertados en bicapas de fosfolípidos en estado líquido desordenado [111].

Como hemos mencionado, las monocapas del lípido POPC (en estado líquido expandido equivalente a líquido desordenado) tienen un efecto inductor de estructuras fibrilares en el péptido A β (1-40) en una proporción baja de péptido. Por lo tanto, las estructuras fibrilares pueden activarse en un entorno enriquecido de lípidos POPC en la superficie de la membrana [28]. En este estudio demostramos que los gangliósidos tienen un doble efecto: *i*) suprimir el efecto inductor de POPC en la formación estructura fibrilares en interfases agua/aire, y *ii*) ser efectivo en disolver, en forma muy rápida, las estructuras fibrilares preformadas previamente e inducida por POPC. En este caso hemos utilizado G_T de tejido cerebral total donde la masa de G_T en más del 90% está representada principalmente por cuatro gangliósidos complejos: GM₁, GD_{1a}, GD_{1b} y GT_{1b} [30].

Es importante señalar que los péptidos A β (1-40) y A β (1-42) puros forman monocapas de Langmuir con una alta estabilidad lateral manteniendo una alta reología en la interfase aire/agua [20, 21, 28]. Sorprendentemente, en las monocapas de A β (1-40) puro, el péptido altamente concentrado en la interfase se comporta como un film sólido [21] pero la proteína en esta conformación altamente empaquetada no forma fibras tipo amiloide y es ThT negativa [28], lo que indica que la disposición altamente empaquetada de los péptidos A β (1-40) no es condición necesaria para desencadenar una transición de monómeros \rightarrow fibras. La condición necesaria para la fibrilogénesis de amiloide en la interfase agua/aire es mezclar una pequeña proporción de péptido A β (1-40) con POPC, reforzado por el hecho de que son fibras ThT positivas [28]. El hecho de que los lípidos de la membrana pueden modular la fibrilación de una proteína

amiloide también se ha estudiado para α -sinucleína mediante el uso de modelado molecular [124].

La novedad que estamos introduciendo a través de este estudio de tesis, es que la mezcla preformada de estructuras fibrilares de POPC/A β (1-40) puede disolverse dinámicamente cuando se permite que los gangliósidos difundan lateralmente por el gradiente de tensión superficial en la interfase agua/aire (ver **Figura 2.17**). En este sentido se ha reportado las propiedades de disolución lateral del gangliósido GM₁ en bicapas [128]. Nosotros observamos que el proceso de disolución depende de la proporción superficial de gangliósidos en relación con los fosfolípidos. Al 20% de SCG, la interfase ternaria mixta se vuelve completamente homogénea sin dominios que puedan detectarse mediante técnicas tales como BAM o AFM (**Figura 2.12**). Es importante señalar que el efecto de la disolución completa de estructuras fibrilares tiene lugar a 80:20 de proporción de área lipídica POPC:G_T en las monocapas de mezclas ternarias preparadas con POPC/A β (1-40)/G_T. Sin embargo, en monocapas de mezclas binarias G_T:A β (1-40) preparadas en ausencia de fosfolípidos, el péptido mostró inmiscibilidad lateral con la presencia de pequeños dominios redondeados detectables, pero son ThT negativos (**Tabla 1**). La incorporación de POPC induce fibras ThT positivas. Estos resultados indican que la mezcla POPC:G_T, dependiendo de la proporción relativa, impone propiedades superficiales y condiciones adecuadas no solo para evitar la fibrilación de amiloide sino también para disolverlos por completo (**Figura 2.12**, ver resumen en la **Tabla 1**). Se sabe que los grupos hidrofílicos del grupo polar de los glicoesfingolípidos complejos pueden ofrecer una variedad estructural de cadena de oligosacáridos que pueden conducir a interacciones específicas con proteínas en la superficie de la membrana neuronal [37]. En este sentido se encontró que los péptidos A β amiloides y los dominios de α -sinucleína interactúan específicamente con la porción de oligosacárido del gangliósido GM₁ [129-131]. Aunque también se informó que el péptido amiloide A β tiene una región en su secuencia con afinidad de la porción hidrofóbica de ceramida del glicoesfingolípido [132, 133].

Además, como hemos mostrado al usar fosfolípidos-PC con diferentes longitudes de cadena, observamos que las diacil-fosfatidilcolinas en estado líquido expandido (DMPC, POPC) tienen la propiedad de inducir estructuras fibrilares ThT positivas, pero no fosfolípido más sólido como DSPC [28]. En general, con estos estudios estamos indicando que el proceso de inducción y disolución de las estructuras fibrilares de amiloide en la interfase agua/aire es un fenómeno complejo que depende simultáneamente del estado físico de los lípidos y el tipo de monocapas

que forman, la proporción relativa de contenido de lípidos/péptidos en la interfase y la composición ternaria que le da propiedades a la mezcla. En este sentido, se encontró que el grupo fosforilcolina de la región polar de los lípidos PC es importante para interactuar con los gangliósidos más complejos [134]. Por otro lado, es importante destacar el papel del agua donde la hidratación interfacial global de los gangliósidos medida por propiedades de la sonda de Laurdan es completamente diferente a la observada para los fosfolípidos-PC en estado líquido-expandido [120, 121] indicando que, dependiendo de los lípidos y proporciones, la interfase mezcla puede establecer nuevos arreglos que, a su vez, pueden facilitar o desfavorecer la estructuración del amiloide en un entorno similar a una membrana.

Por otro lado, recientemente ha cobrado interés el concepto de fase de transición como una evolución del concepto de agregación que puede explicar los depósitos de proteínas citoplasmáticas que se encuentran en las enfermedades neurodegenerativas [24]. De manera que estamos proponiendo extender estos conceptos a lo que está ocurriendo en un entorno anfipático más complejo, como una de membrana biológica.

Así, siguiendo el mismo razonamiento se puede incluir al A β -amiloide (actor clave en la Enfermedad de Alzheimer) en la lista de amiloidosis. En realidad, se necesitan datos experimentales más directos que apoyen las ideas de Mathieu *et al.* [24] para comprender cómo se relacionan los depósitos de A β -amiloide con la disfunción neuronal llegando a la muerte celular. En este nuevo paradigma, la acumulación de proteínas puede clasificarse como transiciones de fase patológicas. Esto se refiere a una ruptura de la simetría por un cambio cooperativo en el orden molecular que provoca una modificación del entorno del medio biológico confinado, que puede inducir, luego, cambios en la homeostasis celular, lo que a su vez conduce a la muerte de las neuronas. Si el orden se define como un estado de alta asimetría (**Figura 2.17**), siguiendo la idea de Mathieu *et al.* [24], se produciría una transición de orden a desorden debido a una ruptura en los parámetros de asimetría, por lo que podría conceptualizarse que el proceso de disolución que observamos en las estructuras fibrilares de A β amiloides, pasando a través de fibras \rightarrow dominios irregulares hasta obtener una homogeneidad completa al 20% de SCG (ver las **Figuras 2.12, 2.14, 2.17 y Tabla 1**).

Tabla 1: Resumen de las condiciones de disolución interfacial de fibras lípido/amiloide inducida por gangliósidos totales de cerebro. (en negrita y cursiva se representa la condición experimental dinámica)

Condición interfacial (Proporciones)	Patrón interfacial observado por BAM, AFM y Análisis ThT por FM
Lípido POPC puro sin A β (1-40)	ThT negativo homogéneo
G _T puro sin A β (1-40)	ThT negativo homogéneo
A β puro (1-40) sin lípidos	ThT negativo homogéneo
POCP/Aβ (1-40) (95:05)	Estructuras fibrilares ThT positivo
GT/A β (1-40) (95:05)	Pequeños dominios redondeados ThT negativo
POCP:Aβ (1-40):G_T (95:05:10)	Pequeños dominios redondeados ThT positivo
POCP:A β (1-40):G _T (95:05:15)	Dominios irregulares ThT positivo
POCP:A β (1-40):G _T (95:05:20)	ThT negativo homogéneo
<i>POCP:Aβ (1-40):G_T (95:05:20)</i> <i>(condición dinámica a 0 min de hecha la mezcla)</i>	<i>Estructuras fibrilares ThT positivas</i>
<i>POCP:Aβ (1-40):G_T (95:05:20)</i> <i>(condición dinámica a los 5 min de post- mezcla)</i>	<i>ThT negativo homogéneo</i>

La interacción de los gangliósidos con los fosfolípidos-PC es compleja y depende de la insaturación, la longitud de las cadenas hidrofóbicas de ceramida, así como de las cadenas de ácidos grasos de los lípidos y del tamaño del grupo de oligosacáridos de la región polar en el glucoesfingolípido, que a su vez modula el estado de hidratación de la monocapa en la interfase [32, 42, 120]. POPC es uno de los fosfolípidos más abundantes en el tejido cerebral y uno de los principales componentes lipídicos de las membranas neuronales [9, 11] pero, mezclado como componente puro con el péptido A β , actúa como un promotor de fibrillas amiloides que puede ser convenientemente suprimido por la presencia de una mezcla fisiológica de gangliósidos.

En el presente trabajo de tesis, mostramos fuertes evidencias experimentales en modelos de membranas de cómo el proceso de inducción o disolución de fibras amiloides pre-formadas de las fibras amiloides puede desencadenarse y favorecerse dinámicamente mediante cambios en el entorno lipídico en condiciones fisiológicas. Sin embargo, aún no está claro cuál es la entidad

molecular precisa de la estructura del péptido A β que realmente dañaría las neuronas: monómeros, oligómeros, protofibrillas o fibrillas [135, 136].

Así, si planteáramos la hipótesis de que la acumulación de estructuras fibrilares aquí presentadas y con comportamiento ThT positivo son las responsables del daño de la membrana neuronal, los gangliósidos o una molécula gangliósido-mimética pueden ser una solución terapéutica potencial para recuperar la homeostasis en células, sumado a su buen efecto antiinflamatorio el cual ha sido estudiado [137-140].

2.1.5 Influencia de la reversión de la secuencia de los péptidos amiloides A β (1-40) y A β (1-42) en mezclas con POPC.

2.1.5.1 Propiedades de superficie de monocapas mezclas de POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) comparadas con POPC/A β (1-40) y POPC/A β (1-42) respectivamente. Isotermas π -Área e imágenes de BAM.

De acuerdo a resultados previos el péptido A β (1-42) forma monocapas en la interfase agua/NaCl con una estabilidad lateral de alrededor de 30 mN/m y con un área molecular de alrededor de los 2.5 nm²/molécula (**Figura 2.18A**) estas propiedades de superficie son similares a las del péptido A β (1-40) [20, 21] (**Figura 2.1**). Las imágenes obtenidas por BAM de los péptidos de secuencia reversa puros A β (42-1) y de A β (40-1) son homogéneas sin estructuras fibrilares apreciables (**Figura 2.18A, imágenes 4 y 5**); mostrando un comportamiento superficial similar a lo indicado previamente para los péptidos puros A β (1-40) y A β (1-42) [28] (ver sección 2.1.1).

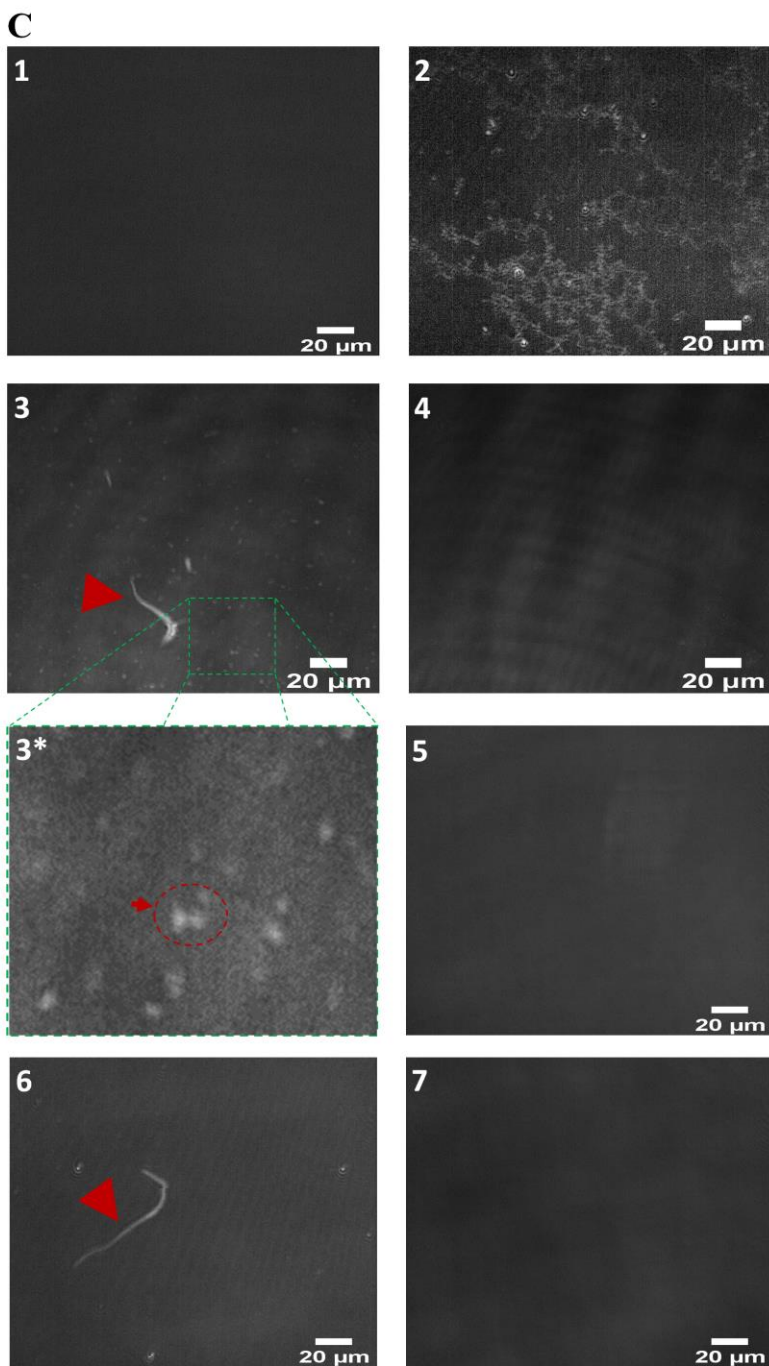
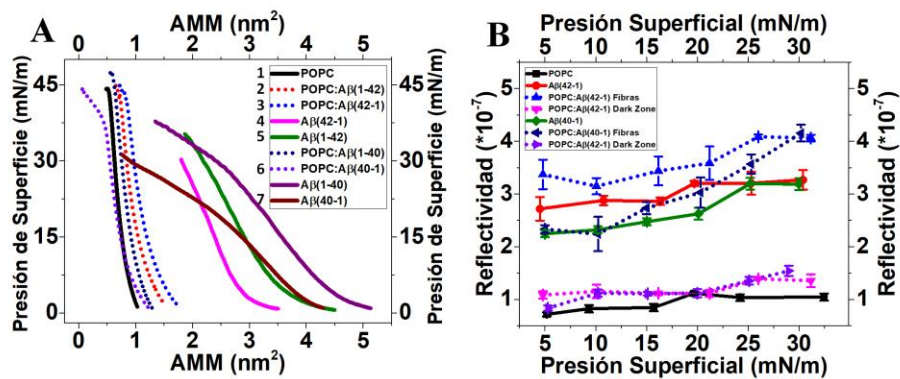


Figura 2.18: Propiedades de superficie e imágenes de BAM de monocapas mezclas de POPC/A β (40-1), POPC/A β (42-1), POPC/A β (1-40) y POPC/A β (1-42). **A:** isotermas π -Área e imágenes de BAM de las mezclas POPC/A β (40-1), POPC/A β (42-1), POPC/A β (1-40) y POPC/A β (1-42) y sus respectivos componentes puros. **B:** Análisis de reflectividad a partir de las imágenes de BAM para las mezclas POPC/A β (42-1) y POPC/A β (40-1). El análisis mostró dos regiones distinguibles. Los valores pequeños corresponden al lípido POPC puro (negro). Los valores de reflectividad altos son similares a los péptidos A β puros (A β (40-1)—verde y A β (42-1)—rojo), mientras que las estructuras fibrilares aisladas mostraron valores cercanos al péptido A β (40-1) y A β (42-1) (líneas azules de puntos). AMM: es el Área Molecular Media. Estas fueron calculadas como se indica en Materiales y Métodos. **C:** Imágenes de BAM obtenidas a 20 mN/m de monocapas de los componentes puros y sus mezclas a 95:05 de PAP. Las fracciones molares de péptido en las mezclas fueron de 0.019 y 0.013. Las mezclas POPC/A β (1-42) y POPC/A β (1-40) mostraron estructuras fibrilares en arreglos en forma de network (*imagen 2*) mientras que las mezclas de POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) mostraron estructuras fibrilares aisladas (*flecha roja en imagen 3 y 6*). En la mezcla POPC/A β (42-1) se observaron dominios redondeados/oligómeros (*círculo rojo en imagen 3**). La barra sólida en las imágenes representa 20 μ m.

En esta sección mostramos por primera vez un estudio del comportamiento en superficie de monocapas mezclas de POPC/A β (1-40) y POPC/A β (1-42) comparado con monocapas mezclas de sus péptidos análogos de secuencia reversa, POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) respectivamente (ver **Figura 2.18A**).

Teniendo en cuenta lo anterior, para proporciones equivalentes a lo visto en los amiloides con secuencia normal, la fibrilación en estos péptidos de secuencia reversa influye en la orientación del enlace peptídico, ya que poseen una hidrofobicidad global parecida. En este caso particular nosotros tenemos que considerar que en la fibrilación de estos péptidos de secuencia reversa influye la orientación del enlace peptídico.

Como hemos visto anteriormente la mezcla POPC/A β mostró un comportamiento complejo en la interfase agua/NaCl [28]. Para lograr un mejor entendimiento cualitativo acerca de la formación de las fibras y su enriquecimiento en lípidos/péptido, realizamos cálculos de reflectividad en función de la presión de superficie a partir de las imágenes de BAM; para lo cual analizamos imágenes de los componentes puros y sus respectivas mezclas. Este análisis nos permitió diferenciar también dos patrones de reflectividad bien definidos (**Figura 2.18C**). Los valores altos de reflectividad corresponden a los péptidos puros mientras que los valores más bajos de reflectividad corresponden al lípido POPC puro (línea negra). Las reflectividades correspondientes a las fibras observadas en las imágenes de POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) mostraron valores de reflectividad cercanos a los péptidos puros (ver **Figura 2.18 C**) lo que es atribuible a una fase más enriquecida en amiloides. Es importante destacar que las mezclas lípidos péptidos fueron preparadas a las mismas proporciones donde los péptidos representaron

un bajo contenido en la mezcla comparado con el lípido. Para las mezclas POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) las correspondientes fracciones molares de péptido fueron 0.035 y 0.020 respectivamente.

Como se aprecia en la **Figura 2.18**, para las mezclas POPC/A β (40-1) y POPC/A β (42-1) las estructuras formadas en la interfase agua/aire mostraron un patrón de escasas estructuras fibrilares aisladas comparado con las estructuras en forma reticular detectadas en las mezclas POPC/A β (1-40) y POPC/A β (1-42). En el caso particular de la mezcla POPC/A β (42-1) las estructuras fibrilares aisladas mostraron una coexistencia con dominios redondeados en la interfase cuando se observaron por BAM (**Figura 2.18B, imagen 3***). Éstas formas de las fibras aisladas se correspondió a lo observado por FM usando la sonda ThT (**Figura 2.21 B, imagen 3**) así como por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) (**Figura 2.19 C**); de manera que en esta sección nos enfocaremos en el análisis de la mezcla POPC/A β (1-42) y POPC/A β (42-1) para mostrar racionalmente una relación “estructura-función” determinando la aparición de estructuras redondeadas (oligómeros) que coexisten con estructuras fibrilares aisladas dado por la reversión de la secuencia de los péptidos amiloides A β (1-40) y A β (1-42). Aunque el A β (40-1) ni el A β (42-1) no son péptidos fisiológicos, este hecho puede ayudar a entender la formación diferencial de dichas estructuras y su influencia en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer debido a que es ampliamente discutido la magnitud de la toxicidad de los oligómeros comparado con las estructuras fibrilares. Por lo que cabría preguntarse: *¿Cuál es la razón a nivel molecular de la existencia o coexistencia de estas estructuras (oligómeros y fibras)?*

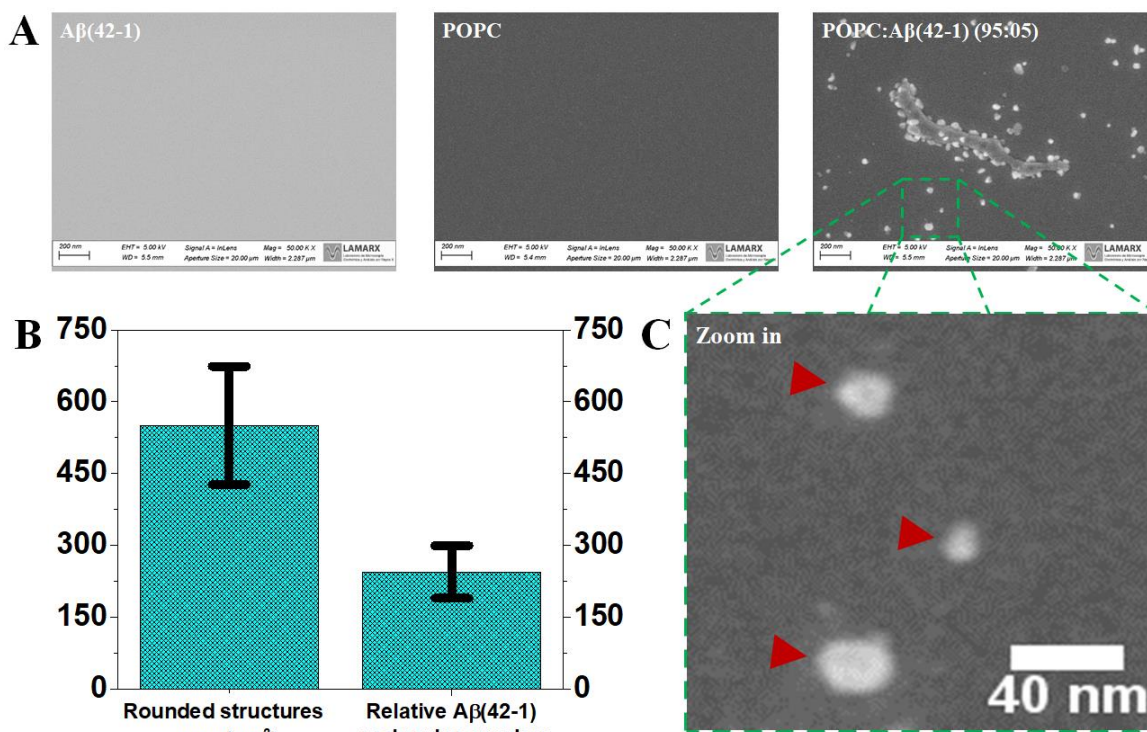


Figura 2.19: Coexistencia de estructuras observadas por SEM. Número estimado de moléculas de Aβ(42-1) en forma de oligómeros. A: Imagen de SEM de: péptido Aβ(42-1) puro y del lípido POPC puro (usados como controles negativos) de la mezcla POPC:Aβ(42-1) mostrando estructuras fibrilares aisladas asociadas a oligómeros. En todos los casos se transfirió a un soporte de mica para la observación. En la parte de abajo de cada imagen se muestran los parámetros usados durante el escaneo por SEM. **B:** Área estimada de los oligómeros (nm²) y número de moléculas de Aβ(42-1) calculadas a partir de las imágenes de SEM. Los valores calculados fueron: $A = \sim 550 \text{ nm}^2$, $\sim 245 \text{ moléculas/área}$. **C:** Ampliación de estructuras en forma de oligómeros señalados con flecha roja para la mezcla POPC:Aβ(42-1) mostrada en A.

Para responder esta pregunta es válido señalar que han emergido algunas ideas para explicar la existencia de las diferentes estructuras, las mismas están relacionadas con la conformación en α -hélice y hoja β y tiene en cuenta el sistema experimental usado. Por ejemplo, Jiang y colaboradores han sugerido que podrían aparecer intermediarios distinguibles dependiendo de la conformación incluso en la interfase agua/aire, los cuales podrían pasar desde monómeros desordenados (solución) \rightarrow α -hélice (adyacentes a la interfase) \rightarrow hoja β (interfase) [99], aunque se conoce que en solución el orden estructural es el siguiente: monómeros amorfos, agregados coloidales, oligómeros en hoja β ordenados y fibras [100]. En nuestro caso particular los dominios redondeados observados del péptido reverso Aβ(42-1) podrían corresponder a un arreglo de oligómeros en hoja β ordenados que desencadenan la formación de estructuras

fibrilares aisladas en la interfase debido a la coexistencia conformacional de hoja β y α -hélice en la monocapa mezcla de POPC/A β (42-1) con respecto a la mezcla POPC/A β (1-42) (**Figura 2.20A**).

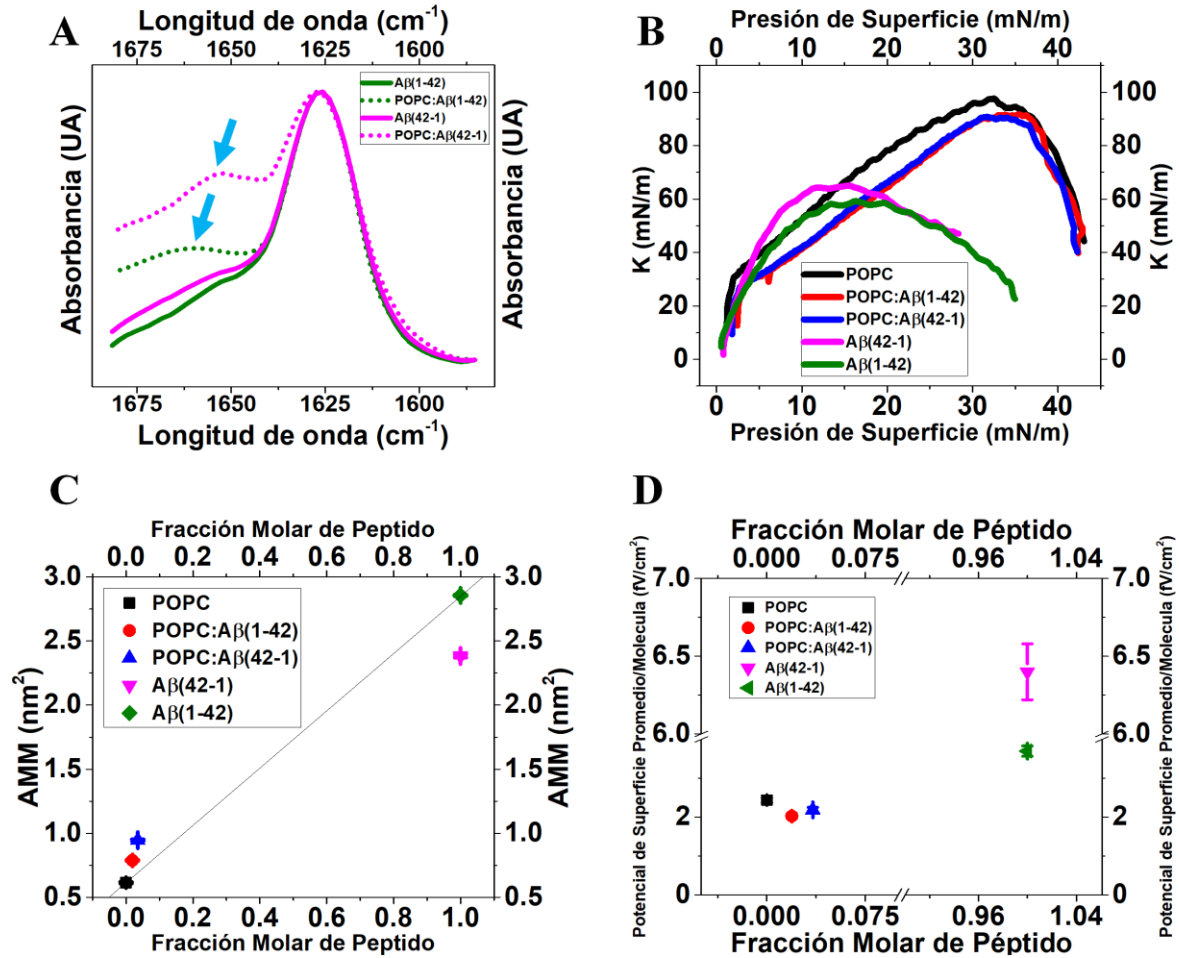


Figura 2.20: Cambios conformacionales en las mezclas POPC/A β (1-42) y POPC/A β (42-1), comportamiento de miscibilidad, diagramas de fases y análisis de potencial de superficie. A: espectros de ATR-FTIR muestran los cambios conformacionales inducidos en ambos péptidos al mezclarlos con el lípido POPC. **B:** Análisis del Módulo de Compresibilidad vs. Presión de Superficie muestra el comportamiento de dichos péptidos de secuencia reversa comparado con sus respectivas mezclas con el lípido POPC. **C:** Análisis de inmiscibilidad lateral MMA vs. Fracción molar de los péptidos tomados a ~ 20 mN/m . **D:** Análisis de Potencial de Superficie/MMA vs Fracción Molar de péptido muestra el comportamiento influenciado por la reversión de la secuencia de los péptidos. El péptido A β (1-42) puro tiene un valor de potencial de superficie distinto comparado con el péptido A β (42-1) en vista de la secuencia reversa, pero sin influir notoriamente en sus respectivas mezclas con el lípido POPC.

En la **Figura 2.19B** se muestra un estimado del numero promedio de moléculas por área de oligómeros. Este valor se encuentra entre *245 moléculas por 550 nm^2* . De acuerdo a nuestro

análisis proponemos que en estos arreglos estructurales (fibras aisladas y oligómeros) hay una conformación tanto de hoja β como de α -hélice.

El módulo de compresibilidad K presentó dos máximos con valores disimilares para el péptido $A\beta(1-42)$ puro con respecto al reverso $A\beta(42-1)$ puro, los que fueron de 59.15 mN/m y 64.24 mN/m respectivamente. Sin embargo, para las monocapas mezclas los valores apreciados fueron muy similares de 91.00 mN/m en el caso de la mezcla POPC/ $A\beta(1-42)$ mientras que para la mezcla POPC/ $A\beta(42-1)$ fue de 90.75 mN/m (**Figura 2.20B**). Esto es indicativo de que pese a la coexistencia de oligómeros con fibras en la mezcla POPC/ $A\beta(42-1)$ el cambio en el área molecular media (AMM) se mantiene independientemente de la conformación interfacial del péptido dado por la reversión de la secuencia del péptido (**ver Figura 2.18B y Figura 2.19**) esto puede estar explicando la coexistencia apreciada en las imágenes de BAM y SEM (**Figura 2.18B, imagen 3 y Figura 2.19A**). Para lograr un análisis más detallado realizamos diagramas de miscibilidad de las mezclas POPC/ $A\beta(42-1)$ y POPC/ $A\beta(1-42)$ a partir de las isothermas π -Área [91] (**Figura 2.20C**).

En base a lo anterior hemos considerado dos aspectos a nivel molecular que influyen en el comportamiento de superficie de las monocapas mezcla. 1) tanto $A\beta(1-42)$ como $A\beta(42-1)$ tienen el mismo número de aminoácidos, similar hidrofobicidad global y propiedades de superficie similares referente a área molecular y estabilidad; 2) la reversión de la secuencia tiene un impacto directo en la orientación de los residuos en vista a la diferencia en el potencial de superficie. La combinación de estos aspectos moleculares, sumado al mayor contenido en estructura α -hélice en presencia de POPC, está mostrando que la reversión de la secuencia puede ser responsable de desencadenar el cambio en la organización interfacial de las estructuras fibrilares en forma de Network observadas para la mezcla POPC/ $A\beta(1-42)$ a estructuras fibrilares aisladas en la mezcla POPC/ $A\beta(42-1)$ (**Figura 2.18 B, imagen 2 y 3**).

Por otra parte, consideramos importante evaluar la influencia de la reversión de la secuencia en el potencial de superficie; por lo que realizamos un análisis del AMM y del potencial de superficie promedio por molécula [85] en la mezcla, para tratar de lograr un entendimiento del arreglo diferencial entre las monocapas mezclas usando dos péptidos con similares propiedades de superficie e hidrofobicidad pero que difieren en la reversión de su secuencia. Este análisis muestra que para los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(42-1)$ puros los valores de potencial de superficie promedio/molécula son apreciablemente diferentes mientras que para las monocapas mezclas el comportamiento fue similar (**Figura 2.20D**).

Es válido preguntarse si, *¿Pese a la reversión de la secuencia, el péptido reverso A β (42-1) mantiene, en parte, las propiedades amiloides semejantes al péptido A β (1-42) en monocapas mezclas con POPC?* Para dar respuesta a la misma es importante conocer si las fibras con péptido reverso mantienen el marcaje con la sonda fluorescente ThT, requisito para considerar un agregado como amiloide [93]. Como se ha mencionado anteriormente adaptamos un método para la visualización por FM (Fluorescence Microscopy, *siglas en ingles*) de fibras amiloides formadas en la interfase agua/aire (**ver sección 2.1.2**) [28, 141]. Usando un diseño experimental similar las estructuras fibrilares aisladas y los oligómeros observados por tanto por BAM como por SEM fueron transferidas a un soporte de mica desde la mezcla POPC/A β (42-1) mostrando un comportamiento ThT positivo (**Figura 2.21B**). Además, las imágenes obtenidas desde la monocapa transferida al soporte de mica mantuvieron un patrón de fluorescencia de ThT similar a las estructuras (fibras aisladas y oligómeros) observadas en la interfase agua/aire mediante BAM. Esto es una importante conclusión que nos habla sobre la excelente estabilidad de estas estructuras amiloides incluso sometidas a manipulación técnica.

Como controles negativos fueron usados tanto el péptido A β (42-1) puro como el lípido POPC puro. Esto es importante para obtener una cuantificación de intensidad de fluorescencia lo más precisa posible al compararlos con los valores de intensidad de fluorescencia de las imágenes obtenidas de la mezcla POPC/A β (42-1). Como control positivo se utilizaron fibras de α -sinucleína previamente formadas en solución y depositadas en un soporte de mica y seguida de una incubación con ThT (**Figura 2.21A**).

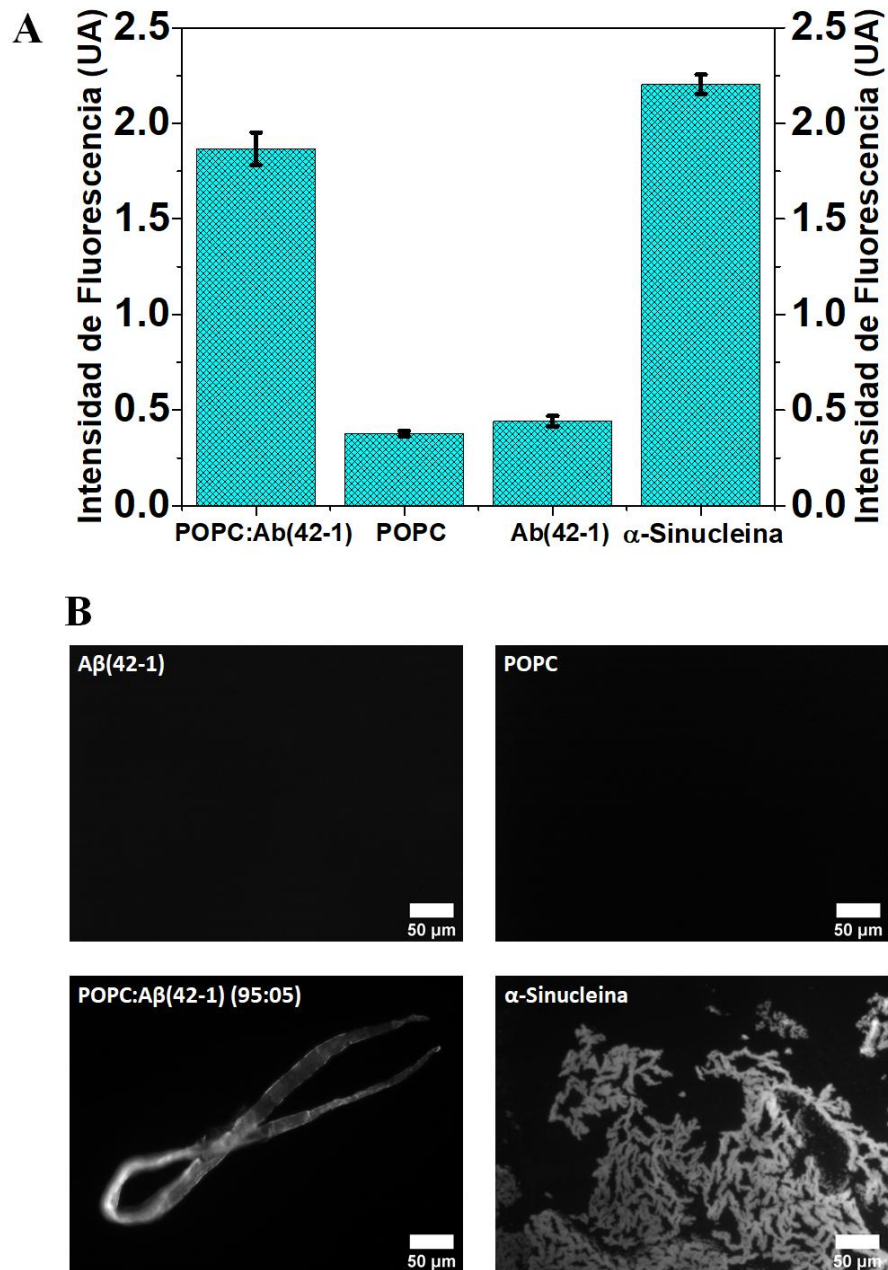


Figura 2.21: Análisis por microscopía de fluorescencia y comportamiento ThT positivo de las fibras aisladas en mezclas de amiloide reverso $A\beta(42-1)$ con POPC. A: Análisis de intensidad de fluorescencia de monocapas transferidas a un soporte de mica después de incubación con ThT a temperatura ambiente. Los valores promedios de intensidad de fluorescencia corresponden a las imágenes sin procesar. **B:** Las imágenes de Fluorescencia de la mezcla POPC/ $A\beta(42-1)$ y los controles negativos, lípido POPC puro y péptido $A\beta(42-1)$ puro fueron obtenidos después de transferidos a un Soporte de Mica mientras que la α -sinucleína que usada como control positivo se preparó previamente en solución y luego depositada en soporte de mica. Todas las mezclas se incubaron con ThT. La barra blanca en la esquina inferior derecha representa la escala de 50 μm .

2.1.5.2 Importancia de la reversión de la secuencia en la formación de fibras amiloides

Recientemente, se ha resaltado la influencia de la membrana plasmática tanto como promotora de la agregación del amiloide como de la formación de co-agregados de lípidos y amiloides [95]. Este fenómeno ocurre porque la región interfacial de membrana crea un ambiente natural donde los péptidos A β amiloides son procesados deficientemente seguido de su acumulación, lo cual depende de la composición de la membrana y al mismo tiempo puede actuar como inhibidor o catalizador del proceso de agregación de amiloides [3, 124]. En este sentido, se ha reportado que el lípido POPC (estado líquido-expandido) es uno de los principales fosfolípido constituyente de las membranas neuronales y está claramente involucrado en la función de la misma [11]. Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado recientemente ha sido reportado la influencia del estado físico de los lípidos (líquido expandido) de membrana para inducir estructuras A β amiloides en interfase agua/aire utilizando modelos de membranas (monocapas de Langmuir) [28]. En trabajos previos del grupo se han reportado la influencia de la reversión de la secuencia de péptidos en diferentes fenómenos tales como las propiedades de la superficie, interacción lípido-péptido [142] así como en los procesos de conductividad lateral en la interfase agua/aire [143]. En la presente sección, se ha mostrado resultados experimentales sobre propiedades de superficie de los péptidos A β (1-40), A β (1-42) y sus respectivos péptidos análogos de secuencia reversas A β (40-1) y A β (42-1) en estado puro y en mezcla con el lípido POPC. Los resultados sugieren que no solo la orientación de los aminoácidos a lo largo de la secuencia del péptido o la relación de aminoácidos hidrofóbicos/hidrofílicos sino también la relación estructura beta/ α -hélice son determinantes para desencadenar un cambio cooperativo significativo en la interfase agua/aire que promueve la formación de “fibras en Network” o “estructuras fibrilares aisladas” por el solo hecho de revertir la secuencia peptídica.

Por otra parte, en las monocapas mezclas los valores del módulo de compresibilidad K son similares lo cual nos estaría diciendo que los arreglos estructurales mostrados por los péptidos A β debido a la presencia de POPC en la mezcla es un “*proceso estructural selectivo*” determinado por los cambios conformacionales (diferencias en el contenido de α -hélices y hoja- β) como consecuencia de la reversión de la secuencia peptídica (**Figura 2.20A y 2.20B**). Como se muestra en la **Figura 2.21** la formación de estructuras amiloides en las monocapas mezclas son claramente ThT positivas. Esto significa que, cuando se forman las fibras, el micro-

ambiente hidrofóbico permanece similarmente expuesto para la inserción del ThT incluso cuando en las monocapas mezcla se utiliza el amiloide con secuencia reversa.

A pesar de propiedades interfaciales similares de ambos péptidos amiloides reversos y de tener similar hidrofobicidad global, la formación de fibras inducidas por POPC es selectiva. En un caso se ven claramente fibras con Network para las secuencias naturales (POPC:A β (1-40)) y en la otro se ven fibras ThT positivas aisladas sin Network (POPC:A β (1-40)) y con gran tendencia a la oligomerización. Pero, nuevamente el entorno lipídico brindado por POPC es clave para la fibrilación en ambos casos, indicando que determinados ambientes de membrana pueden obrar de facilitadores de la fibrilación amiloide.

2.1.5.2 Propiedades de superficie de los péptidos amiloides truncados A β (1-37), A β (1-38) y A β (1-39)

Como hemos venido describiendo en este trabajo de tesis los péptidos A β amiloides de 40 y 42 aminoácidos cuyas propiedades de superficie son muy similares presentan un patrón de agregación parecido en sus mezclas con lípidos en estado líquido-expandido como POPC y DMPC (ver **Figura 2.1A y 2.6**). A partir de estos dos péptidos se obtienen variantes truncadas de 37, 38 y 39 aminoácidos a los cuales han sido encontrados en el LCR [45, 46] así como en el plasma humano de pacientes con AD [47]. Probablemente debido a su menor abundancia en estos fluidos comparado con los amiloides A β (1-40) y A β (1-42) se les ha prestado menor atención desde el punto de vista de la etiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es conocido que la liberación de los tripéptidos GVV (Gly-Val-Val) y VIA (Val-Iso-Ala) generan el A β (1-37) a partir del A β (1-40) y el A β (1-39) a partir del A β (1-42) respectivamente. Aunque el A β (1-37) también puede ser generado a partir del A β (1-42) liberando el penta-péptido GVVIA (Gly-Val-Val-Iso-Ala) [144]. En la presente sección mostramos las propiedades de superficie de estos tres péptidos truncados puros (A β (1-37/38/39)) y de sus mezclas con POPC (**Figura 2.22**).

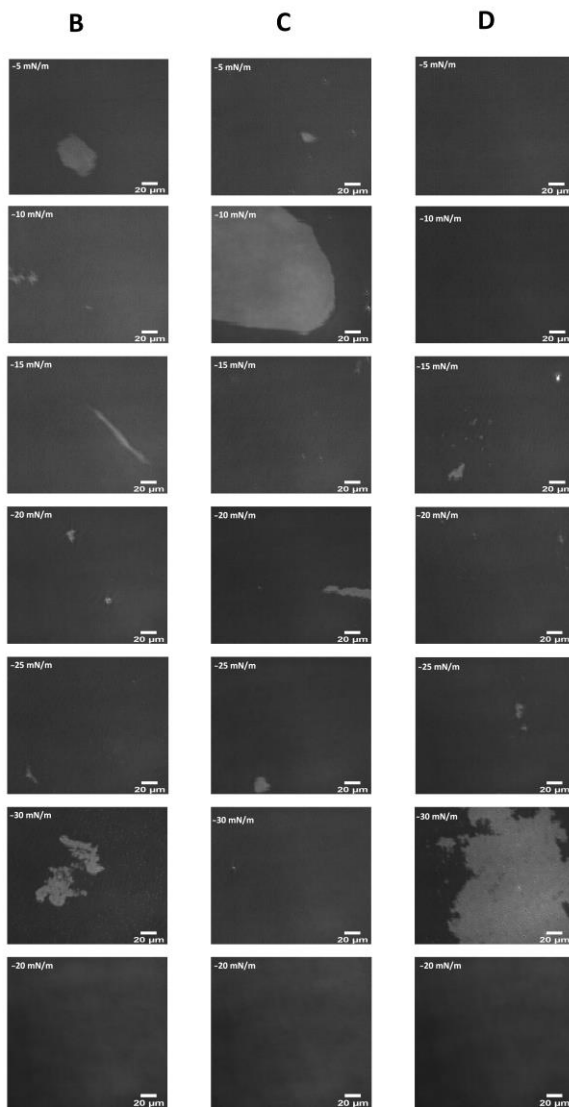
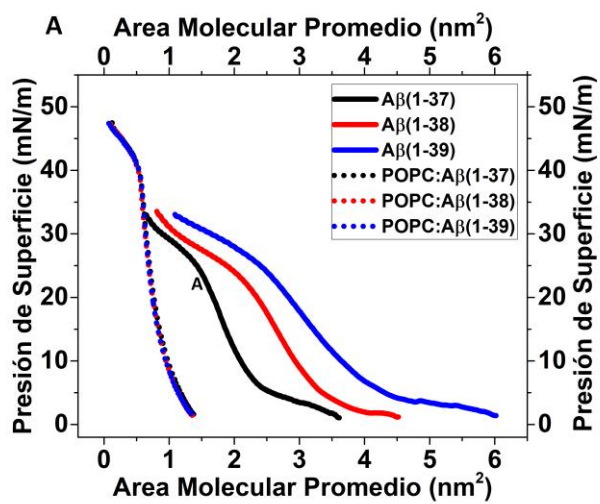


Figura 2.22: Comportamiento superficial de los péptidos truncados A β (1-37/38/39) y sus mezclas con POPC. A: Isotermas Π - área de los péptidos puros y sus respectivas mezclas con el lípido POPC. La ausencia gradual de un aminoácido determina cambios conformacionales en los péptidos puros que se reflejan en los cambios de AMM. Sin embargo, en las mezclas con POPC estas áreas no cambian apreciablemente. Imágenes de BAM a valores de presiones superficiales desde 5 mN/m a 30 mN/m para las monocapas mezclas con POPC A β (1-37) (**B**), A β (1-38) (**C**), A β (1-39) (**D**). Se aprecia claramente la presencia de agregados amorfos denotando que la fibrilación en estos péptidos truncados no es inducida por un ambiente lipídico de membrana.

De acuerdo a lo observado por BAM, las monocapas de estos péptidos truncados puros mostraron total homogeneidad, mientras que en mezclas con POPC a PAP entre 5-10% se apreciaron claramente dominios amorfos sin la formación de estructuras fibrilares como las visualizadas en las mezclas POPC:A β (1-40) y POPC:A β (1-42) (**Figura 2.22B, C y D**). Estos resultados denotan la importancia que tiene el C-terminal para el proceso de agregación incluso en la toxicidad de los A β amiloides [145, 146]. Si bien nuestro sistema experimental es un microambiente mimético de membrana, donde la proporción lípido/péptido toma relevancia en la inducción de fibras amiloides; en un entorno fisiológico es válido considerar la composición lipídica de las membranas, así como la presencia de otros péptidos amiloides como los A β (1-40) y A β (1-42). Recientemente, estudios de fluorescencia usando ThT, AFM, dicroísmo circular y resonancia plasmónica de superficie de han mostrado una interacción diferencial del péptido A β (1-38) con los péptidos A β (1-40) y A β (1-42) induciendo la formación de agregados enriquecidos en hojas β fundamentalmente en el péptido A β (1-42) [48]. De manera que nuestros resultados indican que el proceso de inducción de fibras con propiedades amiloides en los péptidos amiloides truncados A β (1-37/38/39) no es un proceso que dependa absolutamente de la presencia de lípido, sino también puede ir acompañado de cierta proporción de péptidos A β (1-40/42) a una proporción que mimetice las proporciones de estos péptidos en un ambiente fisiológico.

2.2. Influencia del estado de fase de lípidos en la interacción del péptido Melittin y la formación de nanoestructuras en interfase agua/aire

2.2.1- Propiedades de superficie del péptido Melittin en monocapas mezclas con los lípidos DSPC y POPC. Isotermas π -área y análisis de imágenes de BAM

En la **sección 2.2** utilizando péptidos A β amiloides se logró demostrar la formación de estructuras fibrilares en la interfase agua/aire en mezclas inducida por el lípido POPC, dichas mezclas mostraron un comportamiento ThT positivo. Observamos además que este comportamiento ThT positivo prevalece incluso con cambios en la estructuración dado por la reversión de la secuencia de los péptidos amiloides. Teniendo en cuenta lo anterior cabría preguntarse: *¿Si la fibrilación y el comportamiento ThT positivo es exclusivo de péptidos A β amiloides y no puede ser propio de otros péptidos anfipáticos?* En el presente capítulo trataremos de dar respuesta a esa pregunta estudiando mezclas a diferentes proporciones en la interfase agua/aire del péptido anfipático Melittin (ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas) (**Figura 2.23A**). Para este caso hemos abordado este estudio con dos fosfolípidos que difieren en su estado físico interfacial; uno es el DSPC que tiene una isoterma característica de estado líquido condensado y el otro es POPC que tiene una isoterma con características de líquido expandido típica en subfase aire/CINa 145 mM (**Figura 2.23A y 2.23C**). Para las mezclas evaluadas se utilizaron las siguientes proporciones: 80:20, 50:50 y 20:80 en PAP, las cuales se calcularon como se indica en el **capítulo III** de materiales y métodos para ambas interfases lípido/péptido. Tanto el péptido Melittin puro como los lípidos POPC y DSPC forman una monocapa insoluble en la interfase agua/aire con una estabilidad lateral máxima de alrededor 15, 55 y 60 mN/m, respectivamente y un área molecular a máximo empaquetamiento de alrededor de 2; 0,65 y 0,40 nm².molécula⁻¹, respectivamente (**Figura 2.23A y 2.23B**) [90]. Las imágenes BAM de cada uno de los componentes puros son homogéneas sin dominios observables ni estructuras fibrilares (**Figura 2.23C, imágenes 1, 5, 6 y 10**).

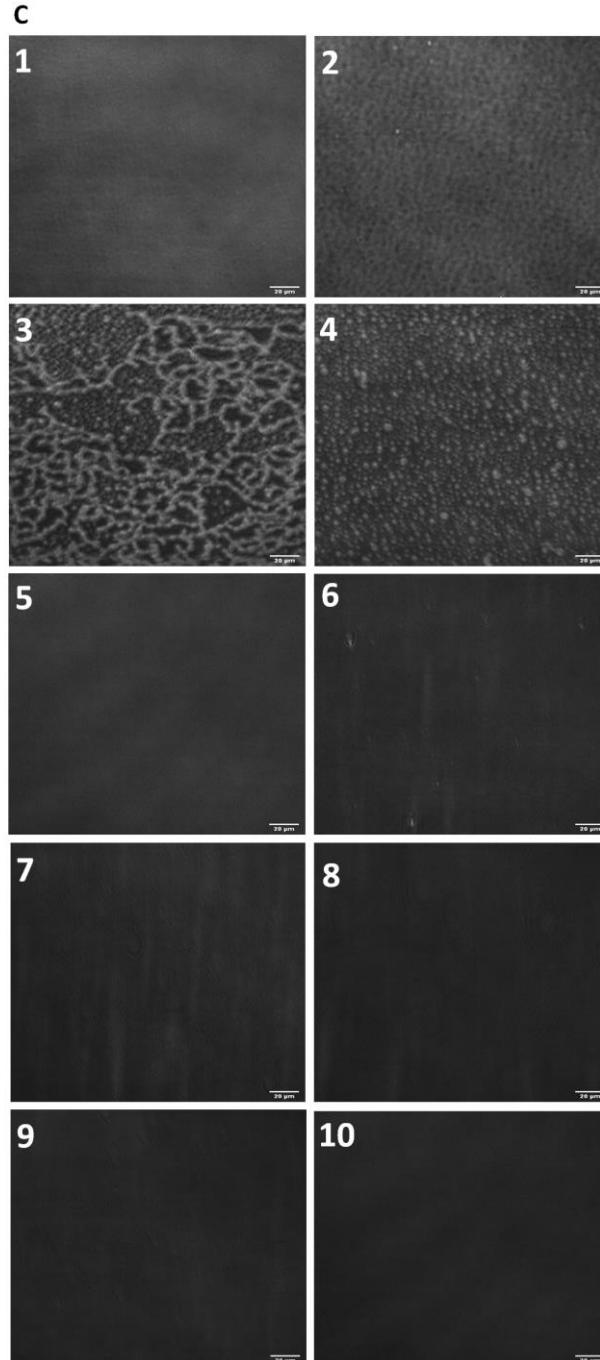
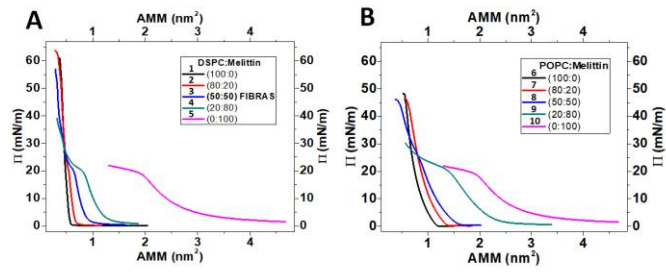


Figura 2.23: Comportamiento superficial del péptido de melitina en films mezcla con lípidos. A: Isotermas π -área para mezclas DSPC-Melitin y **B:** POPC-Melitina y sus respectivas imágenes de BAM **C:** obtenidas entre 15-20 mN/m en monocapas puras o en las mezclas a el PAP indicado que se muestra en el inserto. La fracción molar correspondiente a melittin para la mezcla de DSPC/Melittin fue de 0,05, 0,17, 0,45 respectivamente. La fracción molar correspondiente a melittin para la mezcla POPC/Melittin fue de 0,12, 0,38, 0,65 respectivamente. La mezcla de DSPC/Melittin a 50:50 de PAP mostró estructuras de dominios redondeados y fibrilares (imagen **C3**), mientras que a 20:80 de PAP mostró dominios redondeados que indican un comportamiento de inmiscibilidad particular en esta proporción (imagen **C9**). Por el contrario, las mezclas de POPC/Melittin en las mismas proporciones mostraron un comportamiento diferente sin formación apreciable de estructuras en la superficie. La barra sólida en las imágenes representa 20 μm .

En el **Capítulo I** nos referimos al concepto de PAP [28] que cobra gran significado en la técnica de monocapas de Langmuir, este concepto es importante ya que la proteína mezclada con los lípidos en la interfase agua/aire tiene una gran diferencia en sus áreas moleculares individuales [23, 147]. Cuando el péptido Melittin se mezcla con POPC (fosfolípido con estado líquido-expandido), no forma estructuras fibrilares lo que es independiente de la PAP, esto es compatible con una fase más líquida del fosfolípido según las imágenes BAM (**Figura 2.23C**). El comportamiento de la mezcla POPC/Melittin fue dual; ya que a una PAP por debajo del 50 %, la monocapa mezcla mostró una miscibilidad lateral completa, mientras que la mezcla se volvió inmisible a una PAP del 50% o superior, con una discontinuidad en el punto de colapso correspondiente al valor encontrado para el péptido Melittin puro, pero sin formar fibras, es decir que para POPC a una PAP mayor a 50% hay miscibilidad lateral sin fibrilar (**Figura 2.23C y Figura 2.24C**).

Como se puede apreciar en las **Figuras 2.23A y 2.23C** las isotermas mezclas se movieron hacia una mayor área molecular a medida que aumenta la fracción molar del péptido Melittin en la mezcla; porque el área molecular individual del péptido Melittin es de alrededor de 2 a ~ 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ siendo mayor que la de POPC pura ($0,94 \text{ nm}^2\cdot\text{molecula}^{-1}$) o la de DSPC ($0,52 \text{ nm}^2\cdot\text{molecula}^{-1}$) a la misma presión lateral. Sin embargo, con DSPC encontramos un comportamiento particular que fue completamente inesperado. A 50% de PAP en la monocapa mezcla de DSPC/Melittin, se detectó estructuras coexistentes de dominios redondeados y fibrilares (**Figura 18B, imagen 3**, correspondientes a una fracción molar de péptido de 0,17). Sorprendentemente, a esta proporción específica, las estructuras fibrilares observadas fueron ThT positivas (**Figura 2.27**) con un cambio en las longitudes de onda de emisión de

fluorescencia (ver más abajo en la *Sección 2.3*). Si la proporción de Melittin aumenta o disminuye, las estructuras fibrilares anteriores tienden a desaparecer, pero los dominios redondeados persisten en la proporción 20:80 (**Figura 2.23C, imagen 4**).

Para una mejor comprensión del comportamiento de las mezclas se realizaron diagramas de fase a partir de un análisis de las isothermas de los componentes puros y de las mezclas, similar a lo realizado en la **Sección 2.1** para A β -amiloide [28]. Las interfases mezclas de POPC/Melittin mostraron un comportamiento de miscibilidad cuando la proporción de Melittin está por debajo del 50 % de PAP manteniendo una ligera disminución en el AMM (**Figura 2.24C y 2.24D**). Sin embargo, se observó una inmiscibilidad lateral típica para POPC/Melittin con un primer punto de colapso (primer punto de discontinuidad en la isoterma π -área) que parecía ser independiente del contenido de Melittin a PAP > 50 % lo que es compatible con una fase enriquecida en proteína conservando el AMM [148], sin observar dominios ni fibras por BAM (ver **Figura 2.23C y 2.24D**).

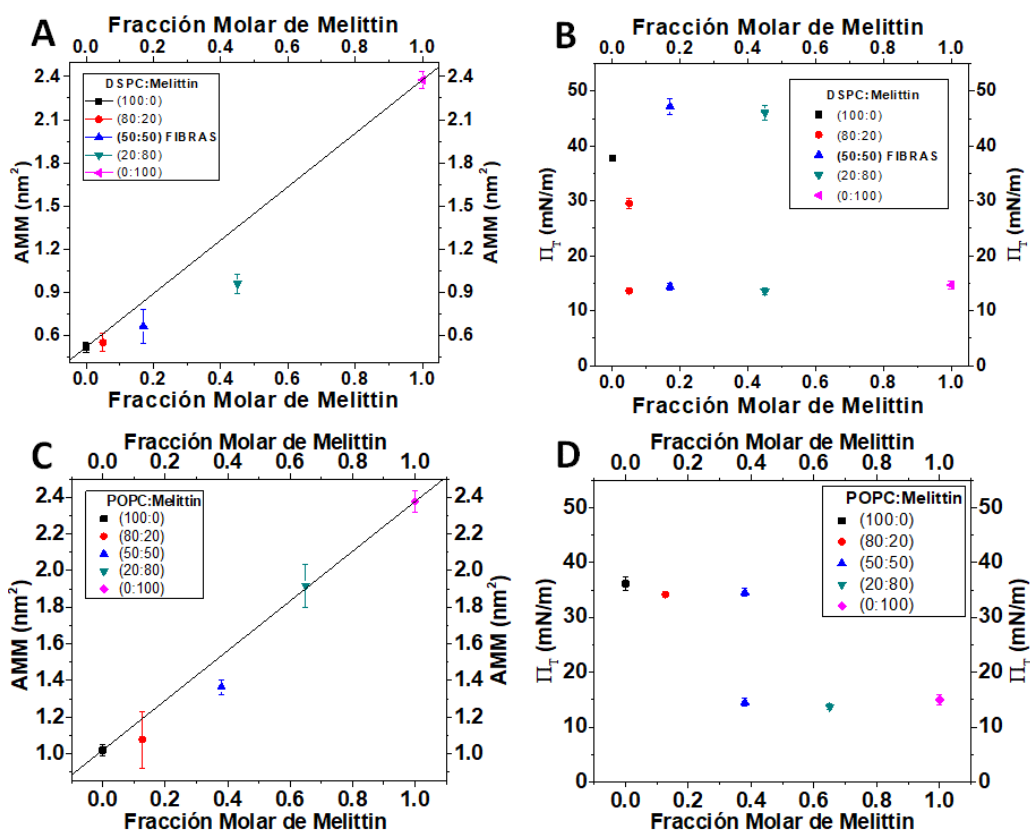


Figura 2.24: Diagrama de fase de las mezclas de melittin con fosfolípidos DSPC y POPC. A: Diagrama de miscibilidad, área molecular media vs. fracción molar para mezclas de DSPC/Melittin. **B:** Diagrama de fase para mezclas de DSPC/Melittin que muestra inmiscibilidad lateral, primero y segundo punto de colapso (cuando corresponde) en las isotermas π -área. **C:** Diagrama de miscibilidad, área molecular media vs. fracción molar para mezclas de POPC/Melittin. **D:** Diagrama de fase para mezclas de POPC/Melittin, primer y segundo punto de colapso (cuando corresponde) en las isotermas π -área. Presión de transición significa el primer punto de discontinuidad calculado por la segunda derivada de la isoterma π -área con respecto al área (consulte la **sección 4** de Material Suplementario).

Sin embargo, la mezcla DSPC/Melittin mostró un comportamiento de miscibilidad más complejo. Por ejemplo, en la mezcla al 50% de PAP (0,17 fracción molar de péptido), el análisis de miscibilidad sugiere que el lípido DSPC y el péptido Melittin son aparentemente miscibles con interacciones atractivas (con una menor MMA, ver **Figura 2.24A**). En esta proporción, el primer punto de colapso mostró valores diferentes en comparación con DSPC puro (**Figura 2.24B**) y la coexistencia tanto de estructuras de dominios redondeados como de fibrilares. Dichas estructuras fueron claramente observadas por BAM, así como por AFM y SEM (**Figura 2.23C imagen 3 y 2.28B**).

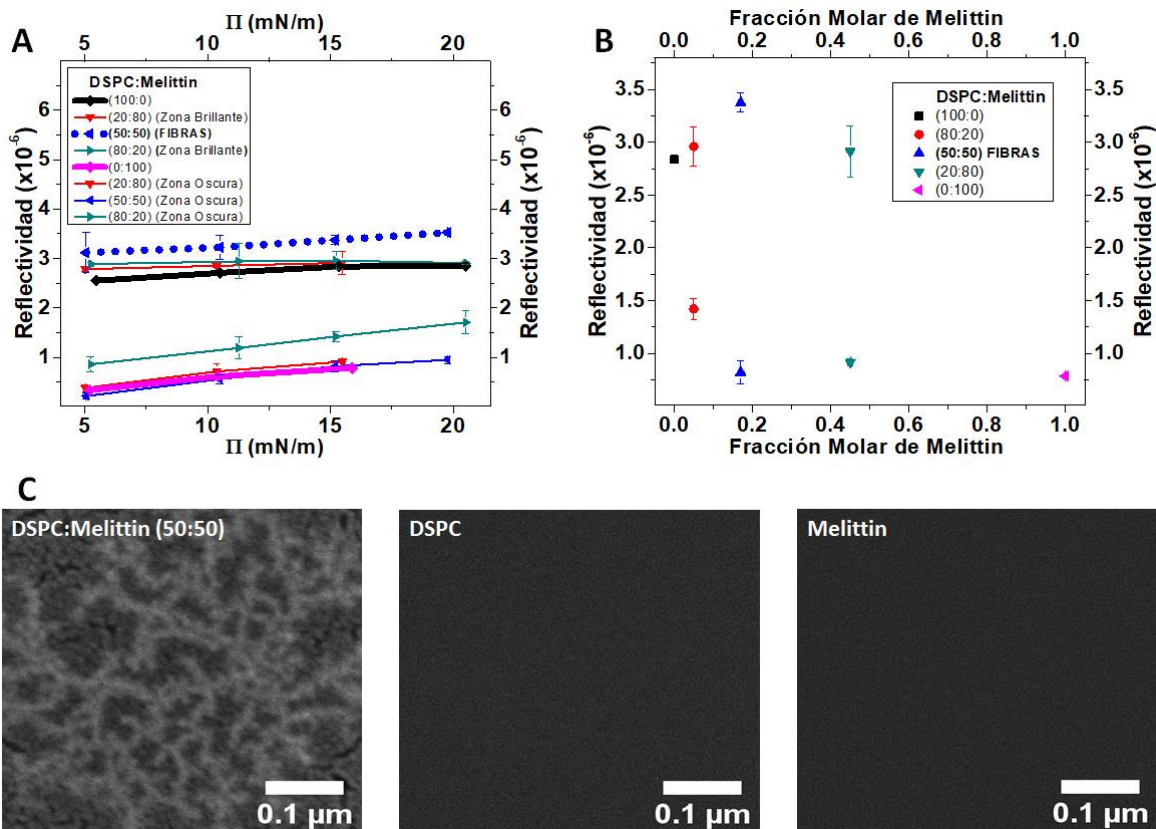


Figura 2.25: Análisis de reflectividad BAM e imágenes de SEM de monocapas mezclas de DSPC/Melittin. **A:** Los valores de reflectividad muestran las dos regiones calculables en la reflectividad de imágenes de BAM en las mezclas DSPC/Melittin. Los valores de baja reflectividad fueron similares al péptido de melittin puro; los valores de reflectividad alto fueron similares a los del lípido de DSPC puro, incluidas estructuras fibrilares. **B:** Valores de reflectividad de DSPC puro, Melittin pura a diferentes proporciones de DSPC/Melittin tomadas a ~ 20 mN/m. **C:** imágenes de SEM de DSPC/Melittin al 50 % de PAP, la monocapa fue comprimida hasta 20-25 mN/m y luego transferida a soporte de mica para su observación.

Siguiendo metodologías anteriormente usadas estas estructuras también fueron evidenciadas por FM (FM, siglas en inglés) utilizando la sonda ThT (**Figura 2.27**). Como mencionamos anteriormente, el análisis de fluorescencia mostró un cambio en la longitud de onda de emisión, pero el patrón de imagen fue similar a las observadas por BAM donde claramente se distinguen las estructuras fibrilares (**Figura 2.23C imagen 3 y 2.27C**). Por otro lado, a medida que aumenta la fracción molar del péptido Melittin (PAP del 80 %) observamos MMA más bajas que las ideales, lo que indica interacciones atractivas, pero sin la formación de estructuras fibrilares como las observadas al 50 % de PAP. Teniendo en cuenta lo anteriormente explicado podemos afirmar que la formación de una estructura compleja en la interfase depende de la proporción de péptido y del estado de fase del lípido (**Figura 2.24**).

Ciertamente, y como se ha explicado en la **sección 2.1** un análisis más complejo de las imágenes BAM puede brindar información más exhaustiva sobre las estructuras formadas en la interfase. Para ello hemos determinado la variación de la reflectividad durante la compresión de la monocapa para todas las PAP evaluadas en la mezcla DSPC/Melittin. Este análisis nos permite discriminar el patrón mostrado en las imágenes de BAM en dos valores de reflectividad bien definidos. De manera que se estableció lo siguiente; los valores altos de reflectividad corresponden al lípido DSPC puro, mientras que los valores bajos corresponden al péptido Melittin puro (ver **Figura 2.20A**). Sin embargo, los valores definidos como zona clara en la mezcla DSPC/Melittin (50%) son similares a los medidos para el lípido DSPC puro, mientras que los definidos como zona oscura en la mezcla DSPC/Melittin (50%) son similares a los que se encuentran en el péptido Melittin puro (**Figura 2.25A**). A priori, podríamos deducir que las zonas brillantes (que incluyen a fibras y dominios redondeados) son atribuibles a reordenamientos de la fase lipídica. Sin embargo, si analizamos los experimentos de FM (ThT positivo) y ATR-FTIR (ver **Sección 2.2.2**), es válido afirmar que las fibras son el producto de la reorganización de lípidos y péptidos en una fase bastante diferente de la disposición plana en monocapa pudiendo alcanzar un arreglo molecular muy complejo dado por interacciones específicas entre DSPC y Melittin (**Sección 2.2.5**).

En este sentido y sin entrar a describir como es este arreglo molecular podría surgir la siguiente pregunta *¿El cambio cooperativo estructural (fibras) observado a 50% de PAP tiene lugar con modificación en la conformación de los componentes?* Hasta donde hemos apreciado en todas las mezclas DSPC/Melittin, el análisis mostró separación lateral de fases, los límites de los valores de reflectividad altos y bajos corresponden a monocapas de DSPC puro y péptido de Melittin puro, respectivamente (**Figura 2.25A**). Sin embargo, para contestar la pregunta anterior fue necesario realizar experimentos de ATR-FTIR, los que mostraron que es evidente cierta interacción lípido-péptido como causa de la inducción del cambio de fase en organización fibrilar (ver **Sección 2.2.2**). Los datos obtenidos en las imágenes de BAM se corroboraron también mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés). Según la topografía de las imágenes SEM de DSPC/Melittin (50%) se aprecian estructuras fibrilares distinguibles que se mantuvieron estables luego de ser transferidas al soporte de mica y ser sometidas al típico tratamiento de metalización de la muestra. Tanto para el lípido DSPC como para el péptido Melittin puros, las imágenes observadas fueron homogéneas. Las mismas fueron

usadas como controles negativos a la formación de estructuras fibrilares y dominios observables en sus mezclas (**Figura 2.25C**).

2.2.2 Análisis espectroscópico por ATR-FTIR de las monocapas de DSPC/Melittin que contienen fibras nano-estructuradas

Hemos realizado un análisis ATR-FTIR de la mezcla de DSPC/Melittin a las diferentes proporciones para obtener más información si las estructuras fibrilares que se observaron por BAM y SEM están acompañadas de cambios en las señales espectroscópicas infrarrojas típicas de componentes lipídicos y protéicos puros respecto a sus mezclas de manera que se pueda obtener evidencias de cambios conformacionales que acompañan a la organización fibrilar.

Está bien establecido que la estructura de α -hélice es distinguible por vibraciones de la amida I en el rango de los $1645\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ [149]. En nuestros experimentos, las monocapas transferidas de Melittin puro transferidas mostraron una estructura predominante en α -hélice centrada en los 1650 cm^{-1} con un pequeño hombro en 1625 cm^{-1} que corresponde a la estructura de hoja β . Este perfil cambió notablemente en la mezcla DSPC/Melittin (80/20) (**Figura 2.25**). Sin embargo, tanto en DSPC/Melittin (50/50) como en DSPC/Melittin (20/80) las estructuras secundarias son claramente detectables con un aumento en el componente de hoja β (**Figura 2.25A**).

Por otra parte, también se utilizó ATR-FTIR para determinar el comportamiento del lípido ante la presencia del péptido Melittin en las interfases mezclas. Como suele ocurrir en una fase líquido cristalina de fosfolípidos equivalente a líquida-expandida en monocapas [150, 151], se detectaron las bandas vibracionales simétricas y antisimétricas de los grupos CH_2 a 2922 cm^{-1} y 2853 cm^{-1} correspondientes a lípidos puros, así como en todas las mezclas de DSPC/Melittin estudiadas.

Pero en el caso específico de la mezcla DSPC/Melittin (50% de PAP) donde se aprecian estructuras fibrilares, además de las bandas vibracionales típicas de lípidos, aparecieron dos picos bien diferenciados centrados en 2960 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} cuando se comparan con lípidos puros o incluso con las otras proporciones de las mezclas DSPC/Melittin (**Figura 2.25B**). Esta observación está indicando, además un cambio de conformación de las cadenas hidrofóbicas de DSPC inducido por la formación fibrilar anteriormente mencionada.

De manera general, a 50% de PAP aparecieron cambios conformacionales asociados a ambos componentes en mezcla lo que evidentemente muestra que la formación tanto de estructuras

fibrilares y dominios redondeados tiene una ocurrencia a nivel molecular que se manifiesta específicamente al 50% de PAP o una PAP ligeramente superior como explicaremos en la *Sección 2.2.5*.

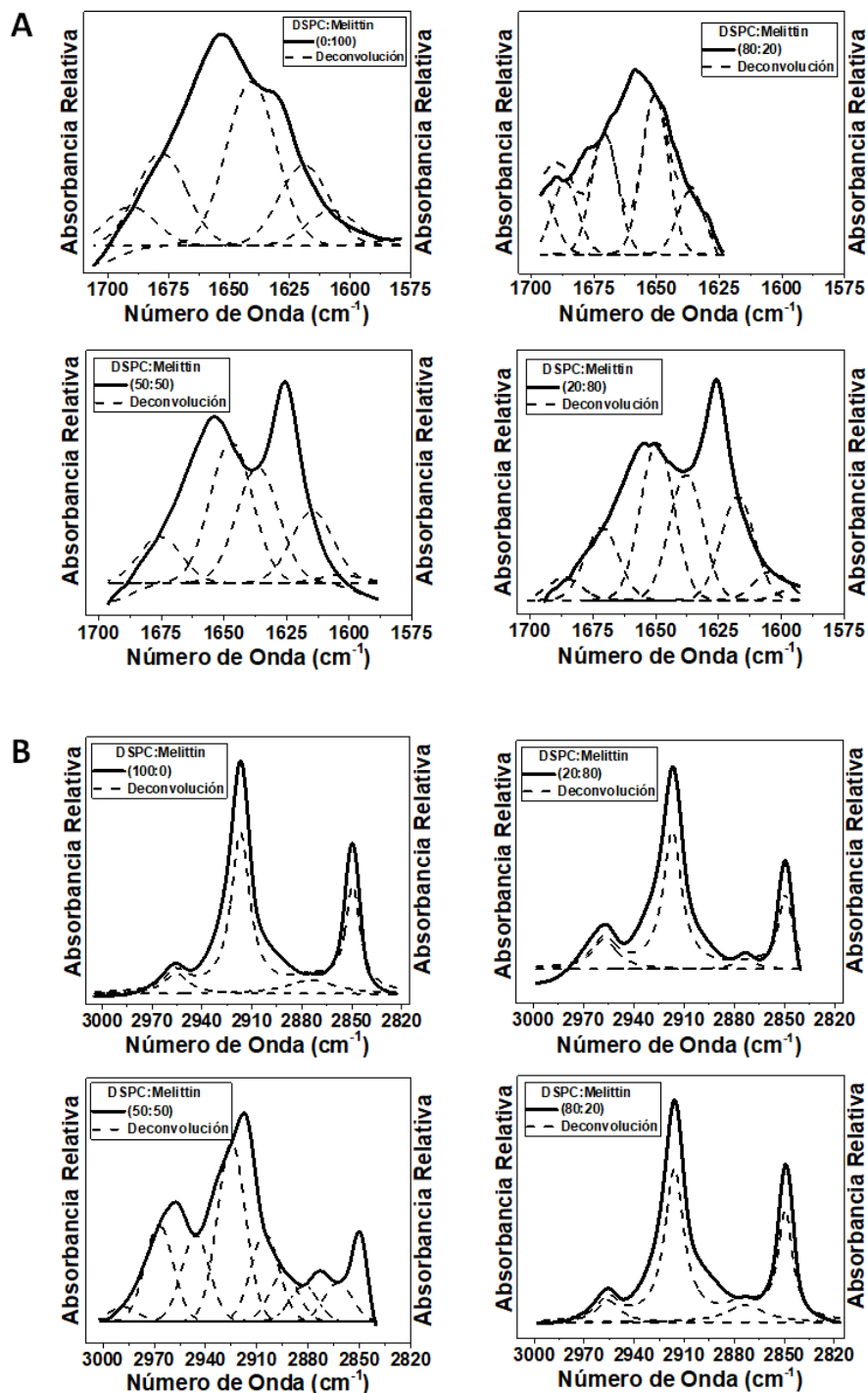


Figura 21: Espectros ATR-FTIR del péptido melittin en mezcla con DSPC. A: región amida I de: melittin pura (parte superior izquierda), DSPC/Melittin (parte superior derecha) (80:20); inferior izquierda DSPC/Melittin (50:50), inferior derecha DSPC/Melittin (20:80). **B:** señales de vibración -

CH2- de bandas simétricas de lípidos ($\sim 2853\text{ cm}^{-1}$) y antisimétricas ($\sim 2922\text{ cm}^{-1}$): DSPC puro (parte superior izquierda), DSPC/Melittin (parte superior derecha) (20:80); la parte inferior izquierda corresponde a (50:50) estructuras similares a fibrillas (observe las dos señales cambiadas a $\sim 2960\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$), la parte inferior derecha corresponde a DSPC/Melittin (80:20).

2.2.3- Estudio de fluorescencia en presencia de ThT de estructuras fibrilares en la mezcla DSPC/Melittin al 50%

Como mostramos en la **Sección 2.2.2** es evidente que la estructuración fibrilar al 50% de PAP en mezclas DSPC/Melittin está acompañada de cambios conformacionales en ambos componentes de la mezcla. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente dicho, en esta sección pretendemos responder la siguiente pregunta *¿Esta organización fibrilar de DSPC con Melittin puede ser evidenciada con la sonda fluorescente ThT en forma similar a las mezclas POPC/A β amiloide?* Como hemos mencionado anteriormente la sonda ThT es ampliamente usada para marcar fibras amiloides [93, 94]. Una característica distintiva de esta sonda es que tiene una alta solubilidad en agua, pero no es fluorescente. Además, tiene una afinidad media (en el rango de μM) por entornos hidrofóbicos que se encuentran en los arreglos amiloide. Esta propiedad hace que ThT sea una sonda sensible para muchos sistemas experimentales [116], incluidas las fibras de amiloides formadas artificialmente o a partir de fuentes biológicas [152, 153]. Este comportamiento del ThT se debe a que las fibras amiloide comparten una estructura molecular común (arquitectura β cruzada) de modo que esta sonda particiona en estos sitios y modifica sus propiedades de fluorescencia [93]. Para realizar estas observaciones utilizamos FM que es una herramienta muy poderosa que nos permitió observar estructuras fibrilares y dominios redondeados marcados con la sonda ThT (**Figura 2.27**). Empleando un método adaptado que hemos descrito con anterioridad en el **Capítulo 2** el cual está basado en la transferencia de films a un soporte de mica [28, 141] (ver Materiales Suplementarios para más detalles) seguido de una incubación previa con ThT.

Sorprendentemente, las monocapas transferidas de la mezcla DSPC/Melittin (50%) mostraron un patrón de fluorescencia complejo y distintivo en comparación con el de la α -sinucleína que fue usada como control positivo, (**ver Figura 2.27**). El análisis se realizó en una matriz de intensidad 2D donde la monocapa transferida, mostró una emisión de fluorescencia centrada en los 522 nm (rango de excitación usado fue de 400-415nm) con dos picos adicionales centrados en 466 nm y 478 nm, respectivamente. Por otro lado, las fibras de α -sinucleína transferidas sobre un soporte de mica exhibieron un máximo de emisión típico centrado en 480 nm (ver

Figura 2.27A). Este patrón de fluorescencia diferencial también se observó mediante microscopía de fluorescencia confocal espectral utilizando una longitud de onda de excitación de 405nm (**Figura 2.27B**) como se puede apreciar los patrones de fluorescencia de las estructuras fibrilares son similares a los observados en BAM (**Figura 2.27C, Figura 2.23**). Por el contrario, las monocapas transferidas de componentes puros, ya sea el péptido melittin o el lípido DSPC, fueron ThT negativas en las mismas condiciones experimentales que las mezclas analizadas.

Según estos resultados podemos afirmar que la sonda fluorescente ThT interactúa con arreglos estructurales que tienen propiedades hidrofóbicas comunes con las que se forman en las mezclas con POPC/ β amiloide favoreciendo la emisión de fluorescencia de ThT.

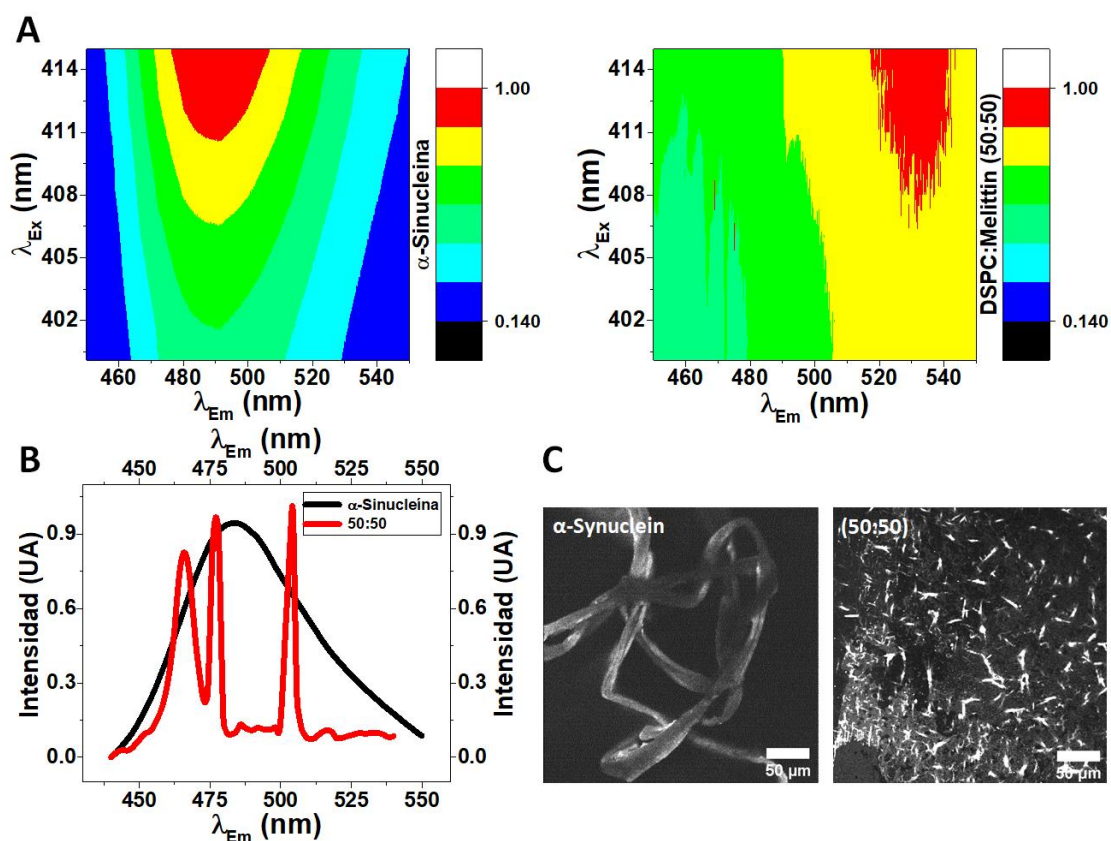


Figura 2.27: Patrón complejo en la fluorescencia de ThT de estructuras fibrilares de monocapas mixtas de DSPC/Melittin en la interfase aire-agua. A: valores de intensidad de fluorescencia 2D; α -sinucleína del lado izquierdo (control positivo); lado derecho, DSPC/Melittin (50:50). **B:** espectro de fluorescencia en microscopía confocal de α -sinucleína ($\lambda_{em} \sim 482$ nm, negro) y para DSPC/Melittin (50:50) con un perfil más complejo con picos de emisión centrados en ~ 466 nm, ~ 478 nm y ~ 505 nm, respectivamente (en rojo). El λ_{ex} fue de 405 nm en ambos casos. El análisis espectral corresponde a las imágenes mostradas en **C**. Todas las monocapas fueron comprimidas hasta 20 mN/m y luego transferidas a soporte de mica seguido de incubación ThT (ver Materiales y Métodos para más detalles).

2.2.4- Significancia

Como hemos mencionado con anterioridad el péptido Melittin ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas. A pesar de que no se ha reportado afinidad por ninguna proteína de membrana, su afinidad es hacia lípidos y también se ha considerado como una toxina. Aunque su mecanismo de acción en las membranas celulares no es bien conocido, la hipótesis más aceptada propone una interacción particular de los lípidos con el péptido Melittin. Sin embargo, esta expresión general de “interacción con lípidos” contiene un amplio significado y abarca un abanico amplio de posibilidades. Porque puede incluir, entre otros, factores estructurales, el estado físico del lípido combinado con la disposición de los lípidos en la membrana, así como cuán diferente es el comportamiento anfipático del péptido en la interfase aire/agua que conduce a una combinación de varios mecanismos propuestos para el daño celular, como poros tipo toroidal o barril-beta [154, 155]. La importancia del estado físico del fosfolípido para formar transiciones de estructura bidimensional en el entorno interfacial se ha estudiado para los péptidos A β amiloides [28, 141] que como mencionamos anteriormente podrían estar compartiendo arreglos estructurales hidrofóbicos comunes con el péptido Melittin en mezcla con determinados lípidos como es el caso del DSPC; estructura que favorece la interacción con la sonda fluorescente ThT y dando su característico perfil de emisión.

En esta sesión mostramos estudios de la interacción del péptido catiónico y anfipático Melittin con dos lípidos. El primero es POPC que tiene un estado líquido-expandido en interfases aire/agua [103] con una temperatura de transición bulk de $-3.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ [29]. El segundo es DSPC, un lípido con un estado líquido-condensado en interfases aire/agua con una temperatura de transición bulk de $54,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ [102].

Actualmente, no hay detalles a nivel molecular sobre el mecanismo de acción de Melittin en la formación de poros. Sin embargo, según estudios de Dinámica Molecular, el estado físico del lípido afecta el comportamiento del péptido en la membrana. En este sentido, un estudio que incluyó lípidos de diferentes estados, como DHPC, DLPC, DPPC y DSPC, mostró una mayor fortaleza de unión para con el lípido DSPC con el péptido Melittin [81] debido a la interacción de los grupos químicos de la región polar lipídica con los residuos polares del péptido [156]. De manera que el lípido DSPC podría interactuar con capacidad de romper los dominios simétricos y generar asimetría debido a eventos de flip-flop [156, 157]. Debido a la capacidad de DSPC de interactuar con el péptido Melittin puede inducir una nueva disposición lipídica en

la interfase y desencadenar estructuras de dominios redondeados y fibrilares similares a las observadas en modelos de membrana en monocapas de Langmuir (ver, **Figura 2.28C**). Estas nanoestructuras de dominios y fibras pueden tener importancia biológica dado que al formarse pueden alterar la homeostasis de la membrana celular y provocar una perturbación de la misma debido a las interacciones de Melittin con dominios lipídicos con propiedades interfaciales equivalentes a las de DSPC.

Uno de los factores mencionados como importantes en la interacción de Melittin con lípidos es el estado físico de los mismos, lo que puede explicar la homogeneidad interfacial en las mezclas POPC/Melittin. Para corroborarlo con más seguridad es válido mencionar estudios de RMN de lípidos POPC con Melittin donde se mostraron cambios conformacionales en el grupo polar con pequeños cambios en la cadena hidrocarbonada para este lípido en estado líquido [158]. Sin embargo, los autores de este estudio mencionaron que los cambios conformacionales lipídicos son una respuesta más bien a las cargas positivas que interactúan con la superficie de la membrana en general y no deben considerarse específicos de Melittin, aunque admiten que este péptido es un eficiente modulador conformacional del grupo polar del lípido por la gran densidad de cargas positivas por unidad estructural [158]. De acuerdo con estos resultados podríamos explicar por qué en monocapas mezclas de POPC/Melittin observamos homogeneidad lateral (**Figura 2.23**) con un comportamiento de miscibilidad parcial sin la formación de estructuras redondeadas ni fibrilares en ninguna de las proporciones ensayadas.

Anteriormente, demostramos que el péptido de Melittin puede formar monocapas estables en la interfase aire/agua de forma similar a como lo hacen los lípidos. También estudiamos sus interacciones con glicoesfingolípidos complejos y fosfolípidos en monocapas mezclas. Por lo tanto, cuando los lípidos están en estado líquido-condensado, tales interacciones son más favorables comparadas con lípidos que se encuentran en estado líquido-expandido [23, 90].

Teniendo en cuenta que el Melittin es considerado una toxina, desde nuestro análisis de resultados en modelo de membrana en monocapas, proponemos que cuando el péptido Melittin se inserta en un entorno de membrana enriquecido en lípidos de estado líquido-expandidos como POPC, el desequilibrio de la membrana se produce sin una disrupción de la estructura de la bicapa, probablemente, a través de un mecanismo de formación de poros. Mientras que lo contrario puede ocurrir cuando el entorno de la membrana está enriquecido en lípidos de estado líquido-condensados como es el caso de DSPC, donde el desequilibrio de la membrana puede inducirse con la formación de una estructura fibrilar que acumula los lípidos a una determinada

PAP en un arreglo molecular bien organizado. Estos arreglos favorecerían la interacción de sondas fluorescentes como ThT (ver **Sección 2.2.3**).

Si bien no podemos excluir ningún mecanismo de perforación de la membrana, nuestros hallazgos pueden respaldar la comprensión de algún evento molecular particular que involucra a DSPC en interacción con el péptido Melittin. En este sentido, observamos cambios específicos en las características de las bandas correspondientes a los modos vibracionales en ATR-FTIR de ambas moléculas y de sus mezclas especialmente al 50% de PAP (**Figura 2.21**). Además, los datos reportados por Lin *et al.* [157], cuando DSPC se mezcla con componentes asimétricos, debería ser más consistente con un mecanismo de alteración de la membrana a través de la unión de Melittin a zonas asimétricas específicas de la interfase que están enriquecidas con el lípido DSPC (en estado líquido-condensado) lo que desencadena un estado más disruptivo de la membrana cambiando las propiedades hidrofóbicas de este entorno molecular.

Teniendo en cuenta la información experimental obtenida en estos estudios, diseñamos un modelo de organización de lípidos en 2D para describir los dominios redondeados y estructuras fibrilares interconectados. El mismo se hizo agrupando áreas con valores de intensidad de grises similares en las imágenes obtenidas por BAM (consulte la **Figura 2.28B**, y la Sección Experimental). Este modelo establece que las estructuras fibrilares se deben a la condensación de los centros de nucleación de los dominios redondeados que son las estructuras predominantes entre 25-30 mN/m, lo que es equivalente al empaquetamiento en biomembranas (ver **Figura 2.28B y 2.28C**).

En nuestros resultados observamos claramente un comportamiento de inmiscibilidad en las interfases DSPC/Melittin. Por lo tanto, los dominios redondeados y las estructuras fibrilares observadas por BAM en la interfase son un efecto directo del estado más sólido y menos hidratado del lípido, la propiedad anfipática del péptido Melittin y su proporción en la monocapa mezcla.

Como hemos venido analizando en la proporción DSPC/Melittin (50%), las estructuras fibrilares son ThT positivas y muestra un corrimiento de emisión de fluorescencia hacia el rojo que es reproducible (**Figura 2.28**). Este hallazgo está en consonancia con las interacciones atractivas deducidas de acuerdo con el análisis de miscibilidad de la interacción de DSPC con el péptido Melittin (ver **Figura 2.24A** la desviación del MMA debajo del área mezcla ideal). Desde el punto de vista estructural, a esta proporción observamos un cambio en la disposición de la estructura secundaria del péptido, así como la aparición de nuevos picos en la zona de

señales correspondientes al lípido centradas en los 2960 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} en comparación con el lípido puro, o incluso con las otras proporciones evaluadas (ver datos ATR-FTIR en la **Figura 2.25B**). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que tanto DSPC como Melittin forman parte de una estructura fibrilar en tal conformación que, a su vez, puede ser responsable del cambio de marcaje de ThT, probablemente debido a la formación de un peculiar bolsillo hidrofóbico "similar a amiloide" promovido por una disposición lípido/péptido moldeados en la interfase agua/aire; llevándonos a plantear que *“la amiloidogénesis en entorno de membranas no es un evento molecular restringido a los péptidos A β amiloides sino que también, se puede manifestar en péptidos con propiedades antibacterianas y tóxicas como es el caso de Melittin”*.

De allí que la fibrilación de Melittin ocurre específicamente cuando el lípido de la mezcla está en estado LC (DSPC) pero no cuando está en estado LE (POPC), independientemente de que ambos lípidos tienen el mismo grupo polar. Sin embargo, el nivel de hidratación interfacial es notablemente diferente, como lo informaron Brewer et al, 2010. estudiando la relajación de fluorescencia emitida por la sonda LAURDAN en monocapas lipídicas en estados LE y LC [104].

De manera general se sabe que la permeabilización de la membrana inducida por Melittin, un AMP ampliamente estudiado contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas [63], es un fenómeno que puede desencadenarse por una organización específica de lípidos/péptidos en la membrana. Sin embargo, el mecanismo molecular específico de la perforación de las membranas por AMPs ha sido objeto de debate, desde la formación de poros de la membrana hasta la organización de AMP con lípidos que no forman bicapa, lo que lleva en todos los casos a la pérdida de la homeostasis de la membrana [159], incluida la pérdida completa de la integridad de la bicapa como ocurre en el caso del péptido Citropin [154]. Nuestros hallazgos indican que Melittin puede inducir su acción lítica por varios mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente en membranas más complejas, es decir, formación de poros en regiones hidratadas en estado líquido-expandido y/o estructuración en dominios de la bicapa más deshidratado.

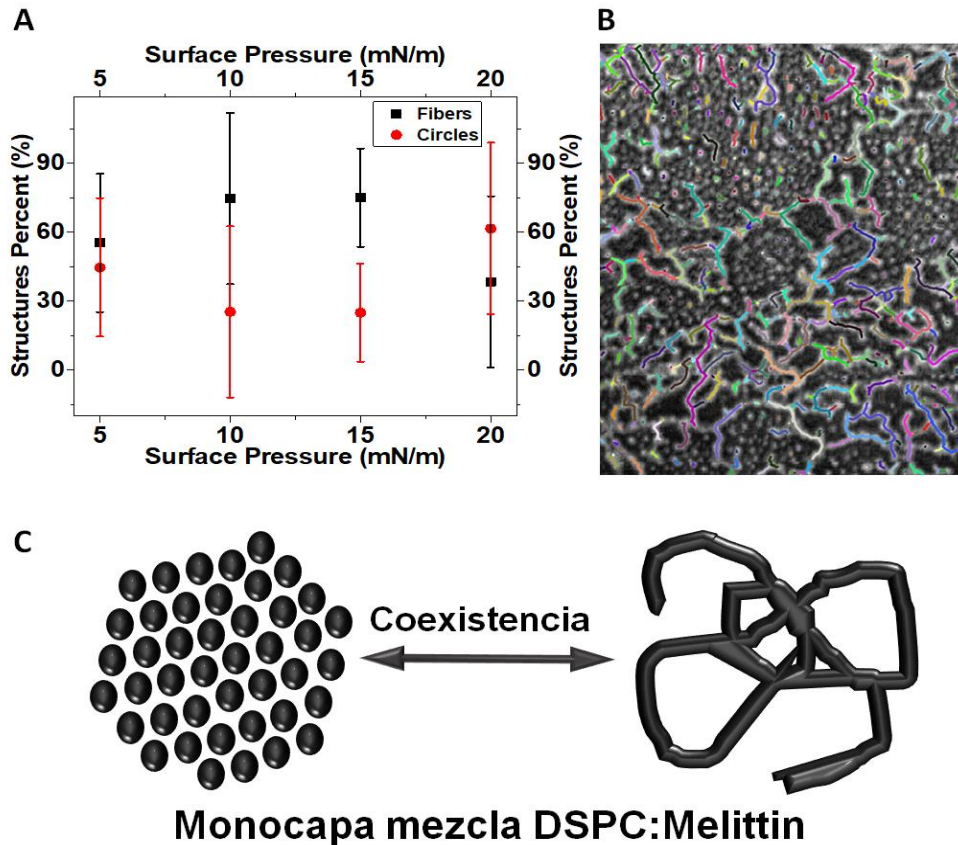


Figura 2.23: Coexistencia de estructuras en monocapas mixtas de DSPC:Melitina al 50 % de proporción de área peptídica. A: Dependencia de la presión superficial de las estructuras (en porcentaje del área cubierta). Las barras de alto error en el gráfico muestran que la coexistencia de dominios redondeados y fibrillas es independiente de la compresión. **B:** la etiqueta de colores de intensidad indica la discontinuidad de la conexión de las fibrillas en la monocapa analizada mediante el uso del software PixInsight-advance con un script específico para seguir valores de igual intensidad en la matriz a partir de imágenes BAM 2D. **C:** representación esquemática del posible equilibrio bidimensional entre dominios redondeados y formación de fibrillas.

2.3 Nano-cables del péptido Melittin revestidos con el lípido DSPC y moldeados en la interfase agua/aire

2.3.1- Los cambios conformacionales en monocapas de los componentes puros (DSPC, Melittin) y su mezcla como indicio de una interacción lípido-péptido organizada

Como demostramos en la **Sección 2.2.4** la interacción del lípido DSPC con el péptido Melittin al 50% de PAP mostró una estructuración fibrilar donde los lípidos alcanzan un arreglo molecular bien organizado que favorece la partición y emisión de fluorescencia de la sonda ThT. Lo que cobra gran importancia sobre todo por el hecho de que Melittin es un péptido considerado no amiloidogénico, sin embargo, adquiere propiedades de amiloide en presencia del lípido DSPC al 50% de PAP (**Sección 2.2.4**). De manera que la amiloidogénesis no es un proceso exclusivo de péptidos amiloideos como A β amiloide. Por lo tanto, consideramos de suma importancia entender que la organización estructural de esta interacción es moldeada en la interfase agua/aire y le confiere a dicho arreglo molecular propiedades estructurales que permiten la inserción de sondas fluorescentes dado por cambios conformacionales que ocurren en mezcla con respecto a sus componentes individuales. En este apartado mostraremos la formación peculiar de nano-cables de Melittin interaccionando en forma muy particular con DSPC cuando se lo mezcla a la relación de 60 % de PAP.

Es bien conocido que la conformación de proteínas, péptidos o lípidos puede cambiar en respuesta a factores ambientales, dichos factores pueden incluir pH, temperatura, concentración, iones, uniones a ligandos y otros [160-163]. Teniendo como base los resultados mostrados en la **Sección 2.2.4** podemos indicar que las diferentes estructuras formadas en las monocapas mezclas son moldeadas en la interfase agua/aire, lo que depende de las propiedades de superficie del lípido, así como del tamaño y secuencia del péptido que en este microambiente experimentan cambios conformacionales. Para estudiar los mismos tanto en proteínas como en lípidos han sido usadas varias técnicas. En nuestro caso particular hemos realizado análisis de ATR-FTIR para mostrar claras evidencias de interacciones organizadas y no caracterizadas del lípido DSPC con el péptido Melittin formadas en la interfase agua/aire a una PAP de 60%. El ATR-FTIR es una técnica que nos informa acerca de los modos vibracionales, que son una característica única de las moléculas estudiadas y está dada por su estructura molecular [149, 164].

De acuerdo a nuestros resultados el péptido Melittin puro mostró en la región de Amida I en los 1655 cm^{-1} correspondiente a la estructura α -hélice (**Figura 2.29A, parte izquierda**). Sin embargo, en la monocapa mezcla de DSPC/Melittin apareció una banda intensa a los 1625 cm^{-1} que podría corresponder a estructuras de hoja- β [164-166]. Al comparar estas bandas se aprecia que la correspondiente a hoja- β es más intensa que la correspondiente a α -hélices, aunque esta última se aprecia más ancha. Esto es un indicativo de que en el péptido la estructura α -hélice persiste aún con formación en estructura hoja- β estabilizando al Melittin en una nueva conformación al interactuar con el lípido DSPC, incluso después de la transferencia y secado en el soporte de mica (**Figura 2.29B**).

Por otra parte, a los valores correspondiente a frecuencias vibracionales donde salen las bandas para lípidos se apreciaron dos picos diferenciados y centrados en $\sim 2956\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2870\text{ cm}^{-1}$, estas señales se atribuyen a vibraciones asimétricas y simétricas respectivamente de los grupos químicos $-\text{CH}_3$ [164, 167, 168] en las monocapas mezclas cuando se comparan con los componentes puros. De manera similar los modos vibracionales asimétricos y simétricos para los grupos $-\text{CH}_2-$ mostraron cambios apreciables con respecto a los valores típicos de 2853 cm^{-1} y 2925 cm^{-1} respectivamente [169].

Teniendo en cuenta estos cambios en los anteriores modos vibracionales procedimos a calcular la relación $A(2853)/A(2925)$ donde A es área bajo la curva de estas bandas. Los valores calculados mostraron un decrecimiento al comparar la mezcla al 50% (0.335) con respecto a DSPC puro (0.415) lo cual es atribuible a cambios conformacionales en las cadenas hidrofóbicas de DSPC por una modificación en su movilidad como consecuencia de la interacción de DSPC con Melittin (**Figura 2.29D**).

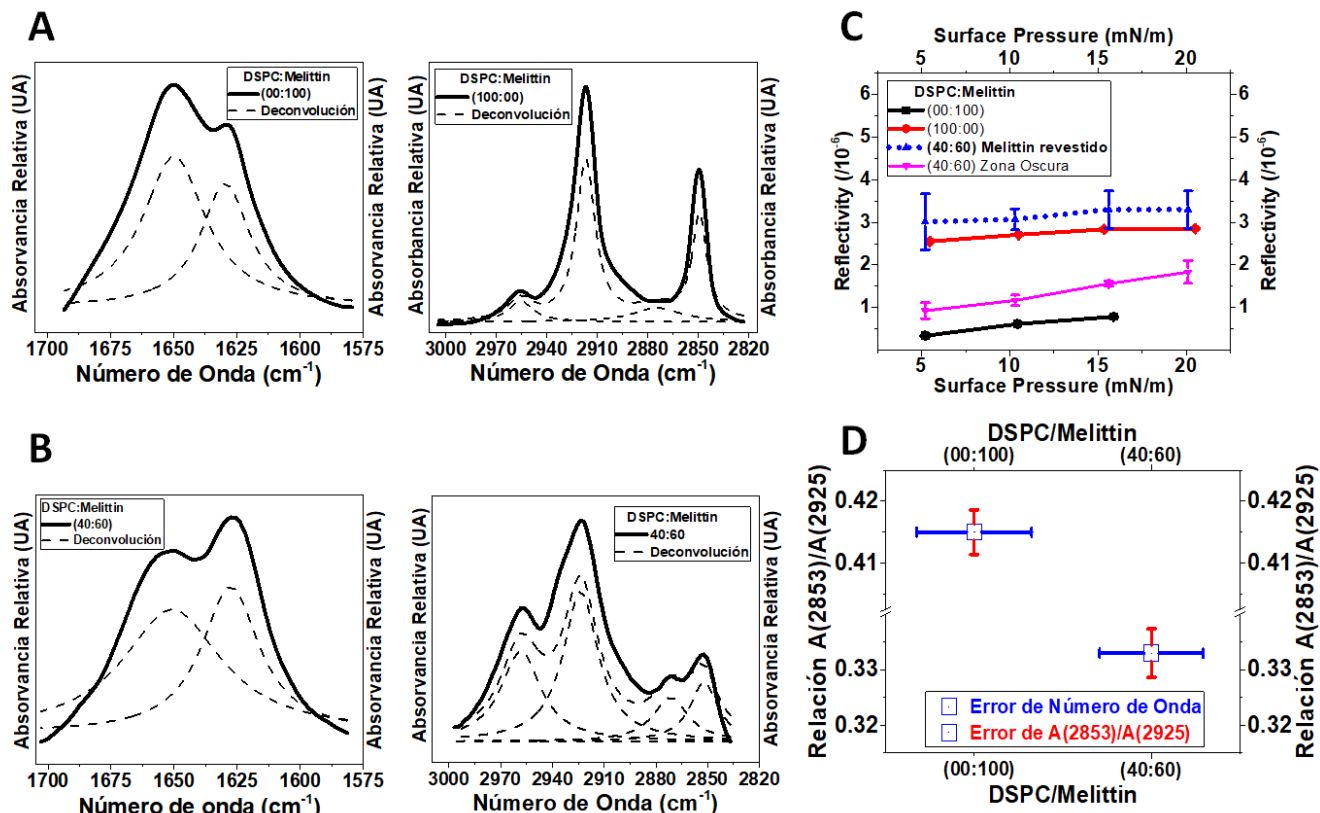


Figura 2.29: Espectros de ATR-FTIR y análisis de reflectividad de films mezclas de DSPC/Melittin (40:60). **A:** Región Amida I de Melittin puro (parte izquierda); región de 3000-2800 cm⁻¹ correspondientes a DSPC puro (parte derecha) muestra señales vibracionales de -CH₂- simétricos (~2853 cm⁻¹) y anti-simétrico (~2922 cm⁻¹). **B:** Región Amida I de la mezcla DSPC/Melittin (40:60) (parte izquierda) se aprecia un pequeño hombro a los 1625 cm⁻¹ que corresponde a estructuras en hoja β. En la región de 3000-2800 cm⁻¹ para la mezcla DSPC/Melittin (40:60) (parte derecha) se aprecian diferenciadamente señales vibracionales de -CH₃- centradas a ~2960 cm⁻¹ y ~2870 cm⁻¹. **C:** Análisis de reflectividad de las imágenes de BAM para la mezcla DSPC/Melittin (40:60). Los valores de reflectividad muestran dos regiones bien distinguibles, donde los valores más bajos fueron similares a los del péptido Melittin puro, mientras que los más altos fueron similares al lípido DSPC puro. **D:** Relaciones de áreas relativas de los modos vibracionales simétricos y anti-simétricos de -CH₂-. Los errores correspondientes a la longitud de onda y a las áreas fueron de 0.3 y 0.2 para el DSPC puro y la mezcla DSPC/Melittin respectivamente.

Este comportamiento es importante y relevante para explicar el arreglo interfacial en las monocapas mezclas que es mostrado a través del análisis de reflectividad proveniente de las imágenes de BAM. De acuerdo con este análisis los valores de reflectividad más bajos corresponden al péptido Melittin, mientras que los valores de reflectividad más altos son similares al lípido DSPC (**Figura 2.29C**). De manera que definimos un rango de valores en la mezcla como “Melittin revestido (coated)” que corresponde a DSPC interactuando con Melittin en una conformación o arreglo multimolecular mientras que el rango de valores de reflectividad definidos como “Melittin no-revestido (zona oscura)” de DSPC interactuando con Melittin en una conformación o arreglo diferente (**Figura 2.29C**).

Estos resultados tanto los de reflectividad calculados a partir de las imágenes de BAM como los de ATR-FTIR fueron acompañados por un análisis de FM Confocal para lo cual empleamos tres sondas fluorescentes con diferentes mecanismos de partición y/o interacción (ver *Sección 2.2.2*) que nos permitieron demostrar que el péptido Melittin puede estar revestido con DSPC con un PAP de Melittin del 60%.

2.3.2- Evidencias por FM del revestimiento del péptido Melittin con lípidos DSPC moldeados en la interfase agua/aire

De acuerdo con resultados experimentales de ATR-FTIR y análisis de reflectividad a partir de las imágenes de BAM postulamos que el péptido Melittin presumiblemente estaría revestido (coated) con lípidos DSPC; lo cual puede ser corroborado a través de Microscopía de Fluorescencia. Es bien conocido que los datos experimentales de FM donde se usan combinación de sondas en mezclas de lípidos o lípidos-péptidos pueden ser utilizadas para obtener información acerca de la estructura de dominios y su dinamismo lo que puede ser desencadenado por el ambiente lipídico. Es válido aclarar el comportamiento de las sondas puede ser sensible tanto de la fase de la interfase como del microambiente donde se inserta [170, 171].

El significado de lo anteriormente planteado incrementa cuando la sonda liposoluble usada particiona hacia fases lipídicas en forma diferenciadas y las sondas hidrosolubles hacia un arreglo específico de proteínas. En esta sección mostramos resultados experimentales novedosos y originales donde hemos usado tres sondas fluorescentes (Laurdan, DiI-C18 y ThT) las que previo a realizar las monocapas se adicionaron a la mezcla lípidos-péptidos y seguidamente se transfirieron a un soporte de mica sobre el cual fueron observadas por FM Confocal. En el caso de la sonda Laurdan, particiona indistintamente hacia la fase gel (fluido ordenado) y fase fluida (fluido desordenado) mientras que el DiI-C18 particiona preferentemente a la fase líquido-condensado (fluido ordenado) [172]. Para el caso de ThT la partición es típicamente hacia fibras proteicas conocidas como amiloides [93]. En esta sección se muestra por primera vez un arreglo molecular de interacción lípido-péptido que plantea un peculiar ensamblaje de péptidos, inducido por una fase ordenada de lípidos que se asemejan a un revestimiento lo que contribuye a formar un arreglo de nano-cable que son moldeados en la interfase agua/aire.

Los microambientes de lípidos ordenados tienen una influencia en el comportamiento de proteínas en membranas biológicas [173] de manera que el ordenamiento de lípidos es un importante fenómeno para modular la señalización celular, el tráfico intracelular y la bioactividad de las membranas [174, 175]. Para lograr un mejor entendimiento acerca de la separación de fases lipídicas han sido usadas diferentes sondas fluorescentes como herramientas moleculares [174, 176, 177]. Con este objetivo muchos autores han empleado sondas solvatocrómicas (que censan ambientes de polaridad) tales como Laurdan para estudiar el orden lipídico [178, 179] debido a que tiene la capacidad de detectar microambientes de menor polaridad en fases lipídicas particularmente empaquetadas lo cual resulta en una exclusión de moléculas de agua así como una reducción de la movilidad de su momento dipolar [172, 180, 181]. La emisión de la sonda Laurdan está en la región azul con un pico a los 440 nm para fases lipídicas ordenadas mientras que las fases lipídicas desordenadas el máximo de emisión está en los 490 nm [104, 182]. En este estudio mostramos que el máximo de emisión de Laurdan estaba ligeramente corrido hacia los 495-500 nm en las estructuras en forma de nano-cables ubicadas dentro de los dominios lipídicos de la monocapa mezcla transferida al soporte de mica. Mientras que en las zonas de los dominios fuera de las estructuras de nano-cables el máximo de emisión estaba centrado en los 440 nm (**Figura 2.30 ver, imagen B1 y gráfico C1**). Estas diferencias en la emisión de Laurdan responde dos fenómenos, uno llamado *fotoselección*, que indica el grado de alineamiento del momento dipolar con el haz de luz de excitación, y el otro se refiere a la *sensibilidad* del grupo solvatocrómico con la relajación dipolar e interacción con las moléculas de agua [183]. Estas propiedades permitieron explicar los diferentes valores de intensidades en las regiones de los dominios que delimitan a los nano-cables (Laurdan con un componente principal de $\lambda_{em} = \sim 500 \text{ nm}$) con respecto a las zonas donde estos no están presentes (Laurdan con un componente principal de $\lambda_{em} = \sim 440 \text{ nm}$) dentro de un mismo dominio que contiene a los nano-cables. A nivel molecular esto se debe al alineamiento del momento dipolar del Laurdan con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos cuando esta sonda se inserta entre los lípidos organizados en diferentes fases (o estructuras lípido-péptido en nuestro caso).

Recientemente Miyazaki et al. 2022 [80], utilizando simulaciones de dinámica molecular mostraron que el péptido Melittin puede inducir un efecto denominado “*de extracción de lípidos*” en bicapas quedando organizado en un arreglo extendido que depende de la proporción lípido/péptido. Analizando esta posibilidad junto con nuestros resultados experimentales con la

mezcla DSPC/Melittin, proponemos que el péptido Melittin se ensambla en forma de nano-cables revestidos por el lípido DSPC quedando embebido dentro de dominios lipídicos, dichas estructuras son moldeadas en la interfase agua/aire y mantienen su forma luego de ser transferidas a soportes de mica de manera que pueden ser observados por FM Confocal.

Cuando usamos DiI-C18 que particiona hacia fases ordenadas de DSPC, como ha sido reportado [184, 185], su máximo de emisión fue centrado a 565nm como típicamente se observa en sistemas lipídicos [186, 187]. En comparación con Laurdan, el momento dipolar de DiI-C18 está orientado paralelo al plano de la membrana y perpendicular a las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos [172], lo que determinó una ausencia de marcaje en la zona correspondiente a los nano-cables cuando se usó esta sonda debido a una diferente disposición de los lípidos en interacción con Melittin. Aunque se observó que dentro de los dominios y cerca de los nano-cables tanto Laurdan como DiI-C18 son capaces de particionar (**Figura 2.30 imagen B1 y B2**). Por otra parte, como hemos indicado previamente la sonda ThT muestra un cambio en el máximo de emisión en mezclas de DSPC/Melittin al 50% de PAP (**ver sesión 2.2.3 y Figura 2.27**), en este caso, para un PAP 60%, el máximo de emisión se ubica alrededor de los 545-550 nm permitiéndonos visualizar claramente los nano-cables (**Figura 2.30 imagen B3 y gráfico C3**). En este sentido el uso combinando las imágenes obtenidas de ThT y DiI-C18 permitió visualizar las estructuras en forma de nano-cables ubicadas dentro de los dominios lipídicos (**Figura 2.30 imagen B3 y gráfico C3**). Es importante destacar que las longitudes de onda de los láseres usados para excitar a los fluoróforos Laurdan y DiI-C18 fueron 405 nm y 525/543/559 nm respectivamente. Las que se encuentran por debajo o muy cercanos de sus respectivos valores reportados 360 nm y 514 nm [188-190]. Este hecho explica que los espectros aparezcan incompletos (**Figura 2.30, C1 y C2**). A modo de resumen y teniendo en cuenta las diferencias en los mecanismos de marcaje de las sondas empleadas el patrón descrito como nano-cables dado por la interacción de DSPC/Melittin provee tres importantes significados. **Primero**, la sonda Laurdan es capaz de diferenciar dos fases diferentes, una correspondientes a estructuras nano-cables en el centro de los dominios con un máximo de emisión entre los ~495-500 nm y otra en los dominios alrededor de los nano-cables con un máximo de emisión alrededor de los ~440 nm (**Figura 2.30, imagen B1 y grafico C1**). **Segundo**, similar a como han señalado otros autores [184, 185, 191] en nuestro caso el DiI-C18 debido a su orientación perpendicular a las cadenas hidrocarbonadas de DSPC, es visualizado en la fase lipídica con un patrón que dibuja la forma de los dominios que contiene los nano-

cables pero sin marcar los mismos porque no particiona hacia el núcleo (core) del dominio (Figura 2.30, imagen B2 y C2). Tercero, la sonda ThT interacciona con proteínas amiloides [93], esta peculiar interacción de DSPC/Melittin evidentemente está generando regiones hidrofóbicas que favorecen el acomodamiento del ThT con su consecuente emisión de fluorescencia corroborando que la amiloidogénesis es un proceso molecular que no es exclusivo de péptidos A β amiloides.

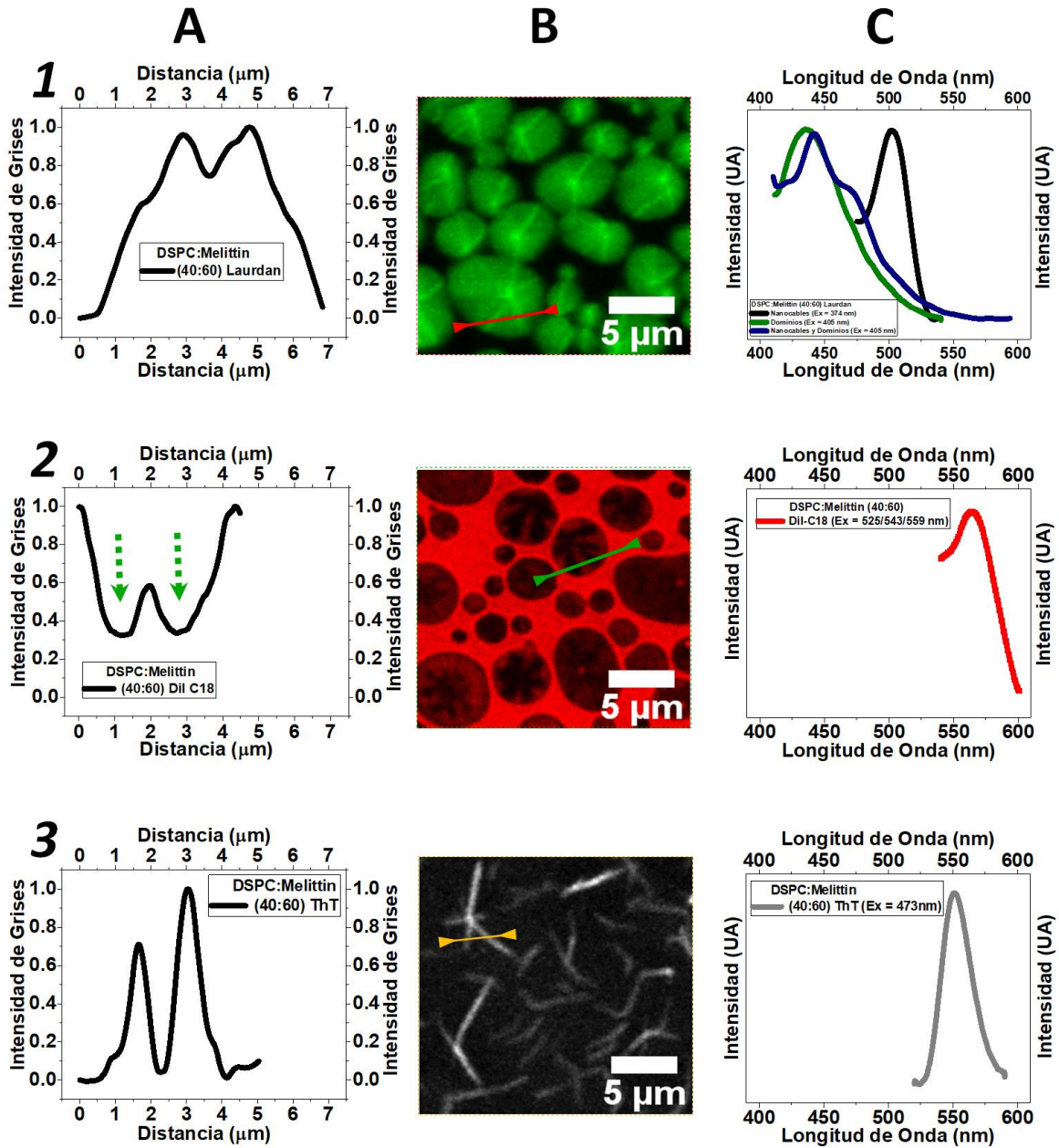


Figura 2.30: Fibras del péptido Melittin revestidas por el lípido DSPC moldeadas en la interfase agua/aire y transferidas a un soporte de mica. A: Gráfico de intensidad de grises tomado en la zona señalada en las

imágenes, resaltando la disposición radial de las estructuras fibrilares. Es válido destacar un incremento de intensidad de los nano-cables a excepción de cuando el marcaje es con DiI-C18 (flecha verde) (ver Figura. **A2**). **B**: Imágenes de microscopía Confocal de las sondas usadas en el arreglo interfacial de la mezcla DSPC/Melittin. Las sondas fueron Laurdan, DiI-C18 y ThT. En **BI** se muestran los dominios marcados por Laurdan con una clara forma radial de los nano-cables. En **B2** se muestra el marcaje de los dominios por DiI-C18 donde se dibuja la forma radial de los nano-cables sin marcarse. En **B3** se visualiza el marcaje específico por la sonda ThT de las estructuras en forma de nano-cables. **C**: Espectros de emisión de fluorescencia de las sondas usadas. En **C1** se visualizan los espectros de emisión de Laurdan a ~440 nm (zona de dominios fuera de los nano-cables) y a ~495-500 nm (nano-cables). En **C2** se muestra la emisión de DiI-C18 a ~565 nm. Finalmente, en **C3** se aprecia el espectro de ThT con un máximo de emisión entre ~445-550 nm correspondiente a las estructuras de nanocables. Las longitudes de onda de excitación de los láseres usados para excitar a los fluoróforos fueron: 405 nm, 543/559 nm y 473 nm para Laurdan, DiI-C18 y ThT respectivamente.

Además, involucra aspectos como el estado físico del lípido y la relación lípidos/péptidos; esto último, muestra la relevancia del concepto PAP en monocapas de Langmuir mezclas.

Dado la clara estabilidad de estas estructuras formadas por el revestimiento de DSPC sobre el péptido Melittin que mantienen su forma incluso después de transferirlos a un soporte de mica procedimos a tratar de aislar los nano-cables; lo cual fue corroborado por AFM y FM Confocal utilizando la sonda Laurdan (ver *Sección 2.3.3*).

2.3.3 Aislamiento de los nano-cables DSPC/Melittin revestidos. Detección por AFM y FM

Estos dominios se mantienen estables en la interfase durante la compresión incluso después de transferirse a un soporte de mica y almacenados durante unas 12 horas a 25 grados en un ambiente seco. Este largo periodo de tiempo de estabilidad está dado por cambios conformacionales en el lípido y en el péptido que determinan una fuerte interacción entre ellos, los que fueron detectados por ATR-FTIR (**Figura 2.29A**). Aunque las interacciones lípido/péptido no son perfectamente entendidas a nivel molecular, este arreglo en forma de nano-cables está dirigido hacia un contacto intermolecular lípido/péptido muy específico que depende del estado del lípido, de la estructura secundaria del péptido y de la PAP. Debido a la estabilidad de estas interacciones es posible conservar cierta integridad estructural de los nano-cables después de esparcir una gota de agua sobre los dominios transferidos al soporte de mica con el objetivo de lograr un “efecto de arrastre” de los lípidos que no están revistiendo los nano-cables quedando los mismos aislados. Para un mejor entendimiento del proceso de aislamiento de los nano-cables hay que considerar que el soporte de mica tiene propiedades hidrofílicas que favorece el esparcimiento de la gota de agua sobre la mica lo que es usado para arrastrar moléculas con regiones hidrofóbicas (anfífilos) como los lípidos DSPC que forman los

dominios transferidos al soporte de mica. Bajo estas condiciones los lípidos DSPC tienden a unirse y formar estructuras de diferentes formas reduciendo su superficie de contacto con el agua. Teniendo en cuenta lo anterior hemos propuesto dos pasos experimentales para detectar los nano-cables aislados como consecuencia del “efecto de arrastre” del agua mediante AFM y FM (**Figura 2.31**).

Primeramente, las imágenes de AFM fueron obtenidas directamente sobre la monocapa transferida al soporte de mica (**Figura 2.31, imagen A1**). Luego de adicionar una gota de agua sobre la superficie de la mica y esperar un tiempo de incubación para garantizar su secado se obtuvo una segunda imagen sobre la zona seca, pudiéndose apreciar los nano-cables aislados sobre la superficie de mica (**Figura 2.31, imagen B1**).

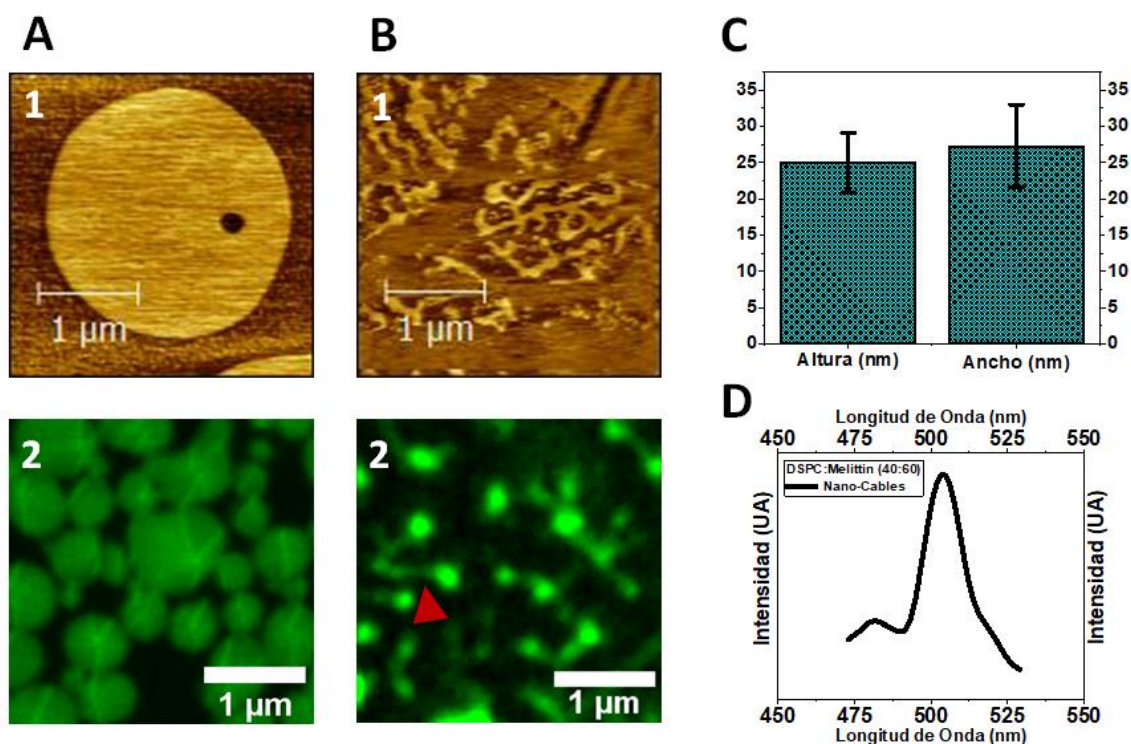


Figura 2.31: Análisis de AFM de mezcla DSPC/Melittin 60% transferido a soporte de mica. A: Imágenes de topografía de AFM (imagen **A1**) y Microscopía Fluorescencia Confocal (imagen **A2**) a t_0 (previo a adicionar la gota de agua) a la mezcla DSPC/Melittin transferidas a soporte de mica. En la imagen **A2** (Confocal) se aprecian claramente un patrón de mayor intensidad que corresponde a los Nano-cables dentro de los dominios. **B:** Imágenes de topografía de AFM (imagen **B1**) y Microscopía Fluorescencia Confocal (imagen **B2**) a t_1 (después de adicionar la gota de agua) a la mezcla DSPC/Melittin transferidas a soporte de mica. En la imagen **B2** (Confocal) se visualiza claramente los Nano-cables aislados como consecuencia del efecto de arrastre por adición de la gota de agua. Se aprecia que mantienen su integridad (flecha roja) con una forma similar a la apreciada a t_0 (antes de adicionar la gota de agua). **C:** Gráfico que señala las dimensiones promedio altura (~25 nm) y el ancho (~27 nm) de los Nano-cables. **D:** Espectro obtenido por FM Confocal usando la sonda Laurdan (2%) de los Nano-cables aislados obtenidos a t_1 (ver imagen **B2**). Como era de esperar el máximo de emisión apareció alrededor de los 500nm correspondiente a fase más líquida o desordenada donde aparecen los Nano-cables.

Siguiendo la misma configuración experimental el ensayo se realizó por duplicado y se visualizó por Microscopía de Fluorescencia Confocal utilizando la sonda Laurdan. Pudimos evidenciar que la sonda Laurdan particionó diferencialmente hacia dos fases en los dominios de la mezcla DSPC/Melittin. Primero, antes de adicionar la gota de agua: fase correspondiente a los lípidos que rodean los nano-cables (fase lipídica ordenada) (emisión a ~440nm); Segundo, fase correspondiente a los lípidos que revisten a Melittin para formar los nano-cables (fase lipídica más desordenada) (emisión de Laurdan con mayor intensidad a ~490-500nm) (**Figura 2.31, imagen A2 y B2**). De manera que en la formación de los dominios en dicha mezcla los lípidos se organizan diferente en la interfase agua/aire dependiendo si están interaccionando (revistiendo) a Melittin o no. A las estructuras en forma de Nano-cables se les realizó un espectro de emisión, donde se aprecia un máximo predominante alrededor de los 500 nm (**Figura 2.31 D**). Este perfil de Laurdan corresponde a fases lipídicas en estado más líquido o desordenado que se organizaría revistiendo (cubriendo) a Melittin y adquieren un patrón diferenciable dado por el efecto de arrastre de la gota de agua. Las dimensiones de los nano-cables estuvieron en el rango de los ~25 nm de alto por ~27 nm de ancho (**Figura 2.31 C**).

Estos resultados también exponen a los nano-cables revestidos y moldeados en la interfase agua/aire como estructuras que pueden mimetizarse a un ambiente fisiológico determinado facilitando su penetración a la célula u organelo celular. Siendo este “efecto lipídico mimético” una herramienta poderosa para el desarrollo de una *tecnología de revestimiento de péptidos* que puede mejorar la viabilidad de los péptidos bioactivos y reducir sus posibles efectos secundarios.

De manera general, podemos considerar que los péptidos bajo ciertas condiciones experimentales tales como mezclas con lípidos [28] pueden auto-ensamblarse por interacciones inter-moleculares específicas que dependen de las propiedades de secuencia de aminoácidos [192], aunque su estructuración está altamente influenciada por el estado físico de los lípidos favoreciendo interacciones que conducen a una transición amiloide que son desencadenados por arreglos o moldeos que se indican en la interfase agua/aire [28].

CAPITULO III

Materiales y Métodos

3.1 Reactivos

El péptido Melittin se adquirió de Sigma Chem., Co. (St. Louis, MO, EE. UU.) y se purificó adicionalmente como se describió en trabajos anteriores publicados por el grupo de investigación [23]. Por otra parte los péptidos amiloides fueron obtenidos sintéticamente (1) A β (1–40) (**D₁AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVG₂₅SNKGAIIGLM₃₅VGGVV₄₀**) y (2) A β (1–42) (**D₁AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVG₂₅SNKGAIIGLM₃₅VGGVVIA₄₂**) con dos aminoácidos más en su secuencia, se adquirieron de Bachem AG (www.bachem.com). La subfase usada fue NaCl 145 mM. El agua se obtuvo de un sistema Milli-Q (Millipore, EE. UU.) con una conductividad inferior a 0,085 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ y una tensión superficial de 72 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. El NaCl de Merck (Gottingen, Alemania) se calentó en un horno apropiado hasta 400-450 °C durante al menos 4 h para eliminar pequeñas cantidades de impurezas de surfactante. La 1-pamitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) y la 1,2-disteraoil-fosfatidilcolina (DSPC) se adquirieron de Avanti Polar Lipids, EE. UU. El dimetilsulfóxido (DMSO) y el cloroformo provienen de la compañía Merck, Göttingen, Alemania.

3.2 Proceso de formación y compresión-expansión de monocapas de péptidos y lípidos. π -área Isotermas.

Los experimentos de monocapa de Langmuir se realizaron a $23 \pm 0,5$ °C en una sala especial para el equipamiento de monocapas de Langmuir donde la temperatura fue mantenida en forma constante con la ayuda de un aire acondicionado de techo. Las monocapas de péptidos se formaron utilizando una cuba de Langmuir de 180 ml de volumen de subfase. La subfase fue NaCl no tamponado a 145 mM y pH 5,6. Todos los ajustes se describieron anteriormente en otros trabajos del grupo [20, 21]. El péptido A β y los lípidos se disolvieron en DMSO puro (de alta calidad) y cloroformo, respectivamente, en soluciones madre de aproximadamente 10 mM. Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de la solución madre y fueron diluidas individuales hasta ~ 1 μM . Los fosfolípidos se disolvieron en cloroformo puro y los amiloides

y Melittin en DMSO puro. Para monocapas mixtas, el péptido y los lípidos se pre-mezclaron en solución en la proporción deseada justo antes de realizar el experimento. La solución (15-30 μL) se extendió directamente sobre la interfase de la subfase mediante el uso de una jeringa Hamilton de punta biselada (Spreading). La presión superficial se determinó con una placa de Pt utilizando el método de Wilhelmy. La simetría continua de la compresión se logró a través del movimiento automático y simultáneo de ambas barreras desde ambos extremos de la monocapa. Las áreas totales de las monocapas fueron grabadas continuamente usando un software proporcionado por KSV Instruments Ltd. La velocidad de compresión habitual utilizada se ajustó a $10 \text{ mm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$, también se comprobó que a velocidades de compresión menores bajas no alteran los resultados. Las monocapas formadas por proteínas puras y de sus mezclas con lípidos suelen tener un proceso de colapso lento, dando una discontinuidad no abrupta en las isothermas π -área incluso a la velocidad de compresión más lenta. Por esta razón, hemos demostrado que el punto de colapso o la presión de transición de todas las isothermas (POPC/A β (1-40) y DSPC/A β (1-40)) que se muestran en la **Figura S2** es la primera discontinuidad tomada de la segunda derivada de la isoterma π -área (**Figura S2**). Estos valores calculados matemáticamente son inferiores a las primeras discontinuidades observables a primera vista en las isothermas de la **Figura S1**. Antes de la compresión, se permitió que las películas extendidas se equilibraran durante 2-3 min. AMM o el área molecular media por molécula es el área superficial disponible dividida por la cantidad de moléculas esparcidas en la interfase, según $\text{AMM} = (A_s/n_L + n_P)$, donde A_s es el área superficial total disponible de la cuba y n es la cantidad de moléculas de lípido n_L o proteína n_P o su mezcla $n_L + n_P$ esparcidas sobre el A_s . El cálculo es automático mediante el software KSV el cual tiene en cuenta la velocidad de la barrera y el tamaño del área de la superficie disponible de la cuba al comprimir la monocapa. El A_{ideal} es proporcional a la fracción molar y al área molecular individual de los componentes puros de la monocapa mezcla a una presión superficial definida (π) según $A_{\text{ideal}} = (A_L X_L + A_P X_P)_\pi$, donde A_L y A_P son las áreas moleculares individuales y X_L y X_P las fracciones molares del lípido y la proteína en la mezcla, respectivamente. AMM es el promedio de al menos 4/5 determinaciones independientes con su correspondiente desviación estándar. El comportamiento de las monocapas mezclas de lípido/péptido se analizó comparando las curvas experimentales (AMM vs π) con las isothermas teóricas (A_{ideal} vs π) para las monocapas correspondientes en las se asume comportamiento ideal sin existir interacciones intermoleculares. De manera que en un comportamiento cercano al ideal (no interacción), el

valor de AMM tiende a estar dentro del valor A_{ideal} [23, 85]. Además, la miscibilidad/inmiscibilidad de la interfase mezcla se determinó de acuerdo con la regla de la fase superficial [85].

3.3 Microscopía de ángulo de Brewster.

Las monocapas se extendieron sobre la subfase en una cava de Langmuir usando una Hamilton de punta biselada, como se describió anteriormente. Las monocapas se observaron directamente a lo largo de toda la isoterma del π -área utilizando un Microscopio de Angulo de Brewster (“BAM” por sus siglas en inglés) que cuenta con un EP3 Imaging Ellipsometer (Accurion, Göttingen, Alemania), el objetivo usado fue de 20X (Nikon, Japón, NA 0,35). Para cada adquisición de imágenes, la monocapa se comprimió mediante pasos de compresión directa de $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Durante la adquisición de imágenes (5-15 s), la presión lateral no mostró ninguna variación detectable. Se tomaron secuencialmente de tres a cinco imágenes para cada presión superficial, con el fin de tener imágenes de diferentes regiones y a diferentes presiones superficiales de la misma monocapa. Los resultados obtenidos con BAM se compararon con las imágenes obtenidas mediante Microscopía de Fuerza Atómica (“AFM” por sus siglas en inglés) y Microscopía de Fluorescencia (“FM” por sus siglas en inglés).

3.4- Experimentos Transferidos a AFM y FM

Una vez comprimida las monocapas hasta una determinada presión de superficie se transfirieron a un soporte de mica (moscovita de grado Nano-Tec V-1 de 10 mm de diámetro y 0,15-0,21 mm de espesor, de Innovative Microscopy Suppliers, Argentina); el soporte de mica se empaqueta en varias capas que se utilizaron quitando una capa para cada experimento. La cara de mica se enjuagó con agua Milli-Q Tipo II antes de transferir el material de la superficie. A continuación, las monocapas de Langmuir se transfirieron al soporte de mica (orientada perpendicularmente a la interfase agua/aire) que previamente fue sumergido en la subfase antes de esparcir las mezclas. La transferencia ocurre cuando el Soporte de Mica es levantado a una velocidad constante ($1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) y manteniendo constante la presión superficial con un baróstato de superficie acoplado a las barreras de la cuba de Langmuir. Antes de la

transferencia, se dejó estabilizar la monocapa (~ 2 min). Cada monocapa de componentes puros o sus mezclas se comprimió primero hasta $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ antes de transferirse al soporte de mica.

3.5- Análisis de Imágenes y FM

Las estructuras fibrilares se visualizaron mediante FM añadiendo una gota de una solución acuosa de la sonda ThT $10 \mu\text{M}$ recién preparada a la monocapa transferida sobre el soporte de mica y dejando secar durante 5 min. Es importante aclarar que la sonda ThT también se puede añadir directamente a la mezcla, lográndose una visualización de menor resolución probablemente debido a la alta solubilidad de la sonda ThT a la subfase durante la formación de la monocapa en la interfase agua/NaCl. Se seleccionó la longitud de onda de excitación con un filtro de corte de 450 nm, y la emisión se tomó a 482 nm. Para el caso de la mezcla DSPC/Melittin la longitud de onda de excitación fue de 480 nm y la emisión fue tomada alrededor de los 540 nm.

Se realizaron controles negativos: ThT puro, lípido puro (POPC, DMPC, DPPC y DSPC) y péptidos puros ($\text{A}\beta$ y Melittin) los que se sometieron al mismo procedimiento. Como control positivo, probamos fibrillas preformadas de α -sinucleína formadas en solución según Gallea y colaboradores [113] y tratada de la misma manera con ThT mediante el uso de un cubreobjetos de vidrio (**Figura 4B**). El análisis de fluorescencia 2D se realizó utilizando un fluorímetro Horiba NanoLog. También fueron adquiridas imágenes con un microscopio de fluorescencia Axioplan Carl Zeiss (Alemania) equipado con una cámara de video Olympus (EE.UU). Adicionalmente, se utilizó un microscopio confocal. Utilizamos objetivos de 20X, 40X y 60X (confocal). El procesamiento y análisis de imágenes se llevó a cabo con Fiji y Pixinsight v. 1.8.6 software. Ambos programas nos permitieron usar algunos filtros, así como la aplicación de la transformada de Fourier (procedimiento matemático) 2D para mejorar la resolución de las imágenes.

3.6- Microscópica de Fuerza Atómica y SEM.

Las mediciones de AFM se realizaron en un microscopio de fuerza atómica multimodo, SPM, Agilent Technology 5500, EE. UU. Para lo cual usamos el soporte de mica como se describió arriba. El escaneo de la superficie se realizó en modo contacto para medir las monocapas de

Langmuir transferidas de las mezclas lípido/péptidos y sus respectivos controles (POPC, DMPC, DPPC y DSPC puros y los péptidos A β (1-40) y Melittin puros). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente excepto para las mezclas DPPC/A β (1-40). Se recogieron imágenes con una resolución de 512X512 píxeles a una velocidad de exploración de entre 0,3 y 0,4 $\text{ln}\cdot\text{s}^{-1}$. Se tomaron simultáneamente imágenes de fricción, deflexión y topografía de las cuales se usaron las de topografía que técnicamente nos proporciona imágenes reales de la rugosidad de la superficie por ser una medida directa sobre la muestra (movimientos del cantiléver a medida que la punta escanea la muestra usando modo contacto). Por otra parte, se obtuvieron imágenes mediante SEM utilizando un modelo Carl Zeiss, Sigma (de las instalaciones de LAMARX, UNC-CONICET). Todas las muestras de SEM fueron tratadas con metalizado de Au.

Conclusiones

El lípido POPC en estado líquido-expandido y nano-organizado en monocapas lipídicas induce estructuras fibrilares en los péptidos A β amiloides en la interfase agua/aire con una proporción baja de péptido. Las imágenes de BAM mostraron claramente estructuras fibrilares 3D que son ThT positivas y fueron bien visualizadas por AFM luego de transferir las nanoestructuras a un soporte de mica. Por el contrario, cuando se utilizó DSPC (estado líquido-condensado) en la mezcla con péptidos A β amiloides, el comportamiento lateral fue inmisible sin formar estructuras fibrilares.

Cuando se realizaron mezclas del péptido A β amiloide con el lípido DPPC, que sufre transición bidimensional LE \rightarrow LC la formación de las fibras depende claramente en qué región de fase se encuentra DPPC, siendo favorecida en la fase LE e inhibida en la fase LC.

Los péptidos truncados A β (1-37/38/39) cuando se mezclaron a baja proporción (95:05) con el lípido POPC no formaron fibras amiloides que pudieran ser claramente apreciables por BAM, lo que indica la influencia crítica de tan solo un solo residuo en proceso de fibrilación. Sin embargo, la reversión de la secuencia de los A β (1-40/42) en mezcla a baja proporción (95:05) con POPC estableció una diferencia estructural marcada en las fibras formadas, apreciándose en ambos casos estructuras fibrilares aisladas y oligómeros en comparación con los networks visualizados cuando los péptidos utilizados estaban en su secuencia natural.

La fibrilación del péptido amiloide en la interfase agua/aire puede modularse dinámicamente por la calidad del entorno acuoso de la fase lipídica, la proporción de la proteína en la mezcla, el empaquetamiento lateral, así como la reversión de la secuencia de los péptidos amiloides y el número de aminoácidos en el C-terminal del amiloide.

La mezcla fisiológica de gangliósidos totales fue capaz de disolver ensamblajes de estructuras fibrilares inducidos por POPC en el péptido A β (1–40) en un sistema modelo de membrana (monocapas de Langmuir). El análisis de imágenes BAM mostró ciertamente la disolución de dominios redondeados ThT positivos y estructuras fibrilares distinguiéndose una fase más homogénea en un entorno lipídico sin desorción de proteínas de la interfase. Este proceso puede conceptualizarse como una transición cooperativa de la disposición supramolecular del A β amiloide estructurado en forma de fibras, lo que es inducido por cambios en el entorno lipídico desencadenados por los gangliósidos en la interfase. La fibrilación de amiloide inducida por

POPC puro puede disolverse dinámicamente cuando los gangliósidos se mezclan lateralmente con las estructuras fibrilares, pero preservando la disposición de la monocapa. Nuestros resultados sugieren que la calidad de la superficie y las propiedades de los componentes lipídicos interfaciales son importantes para que el péptido A β adquiera una estructura molecular definida en un entorno de membrana.

El péptido Melittin induce auto-estructuración con la formación de dominios redondeados y fibras tipo amiloides cuando se mezcla con el lípido DSPC de características líquido-condensado en la interfase agua/aire, dependiendo de la proporción del área peptídica en la mezcla. Las imágenes de monocapas mezclas tomadas con la técnica BAM mostraron claramente estructuras fibrilares 3D y dominios redondeados en la interfase sin disolverse en la subfase. Estas estructuras identificadas fueron marcadas peculiarmente con ThT destacando por primera vez una disposición lípido/péptido en la interfase con un péptido (melittin) que tiene propiedades antimicrobianas y no ha sido identificado como amiloide. Las estructuras también se visualizaron por AFM y SEM luego de ser transferirlas a un soporte de mica. Dichas estructuras fibrilares en la mezcla DSPC/Melittin (50:50) se caracterizan por cambios en el reordenamiento molecular de péptidos y lípidos según las variaciones de señales vibracionales observadas por ATR-FTIR, así como cambios en las longitudes de onda de emisión usando la sonda ThT en microscopía de fluorescencia. Por lo tanto, podemos decir que la amiloidogénesis no es un proceso restringido a péptidos A β amiloides, sino que puede manifestarse en péptidos con propiedades antimicrobianas y tóxicas como melittin, además es modulado por el estado físico de los lípidos. Por el contrario este fenómeno de fibrilación no fue observable con el lípido POPC en estado líquido-expandido, lo que indica que el grado de hidratación de los componentes en la interfase es un factor importante para el efecto descrito.

Las estructuras fibrilares de la mezcla DSPC/Melittin en su superficie tienen un alto contenido de lípidos DSPC según el análisis de reflectividad a partir de las imágenes de BAM incluso cuando la PAP se aumentó ligeramente al 60%. Dada la peculiar organización y estabilidad de esta mezcla en la interfase agua/aire pudimos demostrar mediante microscopía de fluorescencia Confocal usando tres sondas fluorescentes con diferentes mecanismos de partición hacia estructuras fibrilares de proteínas (ThT) y fases lipídicas (Laurdan y DiI-C18) en las que los péptidos Melittin quedan embebidos y revestidos debido a su peculiar interacción con el lípido DSPC (estado líquido-condensado). Este proceso es moldeado en la interfase agua/aire y las estructuras en forma de nano-cables formadas permanecen estables por varias horas incluso

después de ser transferidas a un soporte de mica. Además, pueden ser aisladas luego de ser transferidas a la mica utilizando la fuerza de arrastre de una gota de agua que es depositada en su superficie, precisamente debido a la coexistencia de dos fases lipídicas (líquido-ordenado y líquido-desordenado) dentro de un mismo dominio que responden diferencialmente debido a sus calidades de agua.

Apéndice con Material Suplementario

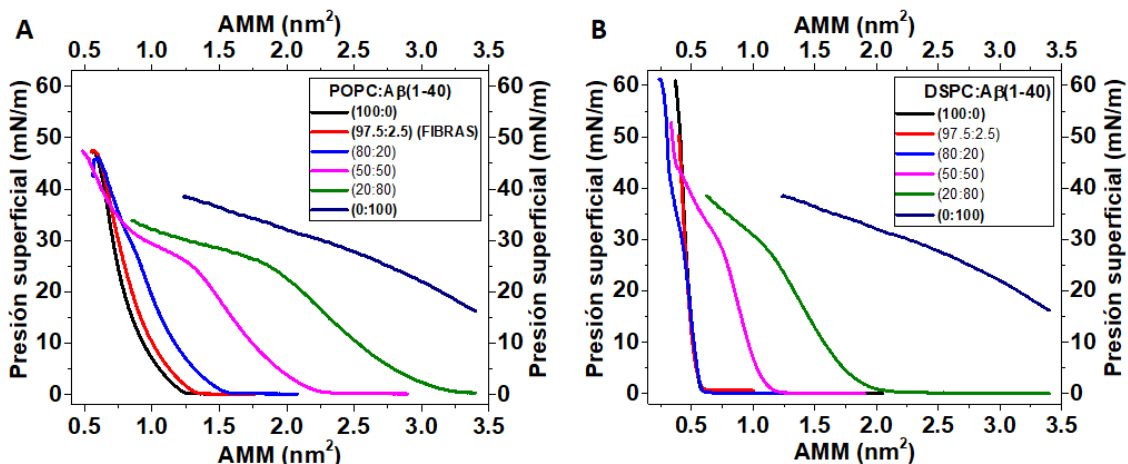


Figura S1: Isotermas π -área del péptido A β (1-40) con lípidos. Mostramos las isotermas de la mezcla POPC/A β (1-40) (A) y DSPC/A β (1-40) (B) en una escala más expandida sobre el eje X (AMM) con el objetivo de apreciar más claramente el primer punto de colapso (ver **Figura 2.1**).

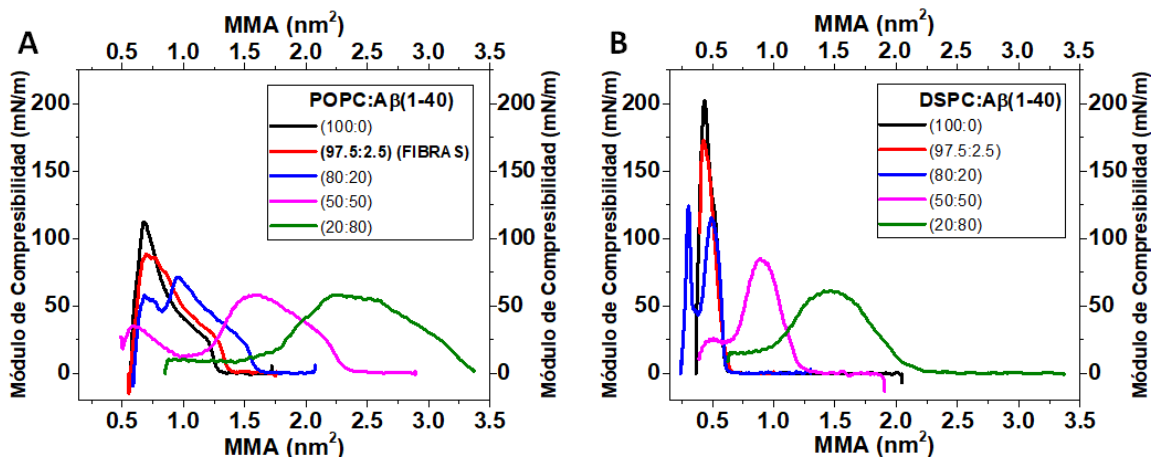


Figura S2: Módulo de compresibilidad (K) del péptido A β (1-40) en mezcla con lípidos. Módulo de compresibilidad para POPC (A) y DSPC (B) en mezcla con el péptido A β (1-40). En el inserto de los gráficos se muestran las PAP para cada mezcla. El K relaciona la variación de la presión de superficie π con el AMM a temperatura constante de acuerdo a $K = -MMA (\partial\pi/\partial MMA)_T$. El valor máximo de este parámetro para cada isoterma está relacionado con transiciones de fases bidimensionales y a un punto de inmiscibilidad lateral (presión de transición) lo cual es válido para aplicar la regla de fases. (ver Referencia: Gaines, G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces; Interscience Publishers: New York, 1966). La Presión de transición indicada en la **Figura 2.1** es el primer punto de discontinuidad de la segunda derivada de la isoterma π -Área con respecto al área mostrada en S2. A proporciones intermedias de péptidos, observamos un segundo punto de colapso bien distinguible relacionado a la fase enriquecida en lípidos. (ver sección experimental).

REFERENCIAS

1. Erkkinen, M.G., M.O. Kim, and M.D. Geschwind, *Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
2. Sosa-Ortiz, A.L., I. Acosta-Castillo, and M.J. Prince, *Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease*. Arch Med Res, 2012. **43**(8): p. 600-8.
3. Selkoe, D.J.H., J., *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Mol. Med., 2016. **8**: p. 595-608.
4. Williamson, R. and C. Sutherland, *Neuronal membranes are key to the pathogenesis of Alzheimer's disease: the role of both raft and non-raft membrane domains*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(2): p. 213-21.
5. Thinakaran, G. and E.H. Koo, *Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29615-9.
6. Tiwari, S., et al., *Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics*. Int J Nanomedicine, 2019. **14**: p. 5541-5554.
7. Goni, F.M., "Rafts": A nickname for putative transient nanodomains. Chem Phys Lipids, 2019. **218**: p. 34-39.
8. Fabiani, C. and S.S. Antollini, *Alzheimer's Disease as a Membrane Disorder: Spatial Cross-Talk Among Beta-Amyloid Peptides, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Lipid Rafts*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 309.
9. Kosicek, M. and S. Hecimovic, *Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(1): p. 1310-22.
10. Oshima, N., et al., *Accumulation of amyloid beta-protein in the low-density membrane domain accurately reflects the extent of beta-amyloid deposition in the brain*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 2209-18.
11. Choi, J., et al., *Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids*. Mol Cell Biochem, 2018. **442**(1-2): p. 187-201.
12. Farooqui, A.A., L. Liss, and L.A. Horrocks, *Neurochemical aspects of Alzheimer's disease: involvement of membrane phospholipids*. Metab Brain Dis, 1988. **3**(1): p. 19-35.
13. Nitsch, R.M., et al., *Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1671-5.
14. Guan, Z., et al., *Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(7): p. 740-7.
15. Mulder, C., et al., *Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2003. **110**(8): p. 949-55.
16. Glabe, C., *Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 2001. **17**(2): p. 137-45.
17. Del Mar Martinez-Senac, M., J. Villalain, and J.C. Gomez-Fernandez, *Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles*. Eur J Biochem, 1999. **265**(2): p. 744-53.

18. Vander Zanden, C.M., et al., *Fibrillar and Nonfibrillar Amyloid Beta Structures Drive Two Modes of Membrane-Mediated Toxicity*. Langmuir, 2019. **35**(48): p. 16024-16036.
19. Thakur, G., M. Micic, and R.M. Leblanc, *Surface chemistry of Alzheimer's disease: a Langmuir monolayer approach*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009. **74**(2): p. 436-56.
20. Ambroggio, E.E., et al., *Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide*. Biophys J, 2005. **88**(4): p. 2706-13.
21. Caruso, B., et al., *The rheological properties of beta amyloid Langmuir monolayers: Comparative studies with melittin peptide*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016. **146**: p. 180-7.
22. Benarouche, A., et al., *Interfacial Properties of NTAIL, an Intrinsically Disordered Protein*. Biophys J, 2017. **113**(12): p. 2723-2735.
23. Fidelio, G.D.M., B.; Cumar, F. A. , *Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers*. Chem Phys Lipids 1984. **35**: p. 231.
24. Mathieu, C., R.V. Pappu, and J.P. Taylor, *Beyond aggregation: Pathological phase transitions in neurodegenerative disease*. Science, 2020. **370**(6512): p. 56-60.
25. Butterfield, S.M. and H.A. Lashuel, *Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(33): p. 5628-54.
26. Goni, F.M., *The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the Singer-Nicolson model*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(6): p. 1467-76.
27. Morales, A., et al., *Sphingolipids and cell death*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 923-39.
28. Alvarez, A.B., et al., *Abeta-Amyloid Fibrils Are Self-Triggered by the Interfacial Lipid Environment and Low Peptide Content*. Langmuir, 2020. **36**(28): p. 8056-8065.
29. Fidorra, M., et al., *Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol*. Biophys J, 2006. **90**(12): p. 4437-51.
30. Sipione, S., et al., *Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications*. Front Neurosci, 2020. **14**: p. 572965.
31. Fidelio G.D, B.M., F.A. Cumar, , *Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures*. BBA, 1986. **854** p. 231–239.
32. Maggio, B., F.A. Cumar, and R. Caputto, *Surface behaviour of gangliosides and related glycosphingolipids*. Biochem J, 1978. **171**(3): p. 559-65.
33. Maggio, B., et al., *Molecular interactions and thermotropic behavior of glycosphingolipids in model membrane systems*. Chem Phys Lipids, 1986. **42**(1-3): p. 49-63.
34. Maggio, B., et al., *Thermotropic behavior of glycosphingolipids in aqueous dispersions*. Biochemistry, 1985. **24**(5): p. 1084-92.
35. T., F., *Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins glycolipids are onco-developmental antigens*. Nature 1985. **314**: p. 53–57.
36. E. Bertoli, M.M., S. Sonnino, R. Ghidoni, B. Cestaro, G. Tettamanti, , *Electron paramagnetic resonance studies on the fluidity and surface dynamics of egg phosphatidylcholine vesicles containing gangliosides*. Biochim. Biophys. Acta 1981. **647**: p. 196–202.

37. Sonnino, S., et al., *Gangliosides as components of lipid membrane domains*. *Glycobiology*, 2007. **17**(1): p. 1R-13R.
38. Maggio, B., et al., *Neurochemical and model membrane studies in demyelinating diseases*. *Acta Neuropathol Suppl*, 1983. **9**: p. 71-85.
39. Maggio, B., et al., *Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: an assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(12): p. 1922-44.
40. Maggio, B., J.M. Sturtevant, and R.K. Yu, *Effect of myelin basic protein on the thermotropic behavior of aqueous dispersions of neutral and anionic glycosphingolipids and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(6): p. 2652-9.
41. Tettamanti, G., et al., *Gangliosides, neuraminidase and sialyltransferase at the nerve endings*. *Adv Exp Med Biol*, 1980. **125**: p. 263-81.
42. Masserini, M. and E. Freire, *Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length*. *Biochemistry*, 1986. **25**(5): p. 1043-9.
43. Masserini, M., P. Palestini, and E. Freire, *Influence of glycolipid oligosaccharide and long-chain base composition on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles containing gangliosides*. *Biochemistry*, 1989. **28**(12): p. 5029-34.
44. Benilova, I., E. Karran, and B. De Strooper, *The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(3): p. 349-57.
45. Portelius, E., et al., *Distinct cerebrospinal fluid amyloid beta peptide signatures in sporadic and PSEN1 A43E-associated familial Alzheimer's disease*. *Mol Neurodegener*, 2010. **5**: p. 2.
46. Wiltfang, J., et al., *Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation*. *J Neurochem*, 2002. **81**(3): p. 481-96.
47. Maler, J.M., et al., *Urea-based two-dimensional electrophoresis of beta-amyloid peptides in human plasma: evidence for novel Abeta species*. *Proteomics*, 2007. **7**(20): p. 3815-20.
48. Quartey, M.O., et al., *The Abeta(1-38) peptide is a negative regulator of the Abeta(1-42) peptide implicated in Alzheimer disease progression*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 431.
49. Kakuda, N., et al., *Distinct deposition of amyloid-beta species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry*. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. **5**(1): p. 73.
50. Reinert, J., et al., *Abeta38 in the brains of patients with sporadic and familial Alzheimer's disease and transgenic mouse models*. *J Alzheimers Dis*, 2014. **39**(4): p. 871-81.
51. Yu, L., et al., *Association of Cortical beta-Amyloid Protein in the Absence of Insoluble Deposits With Alzheimer Disease*. *JAMA Neurol*, 2019. **76**(7): p. 818-826.
52. Zhang, M., J. Zhao, and J. Zheng, *Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides*. *Soft Matter*, 2014. **10**(38): p. 7425-51.

53. Sayegh, R.S., et al., *Longipin: An Amyloid Antimicrobial Peptide from the Harvestman Acutisoma longipes (Arachnida: Opiliones) with Preferential Affinity for Anionic Vesicles*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167953.
54. Caillon, L., et al., *Biophysical investigation of the membrane-disrupting mechanism of the antimicrobial and amyloid-like peptide dermaseptin S9*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75528.
55. Kagan, B.L., et al., *Antimicrobial properties of amyloid peptides*. Mol Pharm, 2012. **9**(4): p. 708-17.
56. Jang, H., et al., *Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link*. Biophys J, 2011. **100**(7): p. 1775-83.
57. Dathe, M., et al., *Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes*. Biochemistry, 1996. **35**(38): p. 12612-22.
58. Hasper, H.E., et al., *An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1636-7.
59. Lee, J., et al., *Amyloid beta Ion Channels in a Membrane Comprising Brain Total Lipid Extracts*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(6): p. 1348-1357.
60. Dorosz, J., et al., *Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface*. Langmuir, 2009. **25**(21): p. 12501-6.
61. Lee, D.K., et al., *Lipid composition-dependent membrane fragmentation and pore-forming mechanisms of membrane disruption by pexiganan (MSI-78)*. Biochemistry, 2013. **52**(19): p. 3254-63.
62. M. Di Luca, G.M., G. Maisetta, G. Batoni, *BaAMPs: the database of biofilmactive antimicrobial peptides*. Biofouling, 2015. **31**: p. 193-199.
63. Wimley, W.C., *Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model* ACS Chem. Biol., 2010. **5**: p. 905–917.
64. Memariani, H.M., M.; Shahidi-Dadras, M.; Nasiri, S.; Akhavan, M.M.; Moravvej, H. , *Melittin: From honeybees to superbugs*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2019. **103**: p. 3265–3276.
65. Habermann, E., *Bee and Wasp Venoms*. Science 1972. **177**: p. 314.
66. Yang, L.H., T.A.; Weiss, T.M.; Ding, L.; Huang, H.W. , *Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores*. Biophys. J., 2001. **81**: p. 1475–1485.
67. Orsolich, N., *Bee venom in cancer therapy*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(1-2): p. 173-94.
68. Rady, I., et al., *Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy*. Cancer Lett, 2017. **402**: p. 16-31.
69. Yu, X., et al., *Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1110.
70. Soliman, C., et al., *The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer*. PLoS One, 2019. **14**(10): p. e0224028.
71. Zhou, J., et al., *Delivery Strategies for Melittin-Based Cancer Therapy*. ACS Appl Mater Interfaces, 2021. **13**(15): p. 17158-17173.
72. A.S. Ladokhin, S.H.W., *'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin*. Biochim. Biophys. Acta, 2001. **1514**: p. 253–260.
73. M.T. Lee, W.C.H., F.Y. Chen, H.W. Huang, , *Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2008. **105**: p. 5087–5092.

74. Huang, H.W., *Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model*. . Biochemistry, 2000. **39**: p. 8347–8352.
75. M. Gordon-Grossman, H.Z., S.G.Wolf, Y. Shai, D. Goldfarb, *Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron para-magnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy*. J. Phys. Chem. , 2012. **B 116**: p. 179–188.
76. A. Ramamoorthy, S.T., D.K. Lee, A. Tan, L. Maloy, , *Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin*. Biophys. J., 2006. **91**: p. 206–216.
77. Lee, M.-T.S., T.-L.; Hung, W.-C.; Huang, H.W. , *Process of inducing pores in membranes by melittin*. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013. **110**: p. 14243–14248.
78. Xiao, S.L., X.; Gou, L.; Li, J.; Ma, Y.; Liu, J.; Yang, K.; Yuan, B. , *Graphene oxide as antibacterial sensitizer: Mechanically disturbed cell membrane for enhanced poration efficiency of melittin*. Carbon, 2019. **149**: p. 248–256.
79. Chen, F.-Y.L., M.-T.; Huang, H.W. , *Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation*. Biophys. J. , 2003. **84**: p. 3751–3758.
80. Miyazaki, Y. and W. Shinoda, *Cooperative antimicrobial action of melittin on lipid membranes: A coarse-grained molecular dynamics study*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2022. **1864**(9): p. 183955.
81. Hu, Y.S., S.K.; Patel, S., *Investigating Hydrophilic Pores in Model Lipid Bilayers Using Molecular Simulations: Correlating Bilayer Properties with Pore-Formation Thermodynamics*. Langmuir, 2015. **31**: p. 6615–6631.
82. Dufourc, E.J.S., I.C.P.; Dufourcq, J., *Molecular details of melittin-induced lysis of phospholipid membranes as revealed by deuterium and phosphorus NMR*. . Biochemistry, 1986. **25**: p. 6448–6455.
83. Liu, J.X., S.; Li, J.; Yuan, B.; Yang, K.; Ma, Y. , *Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane*. Biochim. Biophys. Acta, 2018. **1860**: p. 2234–2241.
84. T.C. Anglin, K.L.B., John C. Conboy, *Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and Melittin*. Journal of Structural Biology, 2009. **168**: p. 37–52.
85. Gaines, G.L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. 1966.
86. Jones, M.N., *BIOLOGICAL INTERFACES: An Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems*. 1975.
87. McConnell, H.M., L.K. Tamm, and R.M. Weis, *Periodic structures in lipid monolayer phase transitions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(10): p. 3249-53.
88. Losche, M. and H. Mohwald, *Impurity controlled phase transitions of phospholipid monolayers*. Eur Biophys J, 1984. **11**(1): p. 35-42.
89. Damodaran, S., *Beyond the hydrophobic effect: Critical function of water at biological phase boundaries--A hypothesis*. Adv Colloid Interface Sci, 2015. **221**: p. 22-33.
90. Fidelio, G.D.M., B.; Cumar, F. A., *Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. Effect of the lipid physical state*. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1986. **862**: p. 49.
91. Milner, S.T.J., J. F.; Pincus, P. , *Buckling of Langmuir Monolayers*. Europhys. Lett., 1989. **9**: p. 495.

92. LeVine, H., 3rd, *Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution*. Protein Sci, 1993. **2**(3): p. 404-10.
93. Biancalana, M.K., S. , *Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**: p. 1405.
94. Ban, T.H., D.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Goto, Y. , *Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence*. J Biol Chem, 2003. **278** p. 16462.
95. Sparr, E. and S. Linse, *Lipid-protein interactions in amyloid formation*. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2019. **1867**(5): p. 455-457.
96. Schladitz, C., et al., *Amyloid-beta-sheet formation at the air-water interface*. Biophys J, 1999. **77**(6): p. 3305-10.
97. Maltseva, E. and G. Brezesinski, *Adsorption of amyloid beta (1-40) peptide to phosphatidylethanolamine monolayers*. Chemphyschem, 2004. **5**(8): p. 1185-90.
98. Chi, E.Y., et al., *Amyloid-beta fibrillogenesis seeded by interface-induced peptide misfolding and self-assembly*. Biophys J, 2010. **98**(10): p. 2299-308.
99. Jiang, D., et al., *A kinetic model for beta-amyloid adsorption at the air/solution interface and its implication to the beta-amyloid aggregation process*. J Phys Chem B, 2009. **113**(10): p. 3160-8.
100. Jiang, D., et al., *Aggregation pathways of the amyloid beta(1-42) peptide depend on its colloidal stability and ordered beta-sheet stacking*. Langmuir, 2012. **28**(35): p. 12711-21.
101. Ambroggio, E.E. and G.D. Fidelio, *Lipid-like behavior of signal sequence peptides at air-water interface*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(2): p. 708-14.
102. Pressl, K.J., K.; Laggner, P. , *Characterization of the sub-main-transition in distearoylphosphatidylcholine studied by simultaneous small- and wide-angle X-ray diffraction*. Biochim Biophys Acta 1997. **1325**: p. 1-7.
103. Prenner, E.H., G.; Honig, D.; Mobius, D.; Lohner, K. , *Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers*. Chem Phys Lipids 2007. **145**: p. 106-118.
104. Brewer, J., et al., *Multiphoton excitation fluorescence microscopy in planar membrane systems*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(7): p. 1301-8.
105. Morinaga, A., et al., *Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of Abeta amyloid fibrils at low concentrations of Abeta monomers*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(4): p. 986-95.
106. Campioni, S., et al., *The presence of an air-water interface affects formation and elongation of alpha-Synuclein fibrils*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(7): p. 2866-75.
107. Terzi, E., G. Holzemann, and J. Seelig, *Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes*. Biochemistry, 1997. **36**(48): p. 14845-52.
108. Fischer, H.P., I.; Craievich, A. F. , *Average protein density is a molecular-weight-dependent function*. Protein Sci, 2009. **13**: p. 2825-2828.
109. Domanov, Y.A. and P.K. Kinnunen, *Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers*. J Mol Biol, 2008. **376**(1): p. 42-54.

110. Hellstrand, E.G., M.; Ainalem, M.-L.; Ankner, J.; Forsyth, V. T.; Fragneto, G.; Haertlein, M.; Dauvergne, M.-T.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Linse, S.; Nylander, T.; Sparr, E., *Adsorption of alphasynuclein to supported lipid bilayers: positioning and role of electrostatics*. ACS Chem. Neurosci. , 2013. **4**: p. 1339–1351.
111. Ahyayauch, H.R., M.; Busto, J. V.; Andraka, N.; Arrondo, J.-L. R.; Masserini, M.; Tvaroska, I.; Goñi, F. M. , *Binding of betaamyloid (1-42) peptide to negatively charged phospholipid membranes in the liquid-ordered state: modeling and experimental studies*. Biophys. J., 2012. **103**: p. 453–463.
112. Kaya, I., et al., *Novel Trimodal MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS3) at 10 mum Reveals Spatial Lipid and Peptide Correlates Implicated in Abeta Plaque Pathology in Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(12): p. 2778-2790.
113. Gallea, J.I., et al., *Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological Nalpha-acetylated alpha-synuclein*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1864**(5): p. 501-10.
114. Yatvin, M.B., et al., *Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia*. Science, 1978. **202**(4374): p. 1290-3.
115. Pusterla, J.M., et al., *Refractive index and thickness determination in Langmuir monolayers of myelin lipids*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017. **1859**(5): p. 924-930.
116. Groenning, M., *Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status*. J Chem Biol, 2010. **3**(1): p. 1-18.
117. Arad, E., et al., *Revisiting thioflavin T (ThT) fluorescence as a marker of protein fibrillation - The prominent role of electrostatic interactions*. J Colloid Interface Sci, 2020. **573**: p. 87-95.
118. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic force microscope*. Phys Rev Lett, 1986. **56**(9): p. 930-933.
119. Bagatolli, L.A., et al., *Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1325**(1): p. 80-90.
120. Bagatolli, L.A., E. Gratton, and G.D. Fidelio, *Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence*. Biophys J, 1998. **75**(1): p. 331-41.
121. Bagatolli L.A, G.G.M., M. Ravera, J.D. Perez, F. G.D.,, *Fatty acid-indole fluorescent derivatives as probes to measure the polarity of interfaces containing gangliosides*. EMBO Mol. Med., 1995. **78** p. 193–202.
122. Roefzaad, M., T. Kluner, and I. Brand, *Orientation of the GM1 ganglioside in Langmuir-Blodgett monolayers: a PM IRRAS and computational study*. Phys Chem Chem Phys, 2009. **11**(43): p. 10140-51.
123. Scriven L.E, S.C.V., *The Marangoni effects*. Nature, 1960. **187** p. 186–188.
124. Krausser, J., T.P.J. Knowles, and A. Saric, *Physical mechanisms of amyloid nucleation on fluid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(52): p. 33090-33098.
125. Yanagisawa, K., et al., *GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease*. Nat Med, 1995. **1**(10): p. 1062-6.
126. Emory, C.R., T.A. Ala, and W.H. Frey, 2nd, *Ganglioside monoclonal antibody (A2B5) labels Alzheimer's neurofibrillary tangles*. Neurology, 1987. **37**(5): p. 768-72.
127. Fricke, N. and R. Dimova, *GM1 Softens POPC Membranes and Induces the Formation of Micron-Sized Domains*. Biophys J, 2016. **111**(9): p. 1935-1945.

128. Goins, B., et al., *Lateral diffusion of ganglioside GM1 in phospholipid bilayer membranes*. Biophys J, 1986. **49**(4): p. 849-56.
129. Fantini, J. and N. Yahi, *Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of alpha-synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion*. J Mol Biol, 2011. **408**(4): p. 654-69.
130. Ueno, H., et al., *Comparison between the aggregation of human and rodent amyloid beta-proteins in GM1 ganglioside clusters*. Biochemistry, 2014. **53**(48): p. 7523-30.
131. Di Scala, C., et al., *Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's beta-amyloid peptide and alpha-synuclein*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28781.
132. Ikeda, K. and K. Matsuzaki, *Driving force of binding of amyloid beta-protein to lipid bilayers*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(3): p. 525-9.
133. Stewart, K.L. and S.E. Radford, *Amyloid plaques beyond Abeta: a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation*. Biophys Rev, 2017. **9**(4): p. 405-419.
134. Maggio, B., F.A. Cumar, and R. Caputto, *Interactions of gangliosides with phospholipids and glycosphingolipids in mixed monolayers*. Biochem J, 1978. **175**(3): p. 1113-8.
135. Martins, I.C., et al., *Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 224-33.
136. D. Mrdenovic, Z.S., W. Kutner, J. Lipkowski, P. Pieta, , *Alzheimer's disease-related amyloid β peptide causes structural disordering of lipids and changes the electric properties of a floating bilayer lipid membrane*. Nanoscale Adv, 2020. **2** p. 3467–3480.
137. Correa, S.G., et al., *Anti-inflammatory effect of gangliosides in the rat hindpaw edema test*. Eur J Pharmacol, 1991. **199**(1): p. 93-8.
138. M. Amico-Roxas, A.C., V.M. Cutuli, U. Scapagnini, A. Morandi, *Antiinflammatory action of AGF44, a ganglioside ester derivative*. Drugs Exp. Clin. Res., 1992. **18** p. 251–259.
139. Tubaro, E., et al., *Effect of a new de-N-acetyl-lysoglycosphingolipid on chemically-induced inflammatory bowel disease: possible mechanism of action*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1993. **348**(6): p. 670-8.
140. Yanguas-Casas, N., et al., *Neurostatin and other O-acetylated gangliosides show anti-neuroinflammatory activity involving the NFkappaB pathway*. Toxicol Appl Pharmacol, 2019. **377**: p. 114627.
141. Alvarez, A.B., P.E.A. Rodriguez, and G.D. Fidelio, *Gangliosides smelt nanostructured amyloid Abeta(1-40) fibrils in a membrane lipid environment*. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2022. **1864**(1): p. 183749.
142. Ambroggio E. E, B.C., Marcos A. Villarrealb, Vincent Raussens, Gerardo D. Fidelio, *Reversing the peptide sequence impacts on molecular surfacebehaviour*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2016. **139**: p. 25–32.
143. Alvarez, A.B., et al., *Stitching together a nm thick peptide-based semiconductor sheet using UV light*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021. **203**: p. 111734.
144. Matsumura, N., et al., *gamma-Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of beta-carboxyl-terminal fragment*. J Biol Chem, 2014. **289**(8): p. 5109-21.
145. Bansal, S., et al., *C-Terminal Fragment, Abeta32-37, Analogues Protect Against Abeta Aggregation-Induced Toxicity*. ACS Chem Neurosci, 2016. **7**(5): p. 615-23.

146. Reinert, J., et al., *Deposition of C-terminally truncated Abeta species Abeta37 and Abeta39 in Alzheimer's disease and transgenic mouse models*. Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**: p. 24.
147. Ramamoorthy, A., et al., *Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin*. Biophys J, 2006. **91**(1): p. 206-16.
148. Gaines, G.L., *In Interscience monographs on physical chemistry*. 1966.
149. M. Sharon, Z.O., Y. Shai, J. Anglister, *2D-NMR and ATR-FTIR study of the structure of a cell-selective diastereomer of melittin and its orientation in phospholipids*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 15305-15316.
150. Ishiguro, R., N. Kimura, and S. Takahashi, *Orientation of fusion-active synthetic peptides in phospholipid bilayers: determination by Fourier transform infrared spectroscopy*. Biochemistry, 1993. **32**(37): p. 9792-7.
151. Lewis, R.N. and R.N. McElhaney, *Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes: practical considerations*. Methods Mol Biol, 2007. **400**: p. 207-26.
152. Naiki, H., et al., *Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1*. Anal Biochem, 1989. **177**(2): p. 244-9.
153. III, H.L., *Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease betaamyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution*. Protein Sci, 1993. **2**: p. 404-410.
154. Ambroggio, E.E., et al., *Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein*. Biophys J, 2005. **89**(3): p. 1874-81.
155. S. Galdiero, A.F., R. Berisio, P. Grieco, G. Morelli, M. Galdiero, *Antimicrobial peptides as an opportunity against bacterial diseases*. Curr Med Chem, 2015. **22**: p. 1665-1677.
156. T.C. Anglin, K.L.B., John C. Conboy. , *Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and Melittin*. Journal of Structural Biology, 2009. **168**: p. 37-52.
157. Wan-Chen Lin, C.D.B., Timothy V. Ratto and Marjorie L. Longo. , *Lipid Asymmetry in DLPC/DSPC-Supported Lipid Bilayers: A Combined AFM and Fluorescence Microscopy Study*. Biophysical Journal Volume, 2006. **90**: p. 228-237.
158. Kuchinka, E. and J. Seelig, *Interaction of melittin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation*. Biochemistry, 1989. **28**(10): p. 4216-21.
159. Wiedman, G., et al., *The electrical response of bilayers to the bee venom toxin melittin: evidence for transient bilayer permeabilization*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(5): p. 1357-64.
160. Dufrechou, M., et al., *Stability of white wine proteins: combined effect of pH, ionic strength, and temperature on their aggregation*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(5): p. 1308-19.
161. Otzen, D.E., *Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature*. Biophys J, 2002. **83**(4): p. 2219-30.
162. Williams, E.C., et al., *Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding*. J Biol Chem, 1982. **257**(24): p. 14973-8.

163. Benecky, M.J., et al., *Ionic-strength- and pH-dependent conformational states of human plasma fibronectin*. *Biochemistry*, 1991. **30**(17): p. 4298-306.
164. Pachetti, M., et al., *FTIR Spectroscopy to Reveal Lipid and Protein Changes Induced on Sperm by Capacitation: Bases for an Improvement of Sample Selection in ART*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(22).
165. Ruyschaert, J.M. and V. Raussens, *ATR-FTIR Analysis of Amyloid Proteins*. *Methods Mol Biol*, 2018. **1777**: p. 69-81.
166. Zandomenighi, G., et al., *FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils*. *Protein Sci*, 2004. **13**(12): p. 3314-21.
167. Toyran, N., B. Turan, and F. Severcan, *Selenium alters the lipid content and protein profile of rat heart: an FTIR microspectroscopic study*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **458**(2): p. 184-93.
168. Toyran, N., et al., *Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study*. *Biochem J*, 2006. **397**(3): p. 427-36.
169. Cakmak, G., I. Togan, and F. Severcan, *17Beta-estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: a comparative study with nonylphenol*. *Aquat Toxicol*, 2006. **77**(1): p. 53-63.
170. Bagatolli, L.A., et al., *Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation in bilayers*. *Methods Enzymol*, 2003. **360**: p. 481-500.
171. Bagatolli, L.A., et al., *A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties*. *Photochem Photobiol*, 1999. **70**(4): p. 557-64.
172. Bagatolli, L.A., *To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1758**(10): p. 1541-56.
173. Tanimura, N., et al., *Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(1): p. 125-35.
174. Sezgin, E., et al., *The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. **18**(6): p. 361-374.
175. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. *Science*, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
176. Wang, H., et al., *Active Probes for Imaging Membrane Dynamics of Live Cells with High Spatial and Temporal Resolution over Extended Time Scales and Areas*. *J Am Chem Soc*, 2018. **140**(10): p. 3505-3509.
177. Stone, M.B., S.A. Shelby, and S.L. Veatch, *Super-Resolution Microscopy: Shedding Light on the Cellular Plasma Membrane*. *Chem Rev*, 2017. **117**(11): p. 7457-7477.
178. Amaro, M., et al., *Laurdan and Di-4-ANEPPDHQ probe different properties of the membrane*. *J Phys D Appl Phys*, 2017. **50**(13): p. 134004.
179. Zhang, Y.L., J.A. Frangos, and M. Chachisvilis, *Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **347**(3): p. 838-41.
180. Karpenko, I.A., et al., *Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as bright far-red probes for background-free bioimaging*. *J Am Chem Soc*, 2015. **137**(1): p. 405-12.
181. Kucherak, O.A., et al., *Switchable Nile red-based probe for cholesterol and lipid order at the outer leaflet of biomembranes*. *J Am Chem Soc*, 2010. **132**(13): p. 4907-16.

182. Owen, D.M., et al., *Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms*. Nat Protoc, 2011. **7**(1): p. 24-35.
183. Bagatolli, L.A., *LAURDAN Fluorescence Properties in Membranes: A Journey from the Fluorometer to the Microscope*, in *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Y. Mély and G. Duportail, Editors. 2012, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 3-35.
184. Spink CH, Y.M., Feigenson GW. , *Partitioning behavior of indocarbocyanine probes between coexisting gel and fluid phase model membranes*. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1990. **1023**: p. 25-33.
185. Baumgart, T., et al., *Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(9): p. 2182-94.
186. Bartlett, P. and A.I. Campbell, *Three-dimensional binary superlattices of oppositely charged colloids*. Phys Rev Lett, 2005. **95**(12): p. 128302.
187. *Single Molecules as Probes of Lipid Membrane Microenvironments*. J. Phys. Chem. B 1999. **103**: p. 10214-10220.
188. Hofstetter, S., et al., *Use of the fluorescent probe LAURDAN to label and measure inner membrane fluidity of endospores of Clostridium spp.* J Microbiol Methods, 2012. **91**(1): p. 93-100.
189. Danylchuk, D.I., et al., *Redesigning Solvatochromic Probe Laurdan for Imaging Lipid Order Selectively in Cell Plasma Membranes*. Anal Chem, 2020. **92**(21): p. 14798-14805.
190. Axelrod, D., *Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization*. Biophys J, 1979. **26**(3): p. 557-73.
191. Klausner RD, W.D., *Selectivity of Fluorescent Lipid Analogues for Lipid Domains*. Biochemistry, 1980. **19**: p. 6199 – 6203.
192. Inostroza-Brito, K.E., et al., *Co-assembly, spatiotemporal control and morphogenesis of a hybrid protein-peptide system*. Nat Chem, 2015. **7**(11): p. 897-904.



Melittin-solid phospholipid mixed films trigger amyloid-like nano-fibril arrangements at air-water interface

Alain Bolaño Alvarez^{a,b,1}, Benjamín Caruso^{c,d,1}, Steffen B. Petersen^e, Pablo E.A. Rodríguez^f, Gerardo D. Fidelio^{a,b,*}

^a Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^b Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^c Cátedra de Química Biológica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^d Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT), CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

^e Department of Dermatology, Aalborg University Hospital, Denmark

^f Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

Melittin-lipid interaction
Melittin-amyloid formation
Interfacial amyloid facilitators
Lipid as inducer of amyloids

ABSTRACT

We used the Langmuir monolayers technique to study the surface properties of melittin toxin mixed with either liquid-condensed DSPC or liquid-expanded POPC phospholipids. Pure melittin peptide forms stable insoluble monolayers at the air-water interface without interacting with Thioflavin T (Th-T), a sensitive probe to detect protein amyloid formation. When melittin peptide is mixed with DSPC lipid at 50 % of peptide area proportion at the surface, we observed the formation of fibril-like structures detected by Brewster angle microscopy (BAM), but they were not observable with POPC. The nano-structures in the melittin-DSPC mixtures became Th-T positive labeling when the arrangement was observed with fluorescence microscopy. In this condition, Th-T undergoes an unexpected shift in the typical emission wavelength of this amyloid marker when a 2D fluorescence analysis is conducted.

Even when reflectivity analysis of BAM imaging evidenced that these structures would correspond to the DSPC lipid component of the mixture, the interpretation of ATR-FTIR and Th-T data suggested that both components were involved in a new lipid-peptide rearrangement. These nano-fibril arrangements were also evidenced by scanning electron and atomic force microscopy when the films were transferred to a mica support. The fibril formation was not detected when melittin was mixed with the liquid-expanded POPC lipid. We postulated that DSPC lipids can dynamically trigger the process of amyloid-like nano-arrangement formation at the interface. This process is favored by the relative peptide content, the quality of the interfacial environment, and the physical state of the lipid at the surface.

1. Introduction

Certain amphipathic and cationic peptides such as dermaseptin S9, longipin, and protegrin-1, an antimicrobial peptide (AMP) from human leukocytes, resemble some human amyloid proteins when they are assembled into ordered fibers. This could suggest that human amyloids have a physiological role beyond the pathological agents, which includes a specific disrupting effect on the neuron membrane [1–3].

Consequently, the antimicrobial or toxic activity of amyloid peptides has been studied [4], showing a connection between antimicrobial and amyloid formation, and revealing the existence of a new class of membrane bioactive peptides. These peptides can acquire β -sheet conformation upon binding to membranes according to FT-IR spectrum and are labeled with Thioflavin-T (Th-T) in binding assays [2,5]. On the other hand, other researchers claim that the phase separation based on a specific lipid-peptide interaction [6,7] could assemble into small

Abbreviations: AMP, Antimicrobial Peptide; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine; DSPC, 1,2-distearoyl-phosphatidylcholine; SPH, porcine brain sphingomyelin; PAP, percentage of Peptide Area Proportion (the percentage of peptide covered surface with respect to lipid in the lipid:peptide mixed surface); Th-T, Thioflavin T.

* Corresponding author at: Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

E-mail address: gdfidelio@unc.edu.ar (G.D. Fidelio).

¹ Equal contribution authors.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.184048>

Received 14 March 2022; Received in revised form 22 August 2022; Accepted 6 September 2022

Available online 15 September 2022

0005-2736/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

oligomers to trigger channel formation at the membrane (postulated for Alzheimer amyloid peptides [8]), as it has been observed with protegrin-1 when using AFM and molecular dynamics simulation [5]. Thus, studies of the specific interfacial conditions in the lipid-protein interaction that lead to an oligomerization-fibrillation process emerge as important. However, the published data are divergent. Some researchers claim that the dependence of negatively charged and unsaturated phospholipids (POPG) as it occurs with PrP prion protein using lipid monolayers as membrane model system [9]. However, according to Caillon et al. [3], dermaseptin S9 inserts more efficiently in POPC than POPG lipid monolayers, justifying that the anionic interface does not determine the peptide specificity. Thus, the main idea is to try to find some connection between the mechanism of action of the amyloidogenic proteins when compared with the antimicrobial peptides, clarifying that both peptides are able to kill cells through a specific lipid-peptide interaction. Even though the binding of the peptide may be dissociated from membrane leakage, and the damage may depend on a particular lipid mixture [10], this indicates that an adequate conjunction of interfacial properties must be conjugated for membrane damage to occur.

One of most extensively studied membrane active bioactive peptide is melittin, which is cationic and amphipathic with a broad-spectrum action against both Gram-negative and Gram-positive bacteria [11]. Melittin was discovered in the 1970s as an important component of the bee venom (also named api-toxin) found in the European *Apis mellifera* honeybee [12,13]. This 26-residue peptide has a linear structure with the sequence: Gly¹-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln²⁶-NH₂ with a net charge of 6+ at physiological pH [11,14]. Melittin has two α -helix parts connected by one non α -helix link domain at Pro¹⁴ with hydrophobic and hydrophilic residues close to its N-terminus and C-terminus region, respectively [12]. The cytotoxic effect of melittin was also explored as a potential agent against certain cancers, as recently pointed out by several authors [15–17], with a rapid effect due to its direct membrane damage on cell culture [18]. The unspecific and broad lytic effect of melittin on cells becomes the main obstacle to its systemic use, therefore, the design of efficient strategies of peptide delivery systems becomes imperative [19].

However, the melittin membrane-damage mechanism is still controversial. While some authors assert peptide pore formation, others postulate a cell membrane disruption through detergent-like action [20,21]. The little understanding of the mechanism of the melittin interaction with cell membranes is probably due to its small size and the possibility of oligomerization and the formation of different cooperative lipid-peptide complexes at the interface, the lipid composition of the membrane [14,22], diverse experimental factors such as temperature, ionic strength, bulk peptide concentration, among others [21,23,24]. Last but not least, the peptide/lipid ratio employed is also an important variable to consider. In the two-step mechanism proposed for membrane insertion (from an isotropic soluble state to a more organized membrane-inserted damaging state), the transition takes place when the peptide to lipid ratio reaches a threshold value [25,26], and this threshold is sensitive to the lipid composition [27]. In this regard, by using coarse-grained molecular dynamics, it was postulated that the system may adopt different modes of lipid-peptide arrangement, depending on the lipid-(POPC)/melittin ratio. Particularly, at a high melittin/lipid ratio, a “lipid extraction effect” was postulated with a micellar 3D rearrangement [28].

Additionally, the physical state of the lipid may also affect both the peptide interaction in the membrane [29] and the lipid arrangement [30,31]. A computational study using different lipids from a more liquid state to a more condensed state, such as DHPC, DLPC, DPPC, and DSPC, showed a higher strengthened bending rigidity for DSPC lipid interacting with melittin [29]. In this way, a significant reduction in the free energy barrier for lipid transmembrane diffusion (flip-flop) in the DSPC lipid induced by the presence of melittin was reported. These authors

proposed an association of the polar lipid head group with the hydrophilic peptide residues, facilitating the insertion into one leaflet of the bilayer to the other, resulting in a decrease in the membrane thickness induced by the lipid flip-flop process, and further favoring the peptide insertion [32].

In this work, we intend to demonstrate that the lipid phase states (liquid-condensed vs. liquid-expanded) are strongly determinant in inducing ordered peptide fibrillation of the melittin toxin. We reported a complete study of the mixing behavior of melittin film with two zwitterionic phospholipids differing in their physical state at room temperature: DSPC (liquid condensed) and POPC (liquid expanded), respectively. The formed fibril-like structures showed ThT positive behavior, giving a structural arrangement similar to amyloid peptides. We used a subphase of NaCl 145 mM, an ionic strength equivalent to a physiological condition and a stable room temperature (23 °C) to form fibril-like structures at the air-water interface. Hence, no strong environmental or chemical conditions were necessary to induce fibrils at the interface. These structures were induced by melittin peptide in DSPC lipid at a 50:50 of Percentage of Peptide Area Proportion (PAP) of lipid: melittin mixed film. It is important to mention that the percentage of PAP relative to the lipid covered surface is more important than mole fractions when the film-forming molecules have dissimilar individual molecular areas [33]. PAP can be calculated according to: $PAP = 100 ((nP AP) / (nL AL + nP AP))$, where nP and nL are the moles of melittin and lipid in the mixture, and AP and AL are the individual surface molecular areas of peptide and lipid, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Melittin was purchased from Sigma Chem., Co. (St. Louis, MO, USA) and further purified as previously described [33]. Subphase was NaCl 145 mM. Water was obtained from a MilliQ system (Millipore, USA) with a conductivity $<0.085 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and a surface tension of 72 mN·m⁻¹. NaCl from Merck (Gottingen, Germany) was roasted in an appropriate oven at 400–450 °C for at least 4 h to eliminate small volatile amounts of surfactant impurities. DSPC (1,2 stearyl- phosphatidylcholine), POPC (1-pamitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine), and sphingomyelin from porcine brain were purchased from Avanti Polar Lipids, USA. DMSO and Chloroform were from Merck, Göttingen, Germany.

2.2. π -Area isotherms and film balance setting

Langmuir-film experiments were performed essentially as previously described [34,35]. Temperature was set at 23 ± 0.5 °C with the help of a continuously working individual roof-top air conditioner. Subphase was unbuffered NaCl 145 mM, pH 5.6. The Teflon trough has a volume of 180 ml, and it was thermostated with a circulating Haake bath. Melittin and lipids (DSPC, POPC, and SPH) were dissolved in pure DMSO or pure chloroform, respectively, into stock solutions of about 10 mM. Individual diluted daily working solutions were freshly prepared to ~1 mM. For mixed monolayers, peptide and lipid were premixed from their respective individual solvent solutions at the desired proportion just before the spread of 15–30 μl of the mixture onto the subphase interface. Surface pressure was determined with a Pt plate using the Wilhelmy method. The continuous compression was achieved through an automatic, simultaneous, and symmetric movement of both barriers that confined the film. The total film area was continuously recorded using the software provided by KSV Instruments® Ltd. The usual compression rate used was adjusted to $10 \text{ mm}^2\cdot\text{min}^{-1}$, lower barrier speeds were also checked without altering the results. The surface potential was measured with a vibrating plate coupled to a reference electrode.

2.3. Brewster angle microscopy

Monolayers were spread as described above and directly observed along the π -Area isotherm using a Brewster Angle Microscope (BAM), coupled to an EP3 Imaging Ellipsometer equipment (Accurion, Göttingen, Germany) with a 20x objective (Nikon, Japan, NA 0.35), see ref. [35]. For each imaging acquisition, the monolayer was compressed by forward compression steps of $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Three to five images were sequentially taken at each surface pressure, in order to have pictures of different regions of the monolayer. Some of results obtained with BAM were compared with the images obtained using Atomic Force Microscopy (AFM) and Fluorescence Microscopy (FM).

2.4. Transferred films for atomic force, scanning electron and fluorescence microscopy

Compressed monolayers up to the desired surface pressure were transferred to a mica support (10 mm diameter and 0.15–0.21 mm thickness Nano-Tec V-1 grade Muscovite from Innovative Microscopy Suppliers, Argentina). The mica face was rinsed with distilled water before the transfer. The film was then transferred to the support by dipping the mica, perpendicularly oriented to the previously submerged trough, at the lowest speed ($1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$), while keeping the surface pressure constant with the surface barostat coupled to the barriers of the trough. Prior to the transfer, the monolayer was allowed to stabilize for ~ 2 min. The monolayer of pure components and their mixtures were first compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ before being transferred to the mica support.

The fibril-like structures were visualized using Fluorescence Microscopy (FM) by adding a drop of freshly prepared solution of $20 \mu\text{M}$ Th-T probe dissolved in pure water to the monolayer transferred to the mica support and letting it dry for 5 min. Excitation wavelength was selected with a 480 nm cut off filter and the emission was taken at 535 nm. Negative controls were done: pure Th-T (transferring a clean interface), pure lipids, and pure melittin peptide were subjected to the same procedure (Fig. S1). As a positive control, we used preformed α -synuclein fibrils prepared in bulk condition according to Gallea and co-workers [36] and treated with Th-T solution, using the mica support (Fig. 5). Images were acquired with an Axioplan Carl Zeiss (Germany) fluorescence microscope equipped with an Olympus video camera (USA) (see Fig. S1). Similar results were obtained using a FV1000 confocal microscope (Fig. 5C), where the excitation wavelength selected was 405 nm and emission wavelengths were selected with filters at ~ 466 nm, ~ 478 nm, and ~ 505 nm. We used $20\times$ and $40\times$ objectives. The 2D fluorescence analysis was done using a Horiba NanoLog fluorimeter. For these experiments, the films transferred on the mica support were placed into a specific holder of the fluorimeter. Imaging processing and analysis were carried out using both Fiji and Pixinsight (v. 1.8.6) software. Both programs allowed us to use some filters and 2D fast Fourier transformed (FFT) to improve imaging resolution.

AFM measurements were performed on a multimode atomic force microscope SPM, Agilent Technology 5500, USA. We used the same mica support as described above. The microscope was used in contact-mode scanning to measure the transferred Langmuir monolayers of peptide/lipid mixed monolayers and their respective controls (pure lipids or pure melittin peptide). All the experiments were carried out at room temperature. Images of 512×512 pixels were collected at a scanning rate between 0.3 and $0.4 \text{ inch}\cdot\text{sec}^{-1}$. The height and error signals (vertical deflection), friction, and topography images were taken simultaneously. SEM measurements were made using a Carl Zeiss, Sigma model (from LAMARX facility, UNC-CONICET). All SEM samples were treated with Au metallized.

3. Results

3.1. Surface properties of melittin peptide in DSPC or POPC mixed films. π -area isotherms and BAM analysis

We can generate surface pressure (π -Area) isotherms by enclosing amphiphilic molecules that form insoluble monolayers between two mobile barriers at the surface in a Langmuir trough [37]. In the monolayer technique, the surface pressure is defined as $\pi = \gamma^0 - \gamma$, where γ^0 is the surface tension of pure saline water, and γ is the surface tension of the surface covered with the amphiphilic molecules. π depends on lateral packing, the amount of molecules spread, and the mixing behavior of the mixture at the interface [37–40].

In the present work, we studied the influence of melittin peptide proportion on the surface mixing behavior with two phospholipids differing in their physical states. DSPC has a liquid-condensed isotherm (Fig. 1A), whereas POPC has a typical liquid-expanded isotherm at air/NaCl 145 mM subphase (Fig. 1C). The following lipid:peptide percentages of Peptide Area Proportion (PAP) were used: 80:20, 50:50, and 20:80, calculated for both mixtures as indicated above. Pure melittin peptide, POPC, and DSPC lipids form insoluble monolayers at the air-water interface with a maximal lateral stability of around 20, 55, and $60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, respectively; and the molecular areas at maximal packing were of 2, 0.65 and $0.40 \text{ nm}^2\cdot\text{molecule}^{-1}$, respectively (Fig. 1A) [41]. BAM imaging of pure peptide or lipid monolayers was homogeneous with no observable domains or fibril-like structures (Fig. 1B). To further explore the influence of the physical state of the interface in promoting fibrils formation, we have conducted preliminary studies using sphingomyelin (SPH). SPH has similar liquid-condensed properties to DSPC [42], and, at the same melittin proportion, we observed that the sphingolipid was also able to induce Th-T positive fibril-like structures but in a rather complex manner with a hysteresis effect and surface pressure dependence (see Fig. S4). This particular behavior will be explored in a future report.

We referred to the PAP concept in previous studies [43]. In Langmuir monolayers, this concept is important since the individual surface molecular area of proteins shows a big difference when compared to lipids [33,41]. When melittin was mixed with POPC, the most liquid-expanded phospholipid, it did not form a fibril-like structure, regardless of PAP, which is compatible with a more fluid liquid-phase according to the BAM images (Fig. 1D). The miscibility of melittin with DSPC was partial and depended on the proportion of the peptide in the mixture. At a PAP below 50 %, the mixed film showed a completed lateral miscibility, whereas the mixture became immiscible at 50 % of PAP or greater, with the observable discontinuity in the collapse point corresponding to the value found for pure melittin (Fig. 1C and 2C).

Because the individual molecular area of melittin peptide is around $2 \text{ nm}^2\cdot\text{molec}^{-1}$ at $\sim 20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Fig. 1), which is greater than either pure POPC ($0.94 \text{ nm}^2\cdot\text{molec}^{-1}$) or DSPC ($0.52 \text{ nm}^2\cdot\text{molec}^{-1}$) at the same lateral pressure, the mixed isotherms moved towards a greater molecular area as the mole fraction of the melittin peptide increased in the mixture (Fig. 1A and C). However, with DSPC, we found a completely unexpected behavior. At 50 % of PAP in DSPC:melittin mixed films, we detected fibril-like and rounded domain structures (Fig. 1B, picture 3, corresponding to a peptide mole fraction of 0.17). Surprisingly, at this specific proportion, the observed structures were Th-T positive (Fig. 5) with a particular shift in the emission wavelength of this probe (see below). The above fibril-like structures tended to disappear as the melittin proportion was increased or decreased, but the rounded domains persisted at DSPC:melittin 20:80 of PAP.

Fig. 2 shows the mixing phase diagrams from the π -Area according to the profile of mixed isotherms, as previously reported for A β -amyloid [35]. The POPC:melittin mixed interfaces showed a miscibility behavior when the proportion of melittin was < 50 % of PAP, maintaining a slight decrease in the mean molecular area (Fig. 2C and D). However, a typical lateral immiscibility for the POPC:melittin behavior was observed with a

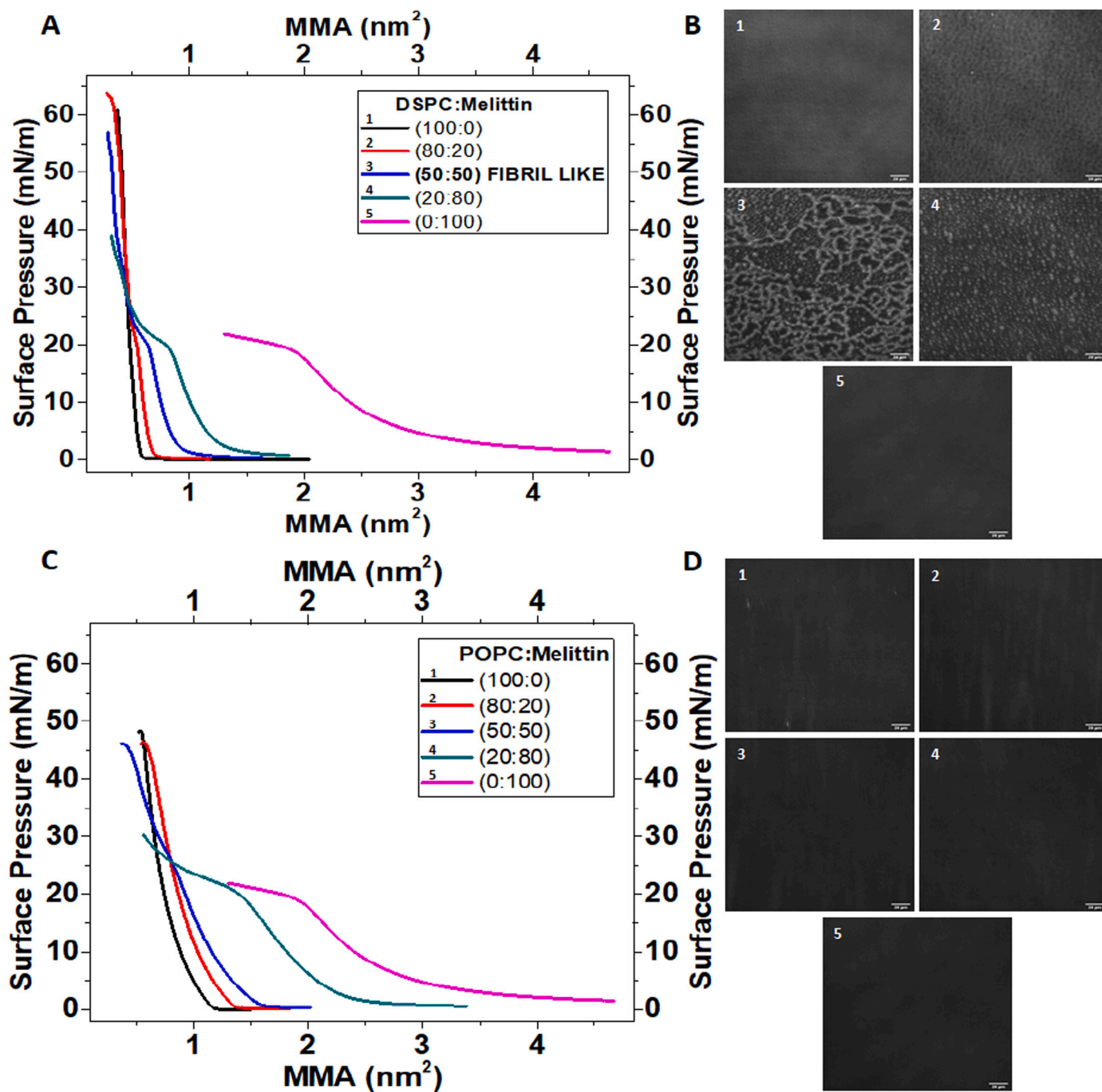


Fig. 1. Surface behavior of melittin peptide in mixing films with lipids. (A) π -Area isotherms for DSPC-melittin or (C) POPC-melittin mixtures and their respective BAM images (B) and (D) obtained between 15 and 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ in pure films or in the mixtures at the indicated PAP showed in the insert. The corresponding mole fractions for DSPC:melittin mixed films were 0.05, 0.17, 0.45, respectively. The corresponding mole fractions for POPC:Melittin mixed films were 0.12, 0.38, 0.65, respectively. The DSPC:melittin mixture at 50:50 of PAP showed fibril-like and rounded domain structures (picture B3), whereas at 20:80 of PAP, it showed only rounded domains, indicating a particular immiscibility behavior at this proportion (picture B4). The opposite behavior was observed for POPC:melittin mixtures at the same proportion. For sequential images taken at progressive surface pressure for both lipid:peptide mixtures, see Fig. S3.

first collapse point (first discontinuity point in the π -Area isotherm), regardless of the melittin content, at PAP > 50 %, compatible with the protein-enriched phase, and maintaining the mean molecular area and collapse point [37] (see Fig. 2C and D).

However, the DSPC:melittin peptide mixture showed a more complex miscibility behavior. At 50 % of melittin PAP (around 0.17 of peptide mole fraction), the miscibility analysis suggests that the DSPC lipid and melittin peptide are miscible with apparent attractive interactions (a lower MMA, see Fig. 2A). At this proportion, the first

collapse point showed different values compared to pure DSPC with the coexistence of phases (Fig. 3B) and the formation of both fibril-like and rounded domain structures. These structures detected by BAM were also observable by AFM and SEM (Fig. 3C and D). Unexpectedly, these structures were also evidenced by FM using Th-T fluorescent probe (Fig. 4). The fluorescence showed a shift in the emission wavelength and the pattern was similar to the fibrils observed by BAM (Fig. 4). On the other hand, as the mole fraction of melittin peptide increases (PAP of 80 %), we observed an MMA lower than the ideal one, indicating attractive

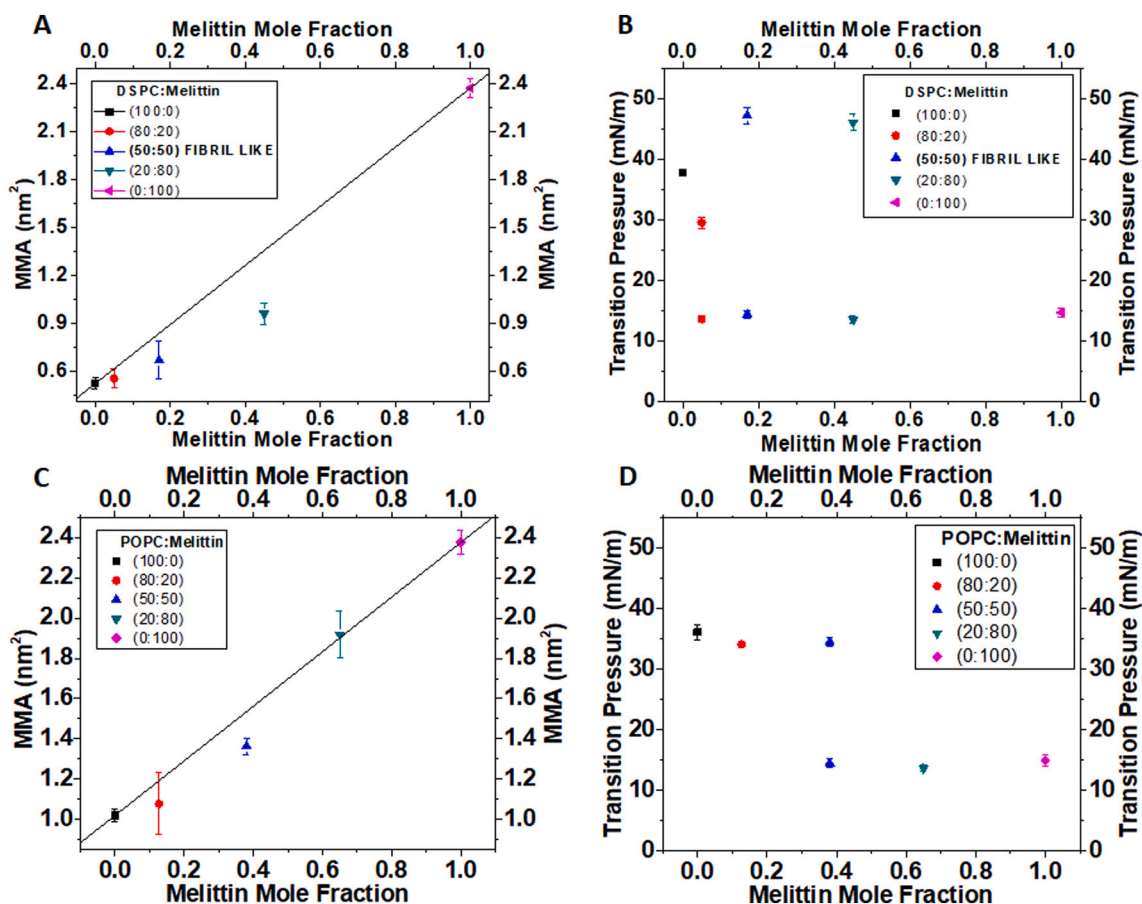


Fig. 2. Mixing phase diagram of phospholipid:melittin peptide mixtures. A: Miscibility diagram, mean molecular area vs. mole fraction for DSPC:melittin mixtures. B: Phase diagram for DSPC:melittin mixtures showing lateral immiscibility, first and second collapse point (as applicable) in the π -Area isotherms. C: Miscibility diagram, mean molecular area vs. mole fraction for POPC:melittin mixtures. D: Phase diagram for POPC:melittin mixtures, first and second collapse point (as applicable) in the π -Area isotherms. Transition Pressure means the first discontinuity point calculated by second derivative of the π -Area isotherm with respect to the area (see Materials and Methods for more details).

interactions without the formation of fibril-like structures. Hence, the formation of a complex structure at the interface depends on the DSPC:peptide proportion (Fig. 2).

Certainly, from a more detailed analysis of the BAM images, it was possible to obtain information about the interfacial structures. We have determined the variation of reflectivity values upon film compression for DSPC:melittin mixtures. This analysis allows us to discriminate two well-defined values of reflectivity in the pattern. Higher values of reflectivity corresponded to pure DSPC lipid, whereas lower values corresponded to pure melittin (see Fig. 3A). The values observed from the domains defined as bright zone in the mixture corresponded to those values measured for pure lipids, whereas the reflectivity values of domains defined as dark zone were similar to those found in pure melittin peptide (Fig. 3). A priori, we could deduce that the bright domains (fibers) were attributable to rearrangements of the lipid phase. However, if we observe the FM (Th-T positive pattern) and ATR-FTIR experiments (see below) closely, we have to conclude that the fibers are the product of a lipid-peptide reorganization forming a new 3D organization different from the monolayer arrangement of pure components.

The analysis showed lateral phase separation in all mixtures. The limits of high and low reflectivity values would correspond to pure DSPC or pure melittin peptide films, respectively (Fig. 3B). However, according to ATR-FTIR experiments, we obtained evidence of certain lipid-protein interactions due to fibrils formation (see below). The data obtained in BAM images were also corroborated by scanning electron microscopy (SEM). The topography of SEM images from mixed DSPC:melittin at (50:50) of PAP showed distinguishable fibril-like structures

(Fig. 3C left), whereas in either pure DSPC lipid or melittin peptide the interface was homogeneous (Fig. 3C, center and right).

3.2. ATR-FTIR spectroscopy analysis of the fiber-containing films

We have conducted a ATR-FTIR analysis of the lipid:peptide mixture to determine if the fibril-like structures we observed by BAM and SEM are accompanied by changes in the typical infrared stretching bands when compared to pure components.

Reports indicate that the α -helix structure contributes to the vibration of amide I in the range of 1645–1650 cm^{-1} [44]. In our experiments, pure melittin transferred films showed a main α -helix structure centered at 1650 cm^{-1} , with a little shoulder at 1625 cm^{-1} that would correspond to the β -sheet structure. This profile changed notably in the DSPC:melittin (80:20) mixture (Fig. 4). However, at both DSPC:melittin (50:50) and DSPC:melittin (20:80) of PAP, secondary structures are clearly detectable with an increase in the β -sheet component (Fig. 4A).

ATR-FTIR was also used to determine the behavior of the lipid with the presence of melittin peptide in the mixed interface. Thus, as it typically occurs in a phospholipid liquid-crystalline phase [45,46], the antisymmetric and symmetric stretching bands of methylene -C-H bonds at 2922 cm^{-1} and 2853 cm^{-1} were detected in pure lipid as well as in all the DSPC: melittin mixtures studied.

However, in DSPC:melittin (50:50, fibril-structures), we observed two distinguishable and differentiated peaks centered at 2960 cm^{-1} and 2870 cm^{-1} respectively, when compared to pure lipid or even to other lipid:peptide proportions studied (see Fig. 4B). This observation

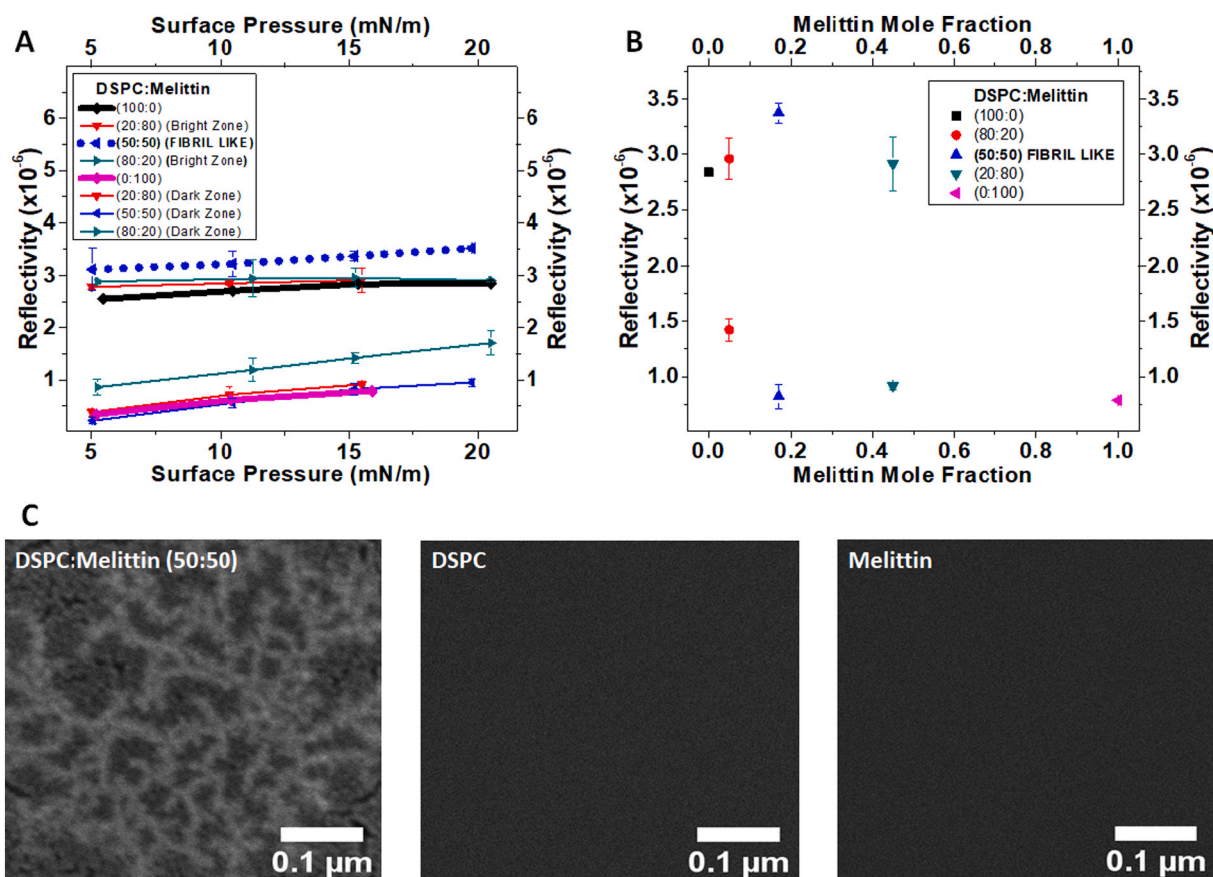


Fig. 3. BAM reflectivity and SEM analysis of mixed DSPC:melittin films. A: The reflectivity values show two calculable regions in BAM reflectivity from DSPC:melittin mixtures. Lower reflectivity range values were similar to pure melittin peptide; higher range reflectivity values were similar to pure DSPC lipid, including fibril-like structures on lipid-enriched phases. B: Reflectivity values of pure DSPC, pure melittin, and different DSPC:melittin proportions taken at $\sim 20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. C: SEM images from DSPC:melittin at 50 % of PAP, compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ then transferred to mica support (left), SEM controls for pure DSPC (center) or pure melittin monolayers (right).

indicates a particular conformation of the hydrophobic chains when DSPC lipids participate in the fibril-like formation.

3.3. Behavior of Th-T fluorescence in DSPC-melittin fibril-like structures

Th-T probe is a potent and well-known fluorescent marker of amyloid fibrils [47,48]. Th-T has high solubility in water but is not fluorescent. The probe has a medium affinity (in μM range) for the hydrophobic environment found in amyloid arrangements. This property makes Th-T a sensitive probe for many experimental systems [49], including amyloid structures artificially provoked on the bench or on pre-formed fibrils from biological sources [50,51], regardless of the protein-forming fibrils. This particular Th-T behavior is caused by the fact that amyloid fibrils share a common molecular structure (cross- β architecture) and the partition of this probe to these sites modifies its fluorescence properties [48]. By using fluorescence microscopy, we were able to observe fibrils and rounded domains marked by Th-T in transferred mixed DSPC:melittin films (Fig. 5). This procedure was used previously by adapting a method of monolayer transfer to a mica support as already described [43,52], (see Materials and Methods for details). Surprisingly, at 50:50 of PAP, DSPC:melittin transferred films showed a complex and distinctive fluorescence pattern (compared to α -synuclein control in Fig. 5). Through a 2D Horiba analysis of the fluorescence intensity of the transferred film, we found an emission centered at 522 nm (excitation range used 400–415 nm) with two additional peaks centered at 466 and 478 nm, respectively. On the other hand, α -synuclein fibrils transferred to a mica support exhibited the typical emission maxima centered at 480 (see Fig. 5 A and S1). This

differential fluorescence pattern was also observed by analyzing the transferred film using spectral confocal fluorescence microscopy with an excitation wavelength of 405 nm (Fig. 5B), and the fluorescence patterns of fibril-like structures is consistent with those observed in BAM imaging (Fig. 1, Fig. 5C, and Fig. S1). In contrast, in the transferred monolayers of pure components neither melittin peptide nor DSPC lipid alone were Th-T positive under the same experimental conditions (Fig. S1).

4. Discussion

All hypotheses about the molecular mechanism of membrane damaging by melittin indicate a particular lipid-peptide interaction. However, in this “lipid-interaction” several factors usually converge. This may include, but it is not limited to, structural factors such as the physical state of the lipid combined with the lipid arrangement at the membrane, the lipid:peptide ratio, as well as how different the amphipathic behavior of the peptide at the air-water interface is, leading to one or a combination of several mechanisms proposed: toroidal pore, barrel-stave, carpet, detergent or “lipid-extraction” effect [28,53,54]. The importance of the physical state of the phospholipid to form bidimensional structure transitions at the interfacial environment was already reported for $\text{A}\beta$ -amyloid peptides [35,52].

In this work, we studied the interaction of the cationic and amphipathic melittin peptide with two lipids. The first one is POPC, which has a liquid-expanded state at the air-water interface [55] and a bulk transition temperature of -3.7°C [56]. The second one is the DSPC lipid, with a liquid-condensed state at the air-water interface and a bulk transition temperature of 54.9°C [57].

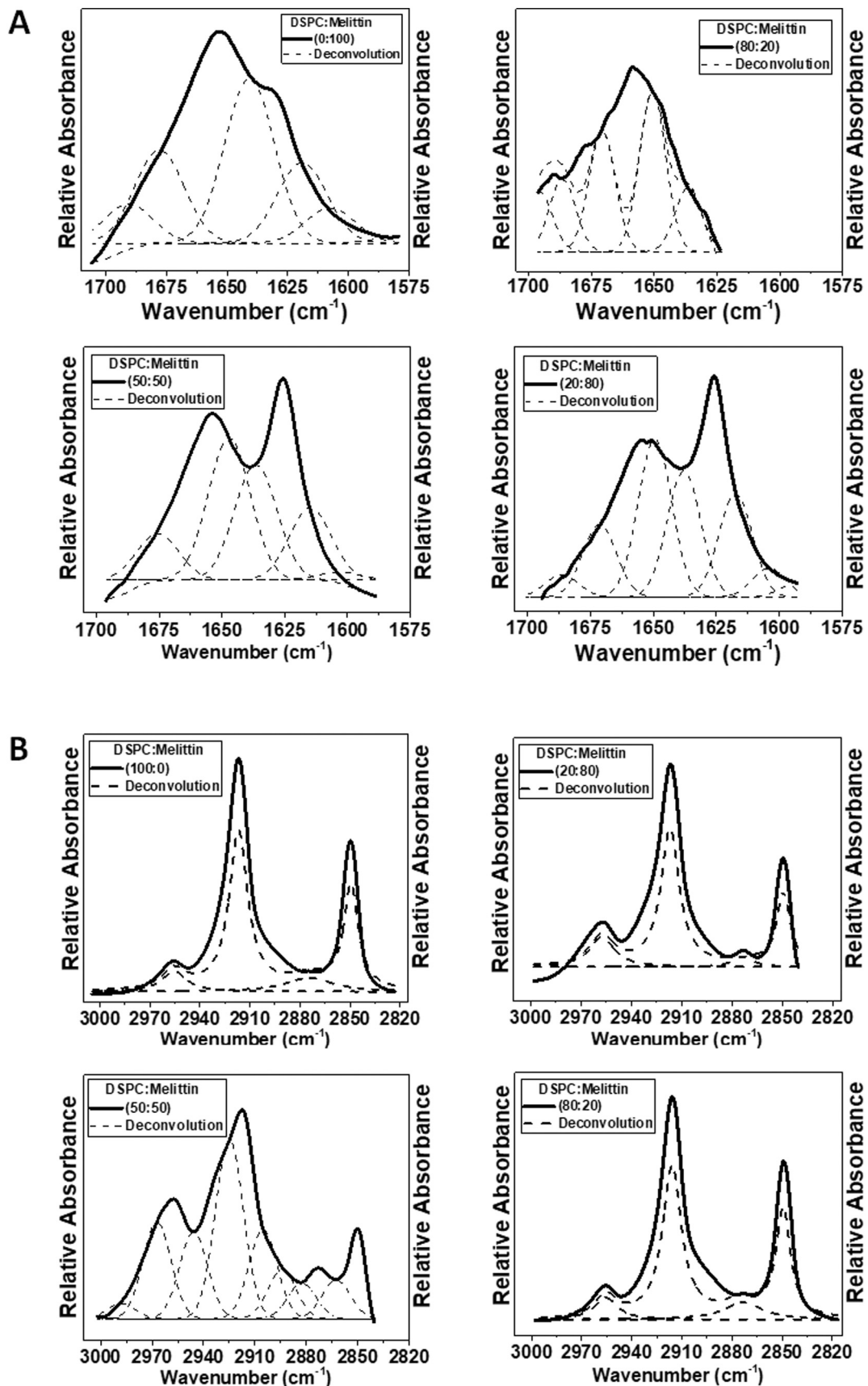


Fig. 4. ATR-FTIR spectra of transferred DSPC:melittin mixed films.

A, amide I region of: pure melittin, upper left; DSPC:melittin (20:80), upper right; DSPC:melittin (50:50), bottom; DSPC:melittin (80:20), bottom right. B, $-\text{CH}_2-$ vibration signals from symmetric ($\sim 2853 \text{ cm}^{-1}$) and antisymmetric ($\sim 2922 \text{ cm}^{-1}$) lipid stretching bands: pure DSPC, upper left; DSPC:Melittin (20:80), upper right; (50:50) fibril-like structures (note the two main signals changing to $\sim 2960 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 2870 \text{ cm}^{-1}$), bottom left; DSPC:melittin (80:20) bottom right.

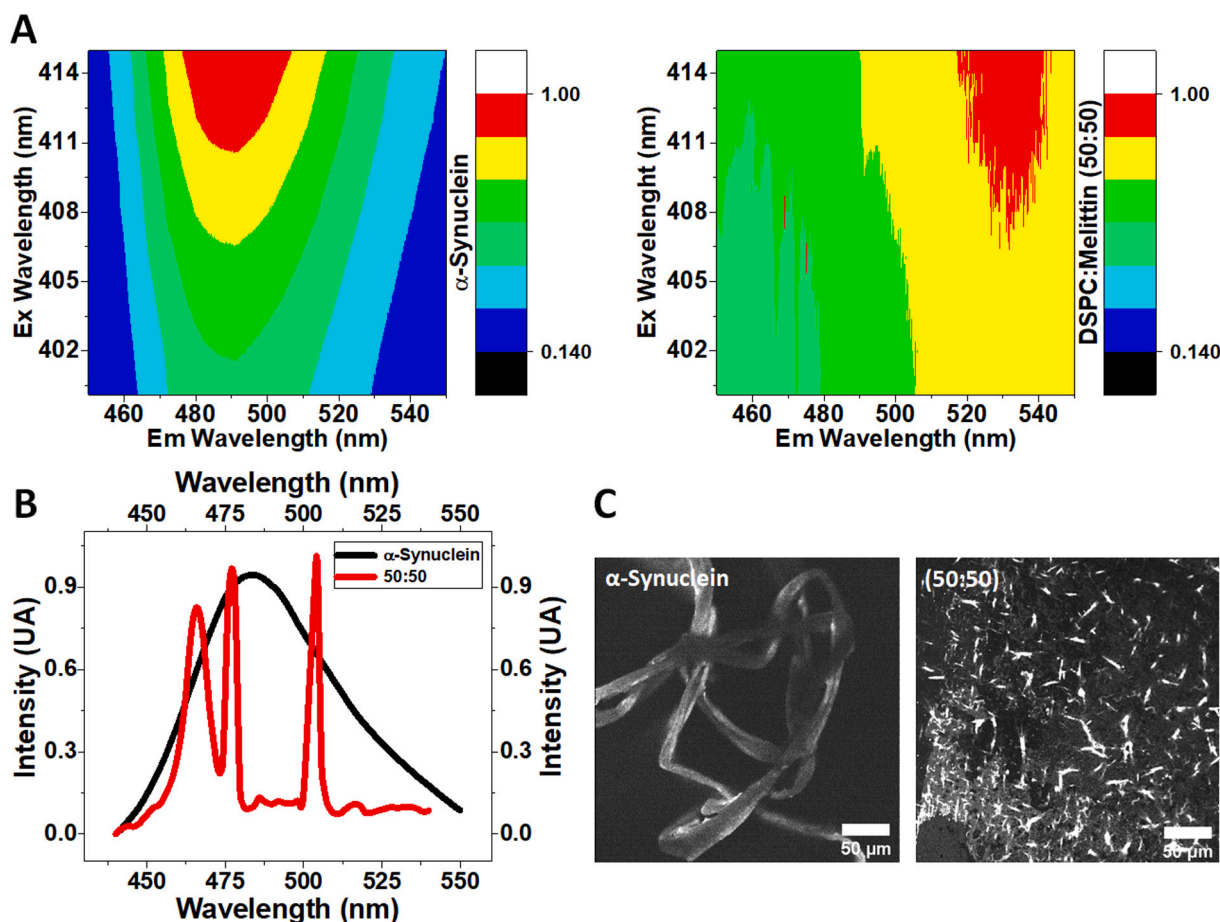


Fig. 5. Complex pattern in Th-T labeling from fibril-like structures triggered by DSPC:melittin mixed monolayers at air-water interface **A:** 2D fluorescence intensity values; left side α -synuclein (positive control); right side, DSPC:melittin (50:50). **B:** Confocal fluorescence spectrum of α -synuclein (max $\lambda_{em} \sim 482$ nm, black) and for transferred DSPC:Melittin (50:50) film with a more complex profile with emission peaks centered at ~ 466 , ~ 478 , and ~ 505 nm, respectively (in red). The λ_{ex} was 405 nm in both cases. Spectral analysis corresponded to the images showed in C. **C:** Images of Th-T fluorescence for α -synuclein (control) and for transferred DSPC:melittin (50:50) film. The film was compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and then transferred to a mica support followed by Th-T incubation (see Materials and Methods for more details).

There are currently no details regarding the action mechanism of melittin in pore formation at the molecular level. However, according to molecular dynamic studies, the physical state of the phospholipid affects the peptide behavior at the membrane level. In this sense, a study including lipids of different states, such as DHPC, DLPC, DPPC, and DSPC, showed a higher interaction of the DSPC lipid with the melittin peptide [29] by the association of the lipid polar head group with the hydrophilic residues of the peptide [32]. DSPC lipid might form symmetric arrangement domains, modifying flip-flop events in bilayers in the presence of melittin [58]. This property of the DSPC lipid in the liquid-condensed state of a lipid monolayer may induce a new DSPC lipid arrangement at the interface, triggering fibril-like and rounded domain structures as a consequence of its interaction with melittin, as observed (see Fig. 3C, and Fig. S2). These particular, reproducible, and long-range observable structures may have biological significance by disturbing the cell membrane homeostasis, and provoking massive leakage perturbation when melittin interacts with a membrane lipid domain equivalent to the interfacial properties of DSPC.

NMR studies of melittin peptide with POPC lipid showed noticeable conformational changes in the lipid head group and small changes in the hydrocarbon chain [32,59]. However, for POPC, conformational changes were mentioned to be a response to positive membrane surface charges in general, and should not be considered specific to melittin, although these studies concede that this peptide is one of the most efficient to induce head group conformational changes due to the

concentrated positive charge density of the peptide [59]. The above reported results may explain why, in POPC:melittin mixed monolayers, we observed lateral homogeneity (Fig. 1) without the formation of neither fibril-like nor rounded structures at all proportion assayed.

We have previously demonstrated that the melittin peptide is able to form a stable monolayer at the air-water interface similar to phospholipids. We have also studied its interactions with complex glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers. Thus, when the lipid monolayer is in the liquid-condensed state, such interactions are more favorable than in the liquid-expanded state [33,41].

We propose that when the melittin peptide is inserted into a membrane environment enriched with an equivalent liquid-expanded lipid (such as POPC), membrane permeation occurs without a long-range disruption of the bilayer structure, probably via a porous formation mechanism. Whereas if melittin is interacting with a membrane environment equivalent to a liquid-condensed lipid (such as DSPC), the contrary may occur where non-bilayer phases may be induced by the formation of fibril-like structures. In this connection, we observed specific changes in the stretching ATR-FTIR bands, characteristic of both molecules (Fig. 4). Besides, the data reported by Lin et al. [58] should be more consistent with a mechanism of membrane disruption through melittin binding to specific asymmetric zones of the interface that are enriched with DSPC lipid in condensed state, triggering a more disruptive state of the membrane.

We tried to design a 2D lipid-peptide organization model to describe

the interconnected fibril-like and rounded domains. This was accomplished by grouping areas from the intensity values of the data obtained from the BAM imaging (see Fig. 6B). This model establishes that the fibril-like structures are caused by condensation of the nucleation centers from the rounded domains, which are the predominant structures at higher lateral pressures (see Fig. 5B and C, and Fig. 6A).

We clearly observed an immiscibility behavior in DSPC:Melittin interfaces. Thus, the rounded domains and fibril-like structures observable by BAM at the interface are a concurrent effect of the physical state of the lipid, the amphipathic property of the melittin, and its proportion in the mixed film.

At DSPC:Melittin (50:50) of PAP, the clear fibril-like structure is Th-T positive, showing a fairly reproducible redshift of the probe (Fig. 5). This finding is consistent with the observed attractive interactions according to the miscibility analysis of the peptide/DSPC interaction (see Fig. 2A, the deviation of the MMA below to ideal mixed area). However, at this proportion, we observed a change in the secondary structure arrangement of the peptide as well as the emergence of new peaks in the lipid signal zone at 2960 cm^{-1} and 2870 cm^{-1} compared to pure lipid, or even to other used proportions (see ATR-FTIR data in Fig. 4B). Therefore, we concluded that both DSPC and melittin are taking part in a fibril-like structure in such a conformation that, in turn, it may be responsible

for Th-T shift labeling, probably due to the formation of a peculiar “amyloid-like” hydrophobic pocket promoted by a lipid-peptide arrangement.

This melittin inductor effect occurs specifically when the mixing lipid partner is in the liquid-condensed state (DSPC) but not in the liquid-expanded POPC, even when both lipids have an identical polar head group. However, the level of interfacial hydration is notably different as it was reported by Brewer et al., who studied the fluorescence relaxation of the LAURDAN probe in liquid expanded and condensed lipid monolayers [60]. Preliminary studies using sphingomyelin, a sphingolipid with similar liquid-condensed properties [42], was also able to induce Th-T positive fibril-like structures but in a rather complex manner with a hysteresis effect (see Fig. S4).

The membrane permeabilization induced by melittin, an extensively studied toxin peptide with antimicrobial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria [11], is a phenomenon that may be triggered by a specific lipid-peptide organization in the membrane. However, the intimate molecular mechanism of membrane injury has been the subject of debate, ranging from membrane pore formation to non-bilayer lipid-peptide organization, leading, in all cases, to membrane homeostasis damage [61], including the complete loss of bilayer integrity as is the case with citropin [53]. Our findings indicate that

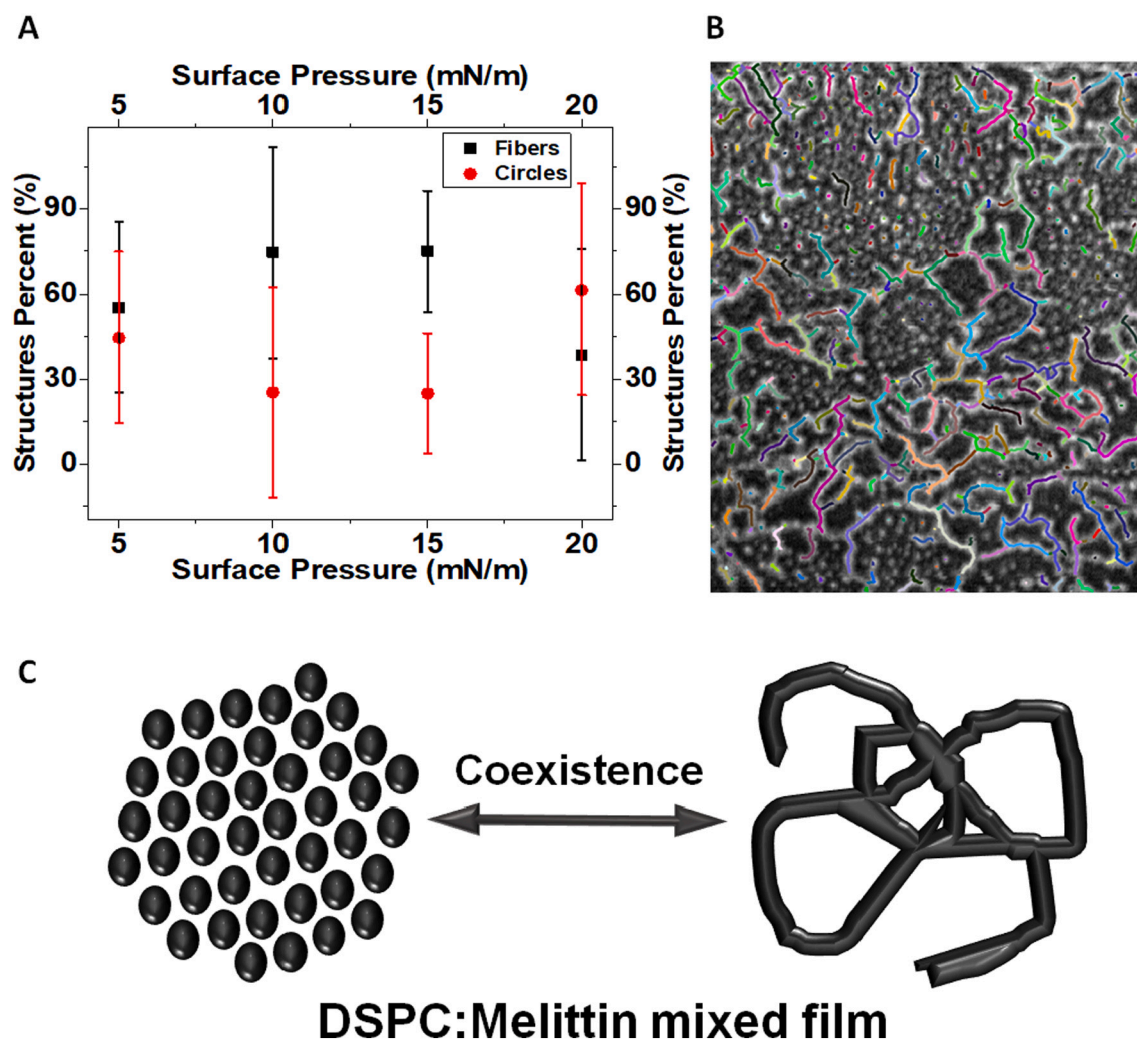


Fig. 6. Structures coexistence in DSPC:Melittin mixed monolayers at 50 % of Peptide Area Proportion. **A:** Surface pressure dependence of the structures (in percent of covered area). The high errors bars on graphic show that rounded domains and fibrils coexistence is independent from the compression. **B:** Intensity color labels denote the discontinuity of the fibril connection to the monolayer analyzed using PixInsight-advance software with a specifically script to follow equal intensity values into the matrix from a 2D BAM imaging. **C:** Schematic representation of the bidimensional equilibrium between rounded domains and fibril formation. For sequential images taken at progressive surface pressure for both lipid:peptide mixtures, see Fig. S3.

melittin can induce its lytic action by several mechanisms that may occur simultaneously in more complex membranes, i.e., pore formation in liquid-expanded hydrated regions and/or non-bilayer structure in more dehydrated domains.

5. Conclusions

Melittin peptide induce both amyloid fibril-like and round structured domains when mixed with DSPC, a liquid-condensed lipid at the air-water interface. Fibrils formation depends on the peptide area proportion in the mixture. Imaging of mixed monolayers taken by the BAM technique clearly showed protruding fibril-like structures and rounded domains at the interface without dissolving into the subphase. These fibril-like assemblies were labeled with Th-T, a typical fluorescent marker for amyloid structures, with particular characteristics. We describe, for the first time, a fibril-amyloid-like arrangement as a consequence of the lipid-peptide interaction at the interface, when the peptide involved is not identified as an amyloid protein. The structures were also noticeable using AFM and SEM, when the mixed films are properly transferred to a mica support. The DSPC:melittin fibril-like structures take place with changes in the molecular conformations of both peptide and lipid, considering the variations observed in the ATR-FTIR signals. This fibrillation phenomenon was not observable with the liquid-expanded POPC, which indicates that the degree of water hydration and physical state of the lipid-forming interface is an important factor for the described effect.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by grants from MinCyT Córdoba, CONICET, FONCYT (PICT 2016-1010 and PICT 2019-2679), and SeCyT-UNC, Argentina. A.B.A. is a doctoral fellow from CONICET. G.D.F and B. C are members of the Scientific National Research Career (CIC) of CONICET, Argentina. P.E.A.R. is a member of the researcher career from Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina. All microscopes used in this work belong to the “Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de Córdoba” (CEMINCO), integrated to the “Sistema Nacional de Microscopía (SNM-MINCYT), Argentina. S.B.P is an Emeritus Professor at the Department of Health Science and Technology, Faculty of Medicine, Aalborg University, Denmark.

The authors thank Drs. M.S. Celej and Cecilia Vasti for the donation of recombinant α -synuclein for Th-T staining experiments. The authors also thank Lic. Ubeiden Cifuentes Samboni for his assistance in ATR-FTIR experiments, and Dr. Gustavo Pino for his support in the 2D fluorescence analysis, SeCyT-UNC (PRIMAR-TP: 32520170100204CB01) and Laboratorio Láser INFIQC (CONICET-UNC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2022.184048>.

References

- [1] M. Zhang, J. Zhao, J. Zheng, Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides, *Soft Matter* 10 (2014) 7425–7451.
- [2] R.S. Sayegh, I.F. Batista, R.L. Melo, K.A. Riske, S. Daffre, G. Montich, P.I. da Silva Junior, Longipin: an amyloid antimicrobial peptide from the harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with preferential affinity for anionic vesicles, *PLoS One* 11 (2016), e0167953.
- [3] L. Cailion, J.A. Killian, O. Lequin, L. Khemtémourian, Biophysical investigation of the membrane-disrupting mechanism of the antimicrobial and amyloid-like peptide dermaseptin S9, *PLoS One* 8 (2013), e75528.
- [4] B.L. Kagan, H. Jang, R. Capone, F. Teran Arce, S. Ramachandran, R. Lal, R. Nussinov, Antimicrobial properties of amyloid peptides, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 708–717.
- [5] H. Jang, F.T. Arce, M. Mustata, S. Ramachandran, R. Capone, R. Nussinov, R. Lal, Antimicrobial protegrin-1 forms amyloid-like fibrils with rapid kinetics suggesting a functional link, *Biophys. J.* 100 (2011) 1775–1783.
- [6] M. Dathe, M. Schumann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase, M. Bienert, Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry* 35 (1996) 12612–12622.
- [7] H.E. Hasper, N.E. Kramer, J.L. Smith, J.D. Hillman, C. Zachariah, O.P. Kuipers, B. de Kruijff, E. Breukink, An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II, *Science* 313 (2006) 1636–1637.
- [8] J. Lee, Y.H. Kim, T.A. F. A.L. Gillman, H. Jang, B.L. Kagan, R. Nussinov, J. Yang, R. Lal, Amyloid beta ion channels in a membrane comprising brain total lipid extracts, *ACS Chem. Neurosci.* 8 (2017) 1348–1357.
- [9] J. Dorosz, R. Volinsky, E. Bazar, S. Kulusheva, R. Jelinek, Phospholipid-induced fibrillation of a prion amyloidogenic determinant at the air/water interface, *Langmuir* 25 (2009) 12501–12506.
- [10] D.K. Lee, J.R. Brender, M.F. Sciaccia, J. Krishnamoorthy, C. Yu, A. Ramamoorthy, Lipid composition-dependent membrane fragmentation and pore-forming mechanisms of membrane disruption by pexiganan (MSI-78), *Biochemistry* 52 (2013) 3254–3263.
- [11] W.C. Wimley, Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model, *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 905–917.
- [12] M.H.M. Memariani, M. Shahidi-Dadras, S. Nasiri, M.M. Akhavan, H. Moravvej, Melittin: from honeybees to superbugs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 3265–3276.
- [13] E. Habermann, Bee and wasp venoms, *Science* 177 (1972) 314.
- [14] L.H. Yang, T.A. T.M. Weiss, L. Ding, H.W. Huang, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.* 81 (2001) 1475–1485.
- [15] N. Orsolich, Bee venom in cancer therapy, *Cancer Metastasis Rev.* 31 (2012) 173–194.
- [16] I. Rady, I.A. Siddiqui, M. Rady, H. Mukhtar, Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy, *Cancer Lett.* 402 (2017) 16–31.
- [17] X. Yu, Y. Dai, Y. Zhao, S. Qi, L. Liu, L. Lu, Q. Luo, Z. Zhang, Melittin-lipid nanoparticles target to lymph nodes and elicit a systemic anti-tumor immune response, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1110.
- [18] C. Soliman, S. Eastwood, V.K. Truong, P.A. Ramsland, A. Elbourne, The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer, *PLoS One* 14 (2019), e0224028.
- [19] J. Zhou, C. Wan, J. Cheng, H. Huang, J.F. Lovell, H. Jin, Delivery strategies for melittin-based cancer therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13 (2021) 17158–17173.
- [20] M.T. Lee, W.C. Hung, F.Y. Chen, H.W. Huang, Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 5087–5092.
- [21] A.S. Ladokhin, S.H. White, ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin, *Biochim. Biophys. Acta* 1514 (2001) 253–260.
- [22] H.W. Huang, Action of antimicrobial peptides: two-state model, *Biochemistry* 39 (2000) 8347–8352.
- [23] M. Gordon-Grossman, H. Zimmermann, Y.S. Wolf, S.G. D. Goldfarb, Investigation of model membrane disruption mechanism by melittin using pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy and cryogenic transmission electron microscopy, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 179–188.
- [24] A. Ramamoorthy, S. Thennarasu, D.K. Lee, A. Tan, L. Maloy, Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin, *Biophys. J.* 91 (2006) 206–216.
- [25] M.T. Lee, T.L. Sun, W.C. Hung, H.W. Huang, Process of inducing pores in membranes by melittin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 14243–14248.
- [26] S. Xiao, X. Lu, L. Gou, J. Li, Y. Ma, J. Liu, K. Yang, B. Yuan, Graphene oxide as antibacterial sensitizer: mechanically disturbed cell membrane for enhanced poration efficiency of melittin, *Carbon* 149 (2019) 248–256.
- [27] F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation, *Biophys. J.* 84 (2003) 3751–3758.
- [28] Y. Miyazaki, W. Shinoda, Cooperative antimicrobial action of melittin on lipid membranes: a coarse-grained molecular dynamics study, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1864 (2022), 183955.
- [29] Y.S. Hu, S.K. S. Patel, Investigating hydrophilic pores in model lipid bilayers using molecular simulations: correlating bilayer properties with pore-formation thermodynamics, *Langmuir* 31 (2015) 6615–6631.
- [30] E.J.S. Dufourc, I.C.P. J. Dufourcq, Molecular details of melittin-induced lysis of phospholipid membranes as revealed by deuterium and phosphorus NMR, *Biochemistry* 25 (1986) 6448–6455.
- [31] S.J.X. Liu, J. Li, B. Yuan, K. Yang, Y. Ma, Molecular details on the intermediate states of melittin action on a cell membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 1860 (2023) 2234–2241.
- [32] T.C. Anglin, K.L. Brown, J.C. Conboy, Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and melittin, *J. Struct. Biol.* 168 (2009) 37–52.
- [33] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers, *Chem. Phys. Lipids* 35 (1984) 231.
- [34] B. Caruso, E.E. Ambroggio, N. Wilke, G.D. Fidelio, The rheological properties of beta amyloid langmuir monolayers: comparative studies with melittin peptide, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 146 (2016) 180–187.

- [35] A. Bolaño Alvarez, B. Caruso, P.E.A. Rodríguez, S.B. Petersen, G.D. Fidelio, A β -amyloid fibrils are self-triggered by the interfacial lipid environment and low peptide content, *Langmuir* 36 (2020) 8056–8065.
- [36] J.I. Gallea, R. Sarroukh, P. Yunes-Quartino, J.M. Ruyschaert, V. Raussens, M. S. Celej, Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological alpha-acetylated alpha-synuclein, *Biochim. Biophys. Acta* 2016 (1864) 501–510.
- [37] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Interscience Publishers, New York, 1966.
- [38] M.N. Jones, *BIOLOGICAL INTERFACES: An Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems*, Elsevier Science, Ltd, 1975.
- [39] H.M. McConnell, L.K. Tamm, R.M. Weis, Periodic structures in lipid monolayer phase transitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 3249–3253.
- [40] M. Losche, H. Mohwald, Impurity controlled phase transitions of phospholipid monolayers, *Eur. Biophys. J.* 11 (1984) 35–42.
- [41] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. Effect of the lipid physical state, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 862 (1986) 49.
- [42] L.A. Bagatolli, E. Gratton, G.D. Fidelio, Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence, *Biophys. J.* 75 (1998) 331–341.
- [43] A. Bolaño Alvarez, B. Caruso, P.E.A. Rodríguez, S.B. Petersen, G.D. Fidelio, Abeta-amyloid fibrils are self-triggered by the interfacial lipid environment and low peptide content, *Langmuir* 36 (2020) 8056–8065.
- [44] M. Sharon, Z. Oren, Y. Shai, J. Anglister, 2D-NMR and ATR-FTIR study of the structure of a cell-selective diastereomer of melittin and its orientation in phospholipids, *Biochemistry* 38 (1999) 15305–15316.
- [45] R. Ishiguro, N. Kimura, S. Takahashi, Orientation of fusion-active synthetic peptides in phospholipid bilayers: determination by fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 32 (1993) 9792–9797.
- [46] R.N. Lewis, R.N. McElhane, Fourier transform infrared spectroscopy in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes: practical considerations, *Methods Mol. Biol.* 400 (2007) 207–226.
- [47] D.T.H. Ban, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 16462.
- [48] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta* 2010 (1804) 1405–1412.
- [49] M. Groenning, Binding mode of thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status, *J. Chem. Biol.* 3 (2010) 1–18.
- [50] K.H.H. Naiki, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 244–249.
- [51] H.L. Iii, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease betaamyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [52] A.B. Alvarez, P.E.A. Rodríguez, G.D. Fidelio, Gangliosides smelt nanostructured amyloid Abeta(1–40) fibrils in a membrane lipid environment, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1864 (2021), 183749.
- [53] E.E. Ambroggio, F. Separovic, J.H. Bowie, G.D. Fidelio, L.A. Bagatolli, Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein, *Biophys. J.* 89 (2005) 1874–1881.
- [54] S. Galdiero, A. Falanga, R. Berisio, P. Grieco, G. Morelli, M. Galdiero, Antimicrobial peptides as an opportunity against bacterial diseases, *Curr. Med. Chem.* 22 (2015) 1665–1677.
- [55] G.E.H. Prenner, D. Honig, D. Mobius, K. Lohner, Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers, *Chem. Phys. Lipids* 145 (2007) 106–118.
- [56] M. Fidorra, L. Duelund, C. Leidy, A.C. Simonsen, L.A. Bagatolli, Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol, *Biophys. J.* 90 (2006) 4437–4451.
- [57] K. Pressl, K. Jorgensen, P. Laggner, Characterization of the sub-main-transition in distearoylphosphatidylcholine studied by simultaneous small- and wide-angle X-ray diffraction, *Biochim. Biophys. Acta* 1325 (1997) 1–7.
- [58] W.C. Lin, C.D. Blanchette, T.V. Ratto, M.L. Longo, Lipid asymmetry in DLPC/DSPC-supported lipid bilayers: a combined AFM and fluorescence microscopy study, *Biophys. J.* 90 (2006) 228–237.
- [59] E. Kuchinka, J. Seelig, Interaction of melittin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation, *Biochemistry* 28 (10) (1989) 4217–4221.
- [60] J. Brewer, J.B. de la Serna, K. Wagner, L.A. Bagatolli, Multiphoton excitation fluorescence microscopy in planar membrane systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 1301–1308.
- [61] G. Wiedman, K. Herman, P. Searson, W.C. Wimley, K. Hristova, The electrical response of bilayers to the bee venom toxin melittin: evidence for transient bilayer permeabilization, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (1828) 1357–1364.



Gangliosides smelt nanostructured amyloid A β (1–40) fibrils in a membrane lipid environment

Alain Bolaño Alvarez^{a,b}, Pablo E.A. Rodríguez^{c,*}, Gerardo D. Fidelio^{a,b,**}

^a Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^b Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^c Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:

A β (1–40)-lipid interaction
Amyloid-ganglioside interaction
Pathological phase transition
Amyloid-dissolving process
Langmuir monolayers

ABSTRACT

Gangliosides induced a smelting process in nanostructured amyloid fibril-like films throughout the surface properties contributed by glycosphingolipids when mixed with 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC)/A β (1–40) amyloid peptide. We observed a dynamical smelting process when pre-formed amyloid/phospholipid mixture is laterally mixed with gangliosides. This particular environment, gangliosides/phospholipid/A β (1–40) peptide mixed interfaces, showed complex miscibility behavior depending on gangliosides content. At 0% of ganglioside covered surface respect to POPC, A β (1–40) peptide forms fibril-like structure. In between 5 and 15% of gangliosides, the fibrils dissolve into irregular domains and they disappear when the proportion of gangliosides reach the 20%. The amyloid interfacial dissolving effect of gangliosides is taken place at lateral pressure equivalent to the organization of biological membranes.

Domains formed at the interface are clearly evidenced by Brewster Angle Microscopy and Atomic Force Microscopy when the films are transferred onto a mica support. The domains are thioflavin T (ThT) positive when observed by fluorescence microscopy.

We postulated that the smelting process of amyloids fibrils-like structure at the membrane surface provoked by gangliosides is a direct result of a new interfacial environment imposed by the complex glycosphingolipids. We add experimental evidence, for the first time, how a change in the lipid environment (increase in ganglioside proportion) induces a rapid loss of the asymmetric structure of amyloid fibrils by a simple modification of the membrane condition (a more physiological situation).

1. Introduction

The Alzheimer's disease (AD) is a late-onset neurodegenerative process in older individuals. Although the pathogenesis is not well known the hallmark at molecular level have long been associated to protein deposits (amyloids) in neuronal tissues [1]. The formation of these protein deposits has been related to the neuronal dysfunction and death, and the past two decades has been framed to the concept of protein aggregation (amyloid hypothesis). However, nowadays the discussion is being focused on understanding what is the molecular

organization of A β -amyloid that induces cell injury (monomers, oligomers, protofibrils or fibrils) [2,3].

Actually, it is required a deeper and a more specific understanding of the molecular mechanism by which amyloids induce neuronal death [4,5]. In this connection, the concept of structural phase transition characterized by an abrupt breakdown in the asymmetry of a molecular arrangement accompanied by a cellular dysfunction has been recently introduced. This definition includes amyloid phase transition when the separation into one or more coexisting phases can occur in the cytosol [4]. In the world of membrane biophysics, the coexistence of phases has

Abbreviations: POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine; GCS, ganglioside covered surface that means the surface area proportion of ganglioside respect to POPC in the mixed film; BAM, brewster angle microscopy; AFM, atomic force microscopy; ThT, thioflavin T; FM, fluorescence microscopy; AD, Alzheimer disease; G_T, total brain gangliosides; PC, generic diacyl-phosphatidylcholines.

* Corresponding author.

** Correspondence to: G. D. Fidelio, Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

E-mail addresses: perodriguez@outlook.com (P.E.A. Rodríguez), gfidelio@unc.edu.ar (G.D. Fidelio).

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183749>

Received 20 April 2021; Received in revised form 3 August 2021; Accepted 22 August 2021

Available online 7 September 2021

0005-2736/© 2021 Published by Elsevier B.V.

been well known for a long time [6,7], and a change in membrane dynamism may cause “health” or “disease” to the homeostasis of the cell [8]. So, we can extend the concepts of Mathieu et al. [4] to biomembranes. Thus, if amyloid defects take place at the membrane surface, may be indicated as “early events” that alter membrane homeostasis leading to cell death and, slowly, towards an irreversible pathogenesis of the AD. On the other hand, there are evidences of defects in the phase transition from individual proteins to multicomponent condensates forming fibril structures that may conduct to neurodegeneration [4]. In this connection, if we extent the same concept when membranes are involved, a condensates of biomolecules such as POPC lipids (in liquid state) and A β (1–40) peptide molecules together are capable to form fibril-like structure at low peptide proportion [9].

Thus, it is important to stand out that the enzymatic proteolytic processing of amyloid precursor protein (APP) to produce A β peptides takes place at the neuronal membrane environment with its proper diversity [1]. POPC is one of the main phospholipids constituent of neurons involved in a healthy function of cellular membranes [10]. Physically, POPC has a liquid expanded character at air-water interface and a bulk transition temperature of -3.7 °C [11].

Gangliosides are sialic acid-containing complex glycosphingolipids that are naturally present in the plasma membrane of most vertebrate cells, particularly in the nervous system where they constitute up to 10% of the total lipid mass in the brain [12]. Gangliosides have a ceramide moiety as hydrophobic portion with a protruding oligosaccharide chain as hydrophilic headgroup; these complex amphiphilic glycolipids have a liquid-expanded character at air water interface [13,14] and a range of transition temperature in between 19 and 35 °C [13,15,16]. Additionally, they are inserted in the external leaflet of membrane domains and their strong amphiphilic character play a role in the stabilization of lipid membranes [17,18]. Indeed, the ganglioside containing membrane domains are also enriched in cholesterol and low protein content [19]. Taking into account the heterogeneity and negative charges involved in the oligosaccharide moiety of their structures, some specific interactions with proteins at the neuronal surface can occur [15,20–22]. By using data from theoretical and experimental studies of artificial membranes, it was suggested that ganglioside-lipid interaction can induce the formation of membrane domain due to: *i*) the hydrogen-bond network at the lipid-water interface; *ii*) carbohydrate-water interaction; *iii*) the geometry of the gangliosides hydrophilic headgroups as well as their capacity to interact with the water and *iv*) the specific content of saturated alkyl chains [19]. Concerning the ganglioside-lipid interaction, by electron paramagnetic resonance studies, a special event of phase separation in POPC lipid induced by gangliosides can occur, due a lateral cooperative interaction between ganglioside molecules that reduce the fluidity in POPC bilayers [18,23]. Besides, it was reported that the ganglioside hydrophobic moiety has a role in the lipid phase separation that depends on the length of hydrophobic chain as well as the degree of unsaturation [24–26].

Here, we show experimental evidence that seeks a direct understanding about the biophysical molecular mechanisms involved in the dynamics smelting of fibrils into oligomer/monomer transformation and *vice-versa* in a membrane environment, and in fact, this that can be regulated by the relative content of gangliosides. Our study tries to draw a guide to future experimental design to precise which is really the structure that is damaging the neuronal membrane leading to cell death.

Depending of the molecular entity of the amyloid (oligomers or fibrils like structure) that is harmful to neural cell, gangliosides may have seen as beneficial or promoters of membrane damage. In view of our results if gangliosides dissolve and facilitate the transition from the fibril-like state into oligomer state may be harmful if the toxic species are rounded oligomers at the membrane. Otherwise, if the structure that it is piercing the neural membrane is the fibril-like state, gangliosides may beneficial for the membrane homeostasis.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

A β (1–40) (D¹AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVG²⁵SNKGAIIGLM³⁵VGGVV⁴⁰), were purchased from Bachem, AG (www.bachem.com). The subphase was NaCl 145 mM. Water was obtained from a MilliQ system (Millipore, USA) with a conductivity less than 0.085 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and a surface tension of 72 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. NaCl from Merck (Göttingen, Germany) was roasted in an appropriate oven at 400–450 °C for at least 4 h to eliminate small volatile amount of surfactants impurities. POPC (1-pamitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine was purchased from Avanti Polar Lipids, USA. DMSO and Chloroform were from Merck, Göttingen, Germany. Total bovine brain ganglioside (G_T) was purified as described previously by Mammarella et al. [27] with the additional procedure to become gangliosides free of prions [28]. The proportion of G_T was GM₁ 20%, GD_{1a} 40%, GD_{1b} 17% y GT_{1b} 19% [12].

2.2. π -Area isotherms and film balance setting

Langmuir-films experiments were performed essentially as described previously [9,29]. Temperature was set at 23 ± 0.5 °C with the help of a continuous working individual roof-top air conditioning. Subphase was unbuffered NaCl 145 mM, pH 5.6. The Teflon trough has a volume of 180 ml and it was thermostated with a circulating Haake bath. A β peptide, POPC and gangliosides were dissolved in pure DMSO, pure chloroform or chloroform:methanol:water (65:30:5, v/v) respectively, into stock solutions of about 10 mM. Individual diluted daily working solutions were freshly prepared to ~ 1 mM. For mixed monolayers, peptide and lipid were premixed from their respective individual solvent solutions at the desired proportion just before spreading of 15–30 μl of the mixture onto the subphase interface. Surface pressure was determined with a Pt plate using the Wilhelmy method. The continuous compression was through an automatic, simultaneous and symmetric movement of both barriers that confine the film. The total film area was continuously recorded using the software provided by KSV Instruments® Ltd. The usual compression rate used was adjusted at 10 $\text{mm}^2\cdot\text{min}^{-1}$, lower barrier speeds were also checked without altering the results. The surface potential was measured with a vibrating plate coupled with a reference electrode.

2.3. Brewster angle microscopy

Monolayers were spread as described above and directly observed along all π -Area isotherm using a Brewster Angle Microscope (BAM) coupled to an EP3 Imaging Ellipsometer equipment (Accurion, Göttingen, Germany) with a 20 \times objective (Nikon, Japan, NA 0.35), see ref. [9]. For each imaging acquisition, the monolayer was compressed by forward compression steps of 5 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. During imaging acquisition (5 to 20 s) the lateral pressure did not exhibit any detectable variation. In the case of dynamic experiment of film mixing (Fig. 6) the trough was divided in two regions by the help of a hydrophilic acrylic mobile separating barrier. Three to five images were sequentially taken at each surface pressure, in order to have pictures of different regions of the monolayer. Some of results obtained with BAM were compared with the images obtained by using Atomic Force Microscopy (AFM) and Fluorescence Microscopy (FM).

2.4. Transferred films for atomic force and fluorescence microscopy

Compressed monolayers up to the desired surface pressure were transferred to mica support (10 mm diameter and 0.15–0.21 mm thickness Nano-Tec V-1 grade Muscovite from Innovative Microscopy Suppliers, Argentina). The mica face was rinsed with distilled water before transferring. The film was then transferred to the support by dipping the mica, oriented perpendicular to the trough previously

submerged, at the smallest speed ($1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) and keeping the surface pressure constant with a surface barostat couple to the barriers of the trough. Previous to the transfer, the monolayer was allowed to stabilize for ~ 2 min. The monolayer of pure components and their mixtures was first compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ before transferring to mica support.

The fibril-like structures were visualized by Fluorescence Microscopy (FM) by adding a drop of freshly prepared solution of $10 \mu\text{M}$ ThT probe dissolved in pure water to the transferred monolayer onto the mica support and leave to dry off for 5 min. Excitation wavelength was selected with a 450 nm cutting filter and the emission taken at 482 nm . Negative controls were done: pure ThT (transferring a clean interface), pure lipids and pure $\text{A}\beta$ peptide were subjected to the same procedure (Fig. 4B). As positive control we tested over preformed fibrils of α -synuclein prepared in bulk condition according to Gallea and co-workers [30] and treated in the same way with ThT by using glass coverslip (Fig. 5B). The images were acquired with an Axioplan Carl Zeiss (Germany) fluorescence microscope equipped with an Olympus video camera (USA). We used a $20\times$ and $40\times$ objectives. The imaging processing and analysis was carried out using both Fiji and Pixinsight (v. 1.8.6 software). Both programs allowed us to use some filters and 2D FFT to improve imaging resolution.

Atomic Force Microscopy (AFM) measurements were performed on a multimode atomic force microscope SPM, Agilent Technology 5500, USA. We used the same mica support as describe above. It was used in contact-mode scanning to measure the transferred Langmuir monolayers of $\text{A}\beta(1-40)$ peptide/lipid mixed monolayers and their respective controls (pure POPC, pure Total Gangliosides and pure $\text{A}\beta(1-40)$ peptide). All the experiments were carried out at room temperature. Resolution images of 512×512 pixels were collected at a scanning rate in between 0.3 and $0.4 \text{ ln}\cdot\text{s}^{-1}$. The height and error-signal (vertical deflection), friction and topography images were taken simultaneously.

3. Results

3.1. Surface properties of G_T in POPC/ $\text{A}\beta(1-40)$ fibril-like mixed films. π -area isotherms and BAM images

The air-water interface is widely used to form insoluble monolayers of many confined amphiphilic molecules [31] and as a membrane model of lipid-protein interaction [32]. The compression-expansion of an insoluble monolayer can occur by using a Langmuir trough when

coupled to a movable barrier generating a surface pressure (π) – area isotherm. The film compression induces a decrease in surface tension that depends of parameters such as molecular surface concentration, miscibility of the components and the lateral packing. The change in surface tension is defined as surface pressure $\pi = \gamma^0 - \gamma$, where γ^0 is the interfacial tension of pure water and γ the surface tension of amphiphilic covered surface [31,33–35].

Previously, we demonstrated that pure $\text{A}\beta$ amyloid peptides form insoluble monolayers at air/water interface with a high lateral stability and a main molecular area of around $2.5 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ [36] with a particularly high rheology behavior compared with other amphiphilic non amyloidogenic peptide [29].

More recently, we showed that $\text{A}\beta(1-40)$ amyloid peptide mixed with POPC (phospholipid in liquid-expanded state) form nanostructured fibril-like films at the air-water interface [9] with a maximal lateral stability of around $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Fig. 1). This effect was not observed when the lipid partner of amyloid was a more solid-condensed phospholipid like DSPC [9].

The surface properties of pure individual gangliosides have been widely studied previously [13,37] including the peculiar hydration properties of their bulky polar head group [38–40]. We have used total brain gangliosides because it is the physiological mixture found in neural tissue [12].

The surface property of total brain gangliosides (G_T) monolayer behaves as an typical liquid-expanded film with a collapsing point of around $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, in according to the data described previously [13,14]. G_T films have a change in the compressibility modulus (K) at around $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ associated to tilt in the oligosaccharide head group upon compression [41]. However, this discontinuity is under discussion if represent a true two-state bidimensional phase transition since the BAM imaging of pure G_T films is completely homogeneous without observable domains (see Fig. 1). The individual surface properties of G_T were independent of the spreading solvent either from pure DMSO or from a mixture of solvents (see Section 2.2).

POPC induces fibril-like structures when mixed with $\text{A}\beta(1-40)$ amyloid at low peptide proportion [9]. Here, we studied the effect of G_T on the nanostructured fibril-like interface in mixed ternary films at different ganglioside proportion weighted by the Ganglioside Covered Surface (GCS), defined as the percentage of surface covered by ganglioside with respect to phospholipid and/or $\text{A}\beta(1-40)$ amyloid (Fig. 1). This is more important than mole fraction in mixed films since the

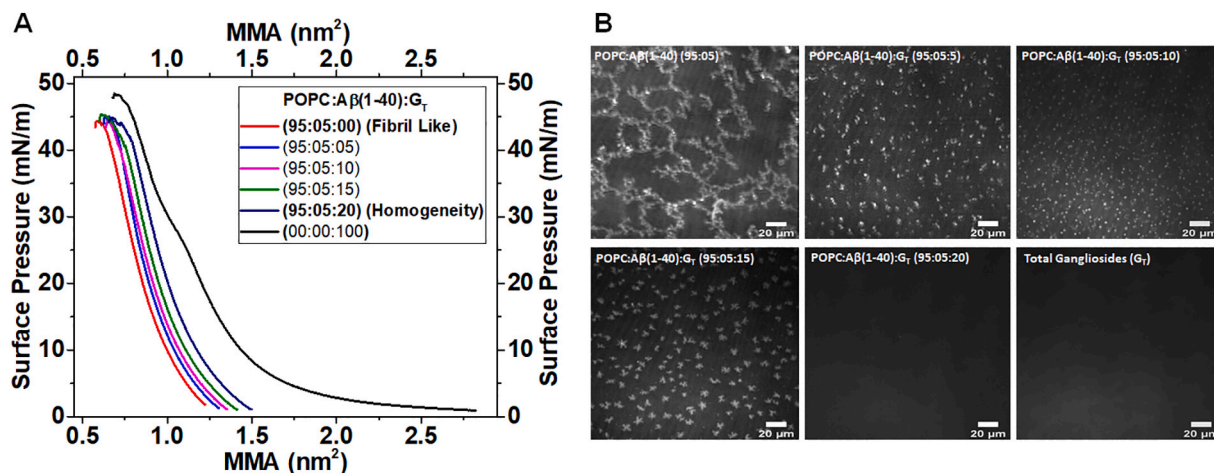


Fig. 1. Surface behavior of total gangliosides in structured fibril like films. (A) π – area isotherms for POPC/peptide/Total Gangliosides mixtures. (B) BAM images obtained at $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ in fibril like films and their mixture at the indicate lipid/amyloid/ G_T percentage of PAP (showed in the inset). The POPC/ $\text{A}\beta(1-40)$ mixture at 95:05 of PAP, shows fibril-like structures, [9] while the pictures B2, B3, B4 at (95:05:05), (95:05:10), (95:05:15) of GCS respectively shows domains, indicative of a different immiscibility behavior induced by G_T . Conversely the POPC/ $\text{A}\beta(1-40)$ / G_T mixture at (95:05:20) shows total homogeneity compared to pure G_T . The mean molecular areas (MMA) of the mixed film were calculated, as indicated in the Experimental Section. The respective mole fraction of G_T at (95:05:05), (95:05:10), (95:05:15) and (95:05:20) of GCS are 0.046, 0.092, 0.139 and 0.186. The scale solid bar in the pictures represents $20 \mu\text{m}$.

individual surface molecular areas occupied by each component are quite dissimilar (ref. to [9]).

To show the impact of ganglioside proportion in the mixture, we have used the following percent of GCS in POPC:A β (1–40):G_T 95:05:05, 95:05:10, 95:05:15, and 95:05:20 calculated, as indicated in Material and Methods. Each value of GCS corresponds to a specific mole fraction of G_T of 0.046, 0.092, 0.139 and 0.186, respectively, due to the dissimilar individual molecular areas of the pure components (see Fig. 1). The concept of surface covered area is quite important in Langmuir monolayers when mixing molecules that differ in their individual molecular areas. Thus, a small mole fraction of a molecule of high molecular area (such as amyloid peptide) in the mixture would influence the surface behavior of the mixture according to its *relative occupied area* [9,42,43].

The ternary mixed isotherms have a liquid expanded character at air/NaCl 145 mM subphase moving towards higher molecular areas as the G_T is increased in the mixture (Fig. 1A). The quite distinguishable fibril-like amyloid structures induced by pure POPC is gradually “lateral-dissolved” as the proportion of G_T is increased and completely disappear when the ternary films reached 20% of GCS (see Fig. 1B), no far from the real physiological phospholipids/gangliosides proportion found in normal neural tissue [12].

The BAM imaging showed that the fibril-like structures gradually change to rounded and irregular domains and they are completely

dissolved by the effect of gangliosides being undetectable at 20% of GCS. It is important to remark that the “lateral-dissolving” effect takes place without A β (1–40) peptide desorption into the subphase since the isotherms keep the molecular area from the lift-off area until collapse. The “lateral-dissolving” effect is keeping with changes observed in AFM image topography and ThT fluorescence microscopy (see below).

From 0 to 15% of GCS (from 0 to 0.139 mol fraction of G_T) a two-phase behavior of the films is observed. However, at 20% of GCS only one homogeneous phase was clearly appreciated with reflectivity values similar to those observed for pure G_T (Fig. 3A) according to BAM imaging (Fig. 1B). The profile of π – area isotherms allows us to experimentally build a miscibility diagram of the mixed interfaces [44], see Fig. 2.

In our particular case we have to consider four molecular aspects that concern to the peculiar surface behavior of the studied gangliosides/POPC mixtures in its interaction with A β (1–40) amyloid. Firstly, the molecular hydrophobic length and matching between the hydrophobic portion of the gangliosides and POPC; second, both lipids have similar liquid-expanded character at air/water interface; third, POPC considered as a fiber inductor of A β (1–40) peptide at low proportion [9] but not pure gangliosides by themselves (Fig. 4B); fourth, the complex oligosaccharide polar headgroup, the negative charge given by the sialic acid and its respective hydration state and dipolar organization (surface potential) are distinctive properties of gangliosides (Fig. 2D).

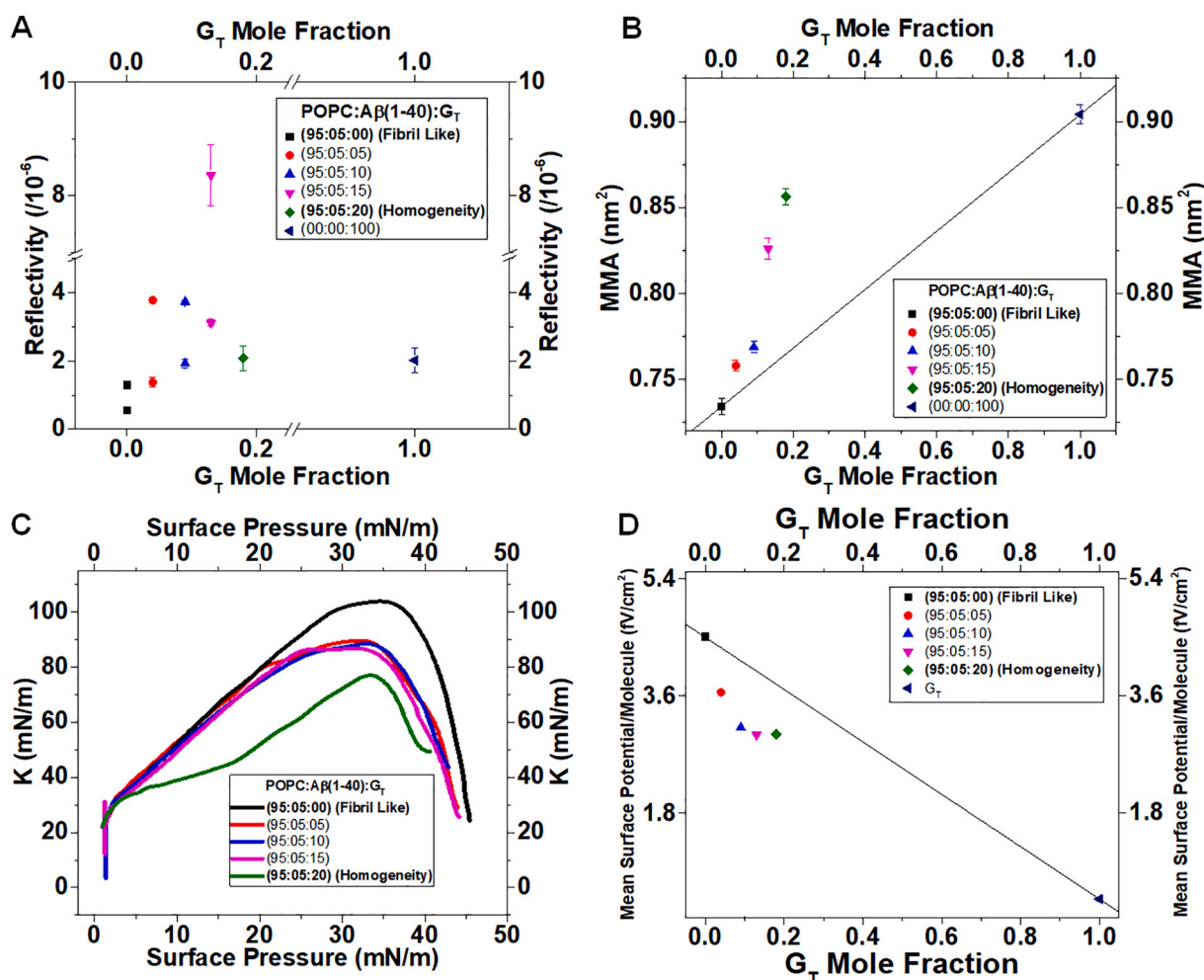


Fig. 2. POPC/A β (1–40)/Total Gangliosides miscibility, phase diagram and surface potential. A: Phase diagram for POPC/A β (1–40)/G_T mixtures showing Phase Transition by reflectivity. B: Lateral immiscibility analysis; Mean Molecular Area (MMA) vs. mole fraction of G_T taken at ~20 mN·m⁻². C: Compressibility module vs. surface pressure analysis showing the particular behavior for total gangliosides compare with their mixtures. D: Surface potential vs. MMA analysis showing the surface potential/molecule behavior above 5% of GCS. The POPC/A β (1–40)/G_T mixture has a peculiar phase separation behavior between 5% and 15% of GCS showing irregular domains, whereas at 20% of GCS was appreciated total homogeneity.

The indivisible combination of the last molecular aspects of gangliosides may be the responsible of triggering the order-disorder transition that induces the transformation from fibril-like and irregular domain structures to complete homogeneity (non-detectable at BAM or AFM scale) at 20% of GCS (Figs. 1B and 2B).

The phase separation is an important phenomenon in biological systems to explain the protein assembly associated with neurodegenerative diseases [4]. In this connection, we are giving strong experimental evidence that the above concept can be extended to a membrane environment system. Based in reflectivity analysis we show how the nanostructured fibril-like amyloid is possible to break/dissolve out two coexisting phases by a cooperative process induced by a distinctive lateral partner, as gangliosides do. Additionally, the phenomenon occurs without altering the overall stability of the ternary monolayer, as it would be the lost in surface pressure by desorption of the film forming components from the interface.

The analysis of complex comportment of POPC/A β (1–40)/G_T mixtures suggest two distinguishable behavior: a lateral immiscibility in between 5 and 15% of GCS that becomes completely homogeneous at 20% (Figs. 2B and 3). However, at 10% of GCS the surface analysis showed that the POPC/A β (1–40)/G_T are still immiscible with the formation of peculiar irregular domains observable by BAM and AFM techniques (see below and Fig. 3). These domains are ThT positive (Fig. 6) similar to fibrils like structure [9]. At 5% of GCS we still observed domains indicating lateral immiscibility but without appreciable deviation in molecular areas (Fig. 2B). The slope of the profile of π – area isotherms allows us to calculate the compressibility of the monolayer, its reciprocal is called surface compressibility modulus (K) that is an additional parameter to further describe the monolayer properties. It is usually defined as: $K = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)$ where A is the surface molecular area (at the surface pressure π) and π is the surface pressure of the film [31].

The compression of the monolayer led to the appearance irregular domains at 5%, 10% and 15% of GCS becoming homogeneous at 20% of GCS according to the BAM and AFM images (Fig. 3). The compressibility modulus (K) at 5%, 10% and 20% of GCS presented a maximum at

~ 31.1 , ~ 32.7 and ~ 33.4 mN·m⁻¹, respectively. However, at 15% of GCS presented two well defined maxima of K at ~ 25.7 mN·m⁻¹ and ~ 31.6 mN·m⁻¹ (Fig. 2C). These points on the isotherms are telling us the setting up the coexistence of two phases at the interface formed by the ternary film in which it is establishing a new re-arrangement among the film forming molecules where the amyloid structures are progressively dissolving into a new phase as the GCS is increased, being completely homogeneous at 20% of GCS (Figs. 1B, 2C and 3).

It is important to evaluate the behavior of the mean molecular area and the mean surface potential per molecule in the mixtures where the formation/dissolution of amyloids occur compared with the ideal values [31]. In Fig. 2 we present a complete view of the miscibility data. In the transition region of GCS (15–20% with a tendency of amyloid smelting) we detected a higher experimental molecular area compatible with a more monomeric form of the amyloid compared with the fibrils-like structure observed at 0% of GCS, keeping with a decrease in the values of the surface potential/molecule. These facts are clearly indicating that there is no desorption of A β (1–40) molecules from the interface as the ganglioside mixture prevents the formation of amyloid fibrillar structure.

3.2. Reflectivity and ThT analysis of the irregular domains in POPC:A β (1–40):G_T mixing interfaces

A more exhaustive analysis was made from the BAM images upon film compression for POPC:A β (1–40):G_T mixtures. We have calculated the reflectivity in different zones of the images including the irregular domains. We have used this approach previously to identify what type of film molecules are responsible of a determined reflectivity (brightness of the film [9]). Thus, we have discriminated three well-defined patterns of reflectivity. First, the higher reflectivity values is identified with A β (1–40) peptide, low reflectivity values would correspond to pure POPC phase, and the third ones with intermediate values of reflectivity are similar to those found for pure G_T, Fig. 4A. This overall analysis allows us to attribute the higher values of reflectivity in ternary mixed films to a more peptide-enriched phase that correspond to the irregular domains separate out of the rest of the lipid-enriched phase (see Fig. 4A dot lines).

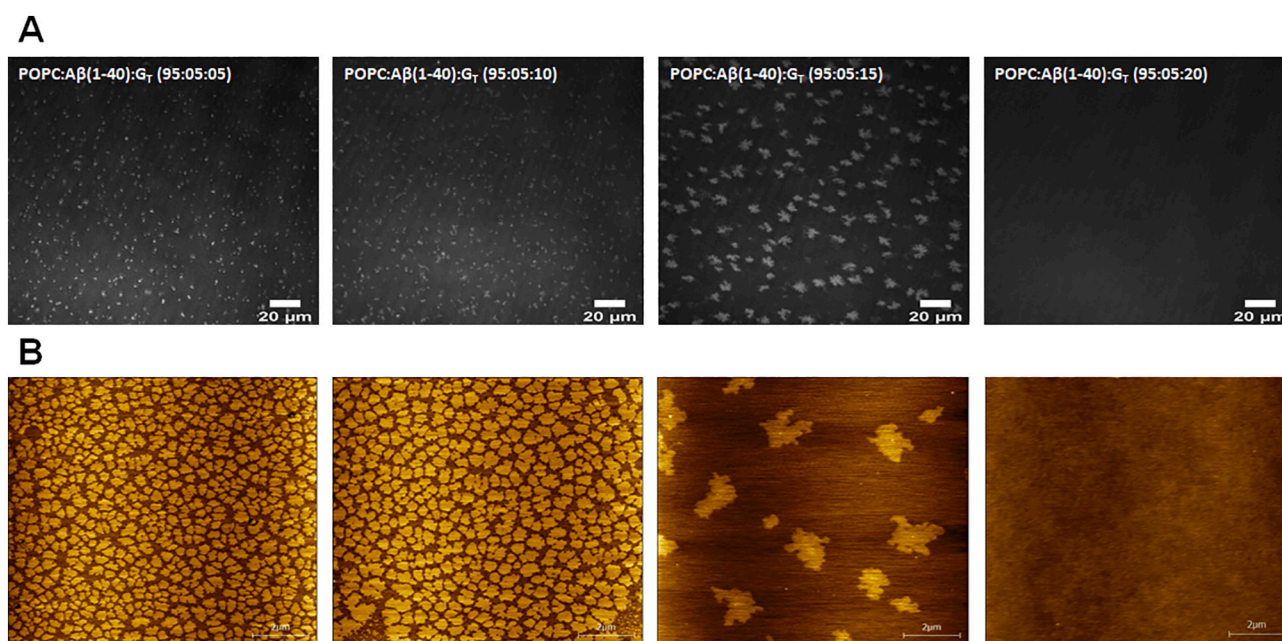


Fig. 3. BAM images and the respective AFM topography images of POPC/A β (1–40)/G_T. A: BAM images from mixtures POPC/A β (1–40)/G_T at the GCS indicated. B: AFM topography imaging from mixtures POPC/A β (1–40)/G_T at GCS indicated. The mixed films were compressed up to 25 mN·m⁻¹ and transferred to the mica support. The irregular domains along of 2 μ m length is shown (see the white bar). It is worthy to note that the image of AFM is 11 \times 11 μ m, whereas the BAM image is 200 \times 250 μ m (see the Experimental Section for more details).

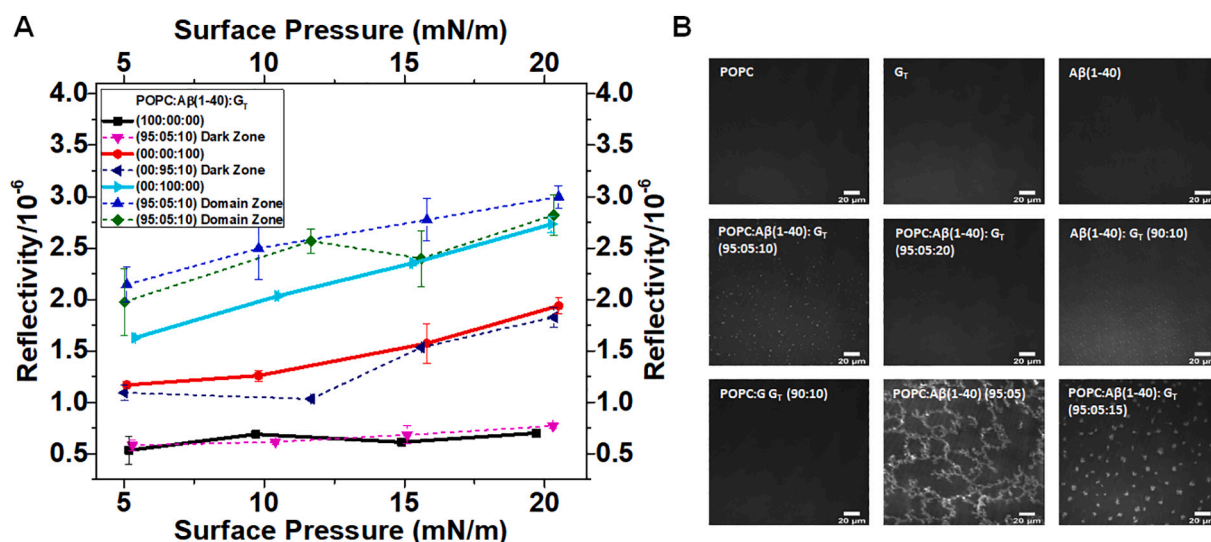


Fig. 4. Reflectivity analysis to detect the origin of irregular domains on the mixtures. A: Reflectivity values indicating the three distinguishable (and measurable) regions in BAM intensity from POPC/Aβ(1-40)/G_T mixtures indicated with three different colors. Low values are close to pure POPC lipid (black); high reflectivity range values were similar to pure Aβ(1-40) peptides (blue); and intermediate reflectivity values correspond to pure G_T. The inset on the graphic shows the proportions and the zone where the plotted values of reflectivity were taken. The irregular domains have similar reflectivity values like Aβ(1-40) peptide. B: BAM images shows that the irregular domains come from mixtures when there are peptides molecules. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

It is important to emphasize that the smelting effect of G_T needs the synergic participation of POPC in the mixed interface. In complete absence of POPC, this is pure G_T mixed with Aβ(1-40) peptide, it was observed small rounded domains that are ThT negative (Fig. 4B, middle right part), but never fibrils-like structure as pure POPC does (Fig. 4B, lower center part). However, amyloids formed in pure POPC gradually smelt as G_T increase until a complete homogenization is reached at 20% of G_T with respect to POPC (Fig. 1B lower center part and Fig. 4B middle center part).

It is accepted the particular reactivity of ThT fluorescent probe with fibrils is one of the requirements that an aggregate must meet to be considered amyloid [45]. In a previous work, we reported an adapted technique to visualize if the amyloids formed as consequence of lipid-Aβ

(1-40) peptide interaction in Langmuir films become ThT positive by transferring the packed film to mica support, further fluorescence incubation and further observation by fluorescence microscopy [9]. Using a similar approach, we found that the irregular domains observed by BAM images of POPC/Aβ(1-40)/G_T (95:05:10) were ThT positive. The images of transferred monolayers to the solid support showed a fluorescence pattern that keeps the domains with the irregular geometry than those observed in BAM and AFM topography images. The fact that the morphology of the domains and fibril-like structures are quite similar either by using BAM, AFM or ThT fluorescence microscopy is telling us that the amyloid structures remains almost unchanged in spite of interface technical manipulation.

We note that neither pure POPC or G_T transferred monolayers were

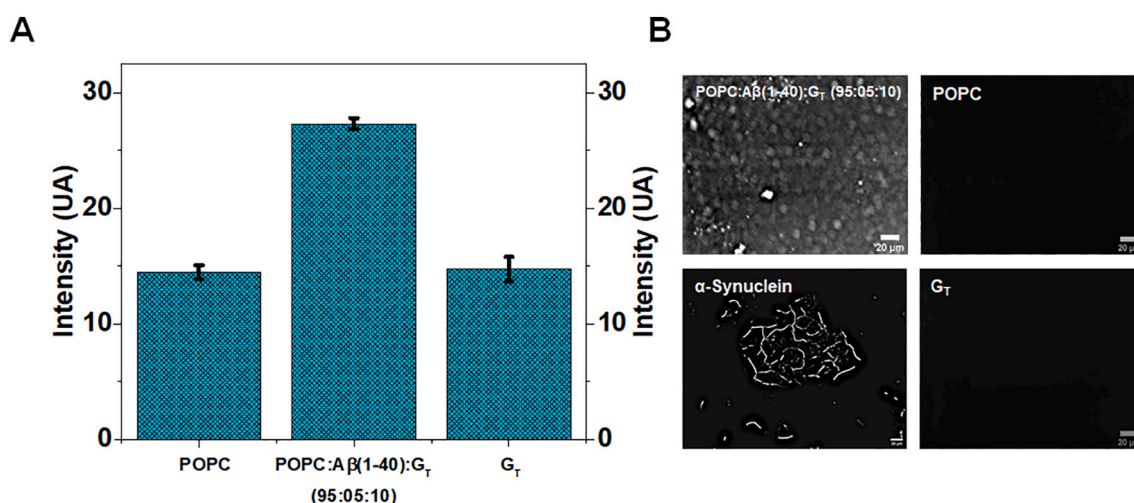


Fig. 5. ThT confirmation of amyloid Aβ(1-40) irregular domains induced by G_T at the air-water interface. A: Analysis of the Fluorescence intensity values of transferred films from Langmuir trough to the mica solid support after room temperature ThT incubation. Were transferred pure G_T peptide film, transferred pure POPC film; this average intensity corresponds to all fluorescence signals without imaging processing. B: The Fluorescence images of negative controls (G_T and POPC) and the irregular domains of POPC/Aβ(1-40)/G_T mixed at 95:05:05 of GCS was obtained after transferred to the mica support. The α-synuclein was used as positive control and formed in bulk condition then transferred to a solid support and incubated with ThT. In the lower right corner, the white bar represents the scale of 20 μm.

ThT positive (Fig. 5B) nor pure A β (1–40) [9]. Thus, the above negative controls were used to quantify, by comparison, the ThT fluorescence intensity pattern of the irregular domains (Fig. 5B). As additional checking of positive control, we have also visualized, by using the same procedure, fibrils of α -synuclein performed in bulk condition showing an appreciable ThT label (Fig. 5B, lower left).

3.3. The nanostructured amyloid fibrils-like are dynamically smelted by gangliosides.

The nature of the molecular interactions underlying the amyloid smelting brought about by the progressive transformation of fibrils-like structure into homogeneous lipid-peptide mixed interfaces as ganglioside proportion increases, led us to design a more dynamic experiment in which it would be possible to follow the time-course of the smelting process induced by gangliosides in a unique mixed monolayer. In Fig. 6 (A and B) we show a diagram of the experimental monolayer setting to dynamically trace the smelting process of the amyloid fibrils-like structure.

In a proper Teflon trough of BAM we physically divided it into two initially confined monolayers separated at the surface by a vertically movable barrier (see Fig. 6 upper left part). In the right compartment it was spread the POPC:A β (1–40) 95:05 film set at 20 mN·m⁻¹, where the fibrils-like structures are clearly observed. In the left compartment it was spread pure total ganglioside monolayer and compressed up to 30 mN·m⁻¹ in an equivalent amount of glycosphingolipid molecules to reach a total mixing film of POPC:A β (1–40):G_T 95:05:20 after lateral mixing. Then, the separating vertical movable barrier is carefully lifted allowing the laterally mixing through the interface due to Marangoni effect (the fast amphiphile moving mass over the surface due to the surface tension gradient [46], see Fig. 6). As soon as the separating

barrier is moved up, the molecules of both pre-formed monolayers become each other in contact and the overall surface pressure is fast equilibrated to the approximately value of 25 mN·m⁻¹ now forming a tertiary component film. As initially we observed a fast dissolving effect induced by gangliosides, we generated two different experimental situations in order to discard an effect due to mechanical perturbation by the fast mixing. In the *Dynamic Smelt Process*, the left compartment of the trough was spread with pure G_T whereas in the *Dynamic Fibrils Keeping* approach we set the left compartment with pure POPC where the fibrils-like structures are preserved after both surfaces are mixed (Fig. 6 C and D). However, the smelting of the fibrils provoked by gangliosides is a rapid process and at 3 min practically all the initial fibrils is no longer observable by BAM. The calculated critical smelt time was 2.35 min, this is the necessary time to completely dissolve the pre-formed ThT positive A β fibrils after gangliosides are allowed to lateral diffuse to reach POPC: amyloid domains.

4. Discussion

The surface/interface membrane region appears as the natural environment in which A β peptides are (mis)processed with further accumulation depending on the membrane composition that may either acts as catalyzing or inhibiting amyloid aggregation [1,47].

Recently, it has been highlighted the strong influence of either membranes as promoter of amyloid aggregation or the formation of amyloid-lipid co-aggregates [48]. In this sense, we have recently reported that nanostructured fibril-like A β amyloid formation can be induced at air-water interfaces depending of physical state of the phospholipid and the lipid:amyloid ratio [9].

The putative role of gangliosides as amyloidogenic has been claimed by several authors. Particularly, GM₁ has been identified as the putative

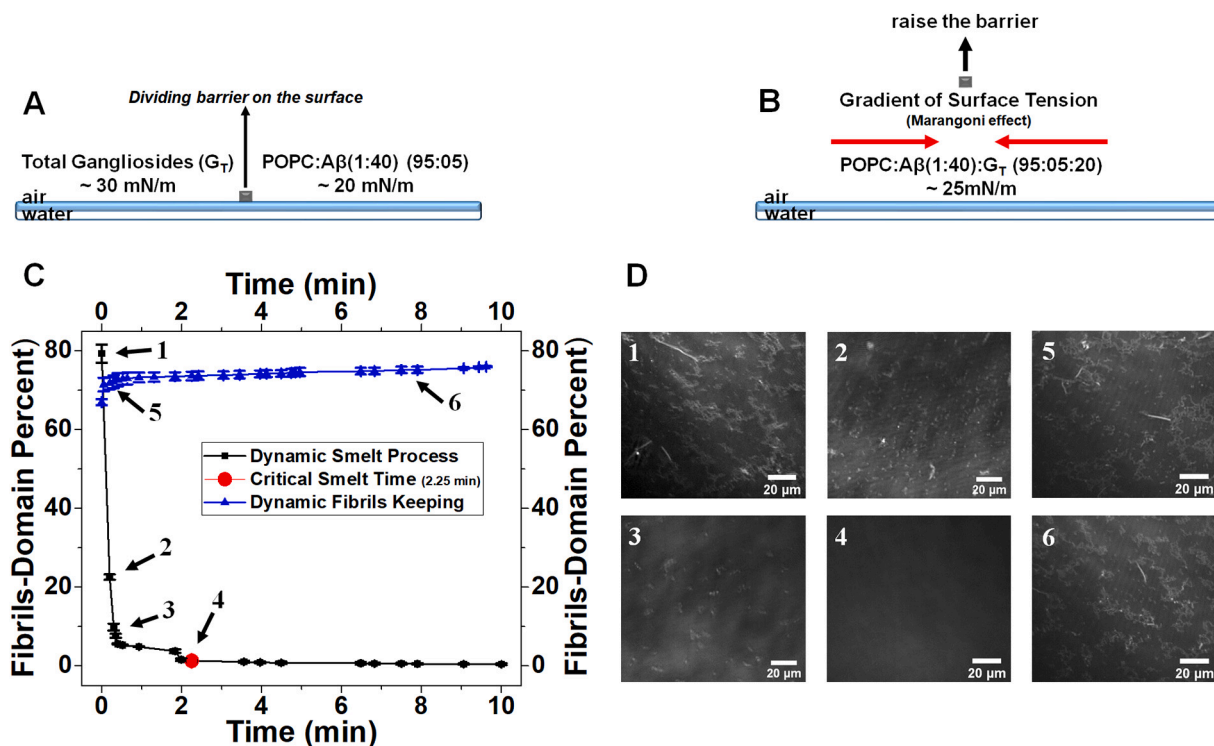


Fig. 6. Dynamic visualization of the smelting process triggered by gangliosides diffusion. Upper part: Trough setting for dynamic measurements coupled to BAM, A: Pure G_T spread at ~30 mN·m⁻¹ on the left compartment and POPC/A β (1–40) (95:05) with nanostructured fibril-like at ~20 mN·m⁻¹ spread on the right compartment separated by a mobile barrier. B: Lifting the mobile barrier allows the rapid mixing of both surface due to initially uneven surface pressure (Marangoni effect). C: Quantification of the smelting process from 0 min (just before lifting the mobile barrier) up to 10 min when in the left compartment is spread G_T (black line, *Dynamic Smelt Process*) or pure POPC (blue line, *Dynamic Fibrils Keeping*). D: BAM images at the indicated times in C in the *Dynamic Smelt Process* (1–4) or in *Dynamic Fibrils Keeping* (5–6). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

lipid binding molecule of A β amyloid peptide in neuron cell membranes [49–52]. More recently, it has been shown that in lipid bilayers formed by POPC, GM₁ decreases the binding strength of A β amyloid [53] suggesting that mixed POPC:gangliosides interaction could give an additional property in the amyloid-membrane interaction. In this connection, it was claimed that GM₁ enhances A β (1–42) peptide binding at low ganglioside proportion inserted in liquid-disorder phospholipid bilayers [54].

As we mentioned, films of POPC lipid (in liquid expanded or liquid disordered state) have an inductor effect of fibril-like structures in A β (1–40) peptide at low peptide proportion (see Fig. 1 and [9]). Thus, the fibril-like structures can be triggered in an enriched environment of POPC lipid at the membrane surface [9]. In this study we demonstrated that gangliosides have a double effect: *i*) as an effective preventer by suppressing the inducing effect of POPC in forming fibrils-like structure in mixed ternary interfaces *ii*) as an effective breaker by dissolving or smelting the pre-formed fibrils-like structure previously induced by POPC. In this case we have used total brain gangliosides (G_T) in the proportion that it is found in neuronal tissue (main glycosphingolipids: GM₁ 20%, GD_{1a} 40%, GD_{1b} 17% y GT_{1b} 19% [12]).

It is important to remark that *pure* A β (1–40) peptide films forms Langmuir monolayers with an high lateral stability keeping with a high rheology at air water interface [9,29,36]. Surprisingly, in pure A β (1–40) monolayers, the highly concentrated peptide at the interface behaves as a solid film [29] but the protein in this highly packed conformation does not form amyloid fibrils and the film is ThT negative [9], indicating that the condition of highly packed arrangement of A β (1–40) peptides is not necessary to trigger a transition from monomers→fibrils [9]. The necessary condition of interfacial amyloid fibrillogenesis is by mixing a few proportion of A β (1–40) peptide with POPC and these structured fibrils become now ThT positive (Fig. 1, [9]). The fact that interfacial membrane lipid condition may modulate the amyloid protein fibrillation has been also reported for α -synuclein by using a molecular modeling approach [47].

The novelty we are introducing in the present report is that the pre-formed fibrils-like A β (1–40) amyloid-POPC mixed surface can be dynamically smelted when gangliosides are allowed to freely laterally diffuse by surface tension gradient at the interface (see Fig. 6). The property of GM₁ ganglioside to lateral diffuse in bilayers has been reported [55]. The smelting process, we observed, depends on the surface proportion of gangliosides relative to phospholipid. At 20% of ganglioside covered surface (GCS) the mixed ternary interface becomes completely homogenous without domains that can be detected by BAM or AFM methodologies (Fig. 3). It is important to note that the effect of complete smelting of fibrils-like structures takes place at 80:20 of POPC:G_T lipid area proportion in the ternary mixed films. However, in pure gangliosides:A β (1–40) binary mixed films, the peptide showed lateral immiscibility with the presence of small detectable rounded domains but they are ThT negative (Table 1). Although, at this proportion POPC clearly induced fibrils-like structures of A β (1–40), see Fig. 1, Table 1 and ref. [9]. Thus, the POPC:G_T mixture imposes adequate surface properties and conditions not only to avoid amyloid fibrillation but also to dissolve them completely (Figs. 1 and 6, see summary in Table 1).

It is known that the hydrophilic headgroups of complex glycosphingolipids can offer a variety of the oligosaccharide chain structures that may conduct to specific interactions with proteins at the membrane neuronal surface [19]. In this connection, it was claimed that specific A β amyloid peptides and α -synuclein domains interact with the oligosaccharide portion of GM₁ ganglioside [56–58]. Although, it was also reported that A β amyloid peptide has a region in its sequence with affinity of the ceramide hydrophobic portion of the glycosphingolipid [59,60].

Additionally, by using PC-phospholipids with different chain length we observed that only diacyl-phosphatidylcholines in liquid-expanded state (DMPC, POPC) have the property to induce fibril-like ThT positive structures but no the more solid phospholipid (DSPC, ref. [9]). In overall, we are indicating that the induction and smelting process of

Table 1

Summary of lipid:amyloid conditions for interfacial A β (1–40) fibrillogenesis-smelting transition induced by total brain gangliosides.

Interfacial condition	Interfacial pattern observed by BAM, AFM and ThT analysis by FM
Pure POPC lipid without A β (1–40)	Homogeneous ThT negative
Pure G _T without A β (1–40)	Homogeneous ThT negative
Pure A β (1–40) without lipids	Homogeneous ThT negative
POCP: A β (1–40) (95:05)	Fibrils-like structures ThT positive
G _T : A β (1–40) (95:05)	Small rounded domains ThT negative
POCP:A β (1–40):G _T (95:05:10)	Small rounded domains ThT positive
POCP:A β (1–40):G _T (95:05:15)	Irregular polygonal domains ThT positive
POCP:A β (1–40):G _T (95:05:20)	Homogeneous ThT negative
POCP:A β (1–40):G _T (95:05:20) (dynamic condition at 0 min of inter-mixing)	Fibrils-like structure ThT positive
POCP:A β (1–40):G _T (95:05:20) (dynamic condition at 5 min of inter-mixing)	Homogeneous ThT negative

amyloid fibrils like structure at the interface is rather a complex phenomenon that simultaneously depends on physical state and type of the lipid forming films, the relative proportion of lipid/peptide content at the interface and, for ternary composition, the property given by the mixture. In this connection, with the last concept in mind, it was reported the phosphocholine polar headgroup in PC lipids was important to interact with the more complex gangliosides [61]. On the other hand, the overall interfacial hydration of gangliosides measured by the property of Laurdan probe is completely different to that observed for liquid PCs [39,40] indicating that, depending of the lipids and proportions, the mixed interface may establish new arrangements that, in turn, may facilitate or disfavor amyloid structuration in a membrane-like environment.

On other hand, it was recently emphasized the concept of *phase transition* as an evolution of the aggregation concept which may explained cytoplasmatic protein deposits found in neurodegenerative diseases [4]. However, similar ideas can be extrapolated to what it is occurring in a more complex environment such as a membrane interface. Thus, following the same reasoning it may be included A β -amyloid (AD) in the list of amyloidosis. Actually, is necessary a more direct experimental data supporting Mathieu's ideas [4] to understand how A β -amyloid deposits is relate to neuronal dysfunction with cell death. In this new paradigm, the protein accumulation may be classified as *pathological phase transitions* that anyway it is referring to a breaking of symmetry by a cooperative change in the molecular order that brings about a modification in the presentation (state) of the biological matter that can further induces changes in cell homeostasis, that in turn, leads to neuron death. If the order is defined as a state of high asymmetry (Figs. 1 and 3), following to the idea of Mathieu et al. [4], thus an order-to-disorder transition would occur due a break in the asymmetry parameters which could be extended to conceptualize the smelting process we observed for A β amyloids from the highly fibril-like nano-structures, passing through irregular domains until a completely homogeneity is obtained at 20% of GCS (see Figs. 1 and 3 and Table 1).

The interaction of gangliosides with PCs lipids are complex and depends on unsaturation and the length of the ceramide hydrophobic chains as well as acyl chains of PCs lipid and the size of the oligosaccharide polar head-group of the glycosphingolipid, that in turn modulates the hydration state of the surface [24,39,62]. POPC is one of most abundant phospholipid in brain tissue and one of the main lipid component of neuronal membranes [10,63] but, mixed as pure component with A β -peptide acts as an amyloid fibrils promoter that can

be conveniently suppressed by the presence of a physiological mixture of gangliosides.

In the present report, we show strong experimental evidences of how the inducing or smelting process of nanostructured amyloid fibril-like can be triggered and driven by changes in the lipid environment under physiological conditions. However, it is even unclear what is the accurate molecular entity of A β -peptide structure which it is really damaging neurons: monomers, oligomers, protofibrils or fibrils [2,3]. Thus, if we hypothesized that the accumulation of fibrils-like and ThT positive structures are the responsible of neuron membrane damage, gangliosides or a ganglioside-mimetic molecule may be a potential therapeutic solution to recover the homeostasis in neuronal pathological cells, added to its well-known anti-inflammatory effect [64–67].

5. Conclusions

The physiological mixture of complex gangliosides found in brain was able to smelt nanostructured fibril-like assemblies induced by POPC: A β (1–40) peptide in a membrane model system (Langmuir monolayers). The BAM imaging analysis certainly showed the dissolution of distinguishable nanostructured fibril-like and ThT positive domains into a more homogeneous phase in a lipid environment without protein desorption from the interface. This process can be conceptualized as a cooperative transition in the supramolecular arrangement of fibril structured A β -amyloid induced by changes in the lipid environment triggered by gangliosides at the interface. The amyloid fibrillation induced by pure POPC can be dynamically smelted when fibrils-like structures are laterally reached by gangliosides but preserving the long-range arrangement of the interfacial monolayer. The data strongly suggest that the surface quality and properties of the interfacial lipid components are important for A β -peptide acquires a defined (supra) molecular structure in a membrane environment.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by grants from MinCyT Córdoba, CONICET, FONCYT (PICT 2016-1010) and SeCyT-UNC, Argentina. A.B. A. is doctoral fellow from CONICET. G.D.F is member of the Scientific National Research Career (CIC) of CONICET, Argentina. P.E.A.R. is member of researcher career from Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina. P.E.A.R. and G.D.F give special thanks to TRB Pharma SA (Buenos Aires, Argentina) and TRB Chemedica International (Genève, Switzerland) for the generous gift of A β (1-40) peptide and by its interest to finance us the research of the effect of different lipids on amyloid fibrillation. All microscopes used in this work belong to the “Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de Córdoba” (CEMINCO), integrated to the “Sistema Nacional de Microscopía (SNM-MINCYT), Argentina.

References

- [1] D.J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years, *EMBO Mol. Med.* 8 (2016) 595–608, <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.
- [2] I.C. Martins, I. Kuperstein, H. Wilkinson, E. Maes, M. Vanbrabant, W. Jonckheere, P. Van Gelder, D. Hartmann, R. D'Hooge, B. De Strooper, J. Schymkowitz, F. Rousseau, Lipids revert inert abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice, *EMBO J.* 27 (2008) 224–233, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601953>.
- [3] D. Mrdenovic, Z. Su, W. Kutner, J. Lipkowski, P. Pieta, Alzheimer's disease-related amyloid β peptide causes structural disordering of lipids and changes the electric properties of a floating bilayer lipid membrane, *Nanoscale Adv.* 2 (2020) 3467–3480, <https://doi.org/10.1039/D0NA00292E>.
- [4] C. Mathieu, R.V. Pappu, J.P. Taylor, Beyond aggregation: pathological phase transitions in neurodegenerative disease, *Science* 370 (2020) 56–60, <https://doi.org/10.1126/science.abb8032>.
- [5] S.M. Butterfield, H.A. Lashuel, Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (2010) 5628–5654, <https://doi.org/10.1002/anie.200906670>.
- [6] F.M. Goni, The basic structure and dynamics of cell membranes: an update of the singer-nicolson model, *Biochim. Biophys. Acta* 2014 (1838) 1467–1476, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>.
- [7] F.M. Goni, "Rafts": a nickname for putative transient nanodomains, *Chem. Phys. Lipids* 218 (2019) 34–39, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.11.006>.
- [8] A. Morales, H. Lee, F.M. Goni, R. Kolesnick, J.C. Fernandez-Checa, Sphingolipids and cell death, *Apoptosis* 12 (2007) 923–939, <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0721-0>.
- [9] Bolaño Alvarez Alain, Caruso Benjamín, E.A. Rodríguez Pablo, B. Petersen Steffen, F.G. D., A β -amyloid fibrils are self-triggered by the interfacial lipid environment and low peptide content, *Langmuir* 36 (2020) 8056–8065, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00468>.
- [10] J. Choi, T. Yin, K. Shinozaki, J.W. Lampe, J.F. Stevens, L.B. Becker, J. Kim, Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids, *Mol. Cell. Biochem.* 442 (2018) 187–201, <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3203-x>.
- [11] M. Fidorra, L. Duelund, C. Leidy, A.C. Simonsen, L.A. Bagatolli, Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol, *Biophys. J.* 90 (2006) 4437–4451, <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077107>.
- [12] S. Sipione, J. Monyror, D. Galleguillos, N. Steinberg, V. Kadam, Gangliosides in the brain: physiology, pathophysiology and therapeutic applications, *Front. Neurosci.* 14 (2020), 572965, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>.
- [13] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures, *BBA* 854 (1986) 231–239.
- [14] Maggio Bruno, Federico A. Cumar, C. Ranwel, Surface behaviour of gangliosides and related glycosphingolipids, *Biochem. J.* 171 (1978) 559–565.
- [15] B. Maggio, G.D. Fidelio, F.A. Cumar, R.K. Yu, Molecular interactions and thermotropic behavior of glycosphingolipids in model membrane systems, *Chem. Phys. Lipids* 42 (1986) 49–63.
- [16] B. Maggio, T. Ariga, J.M. Sturtevant, R.K. Yu, Thermotropic behavior of glycosphingolipids in aqueous dispersions, *Biochemistry* 24 (1985) 1084–1092, <https://doi.org/10.1021/bi00326a003>.
- [17] F. T., Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins glycolipids are onco-developmental antigens, *Nature* 314 (1985) 53–57.
- [18] E. Bertoli, M. Masserini, S. Sonnino, R. Ghidoni, B. Cestaro, G. Tettamanti, Electron paramagnetic resonance studies on the fluidity and surface dynamics of egg phosphatidylcholine vesicles containing gangliosides, *Biochim. Biophys. Acta* 647 (1981) 196–202, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90246-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90246-7).
- [19] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, A. Prinetti, Gangliosides as components of lipid membrane domains, *Glycobiology* 17 (2007) 1R–13R, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl052>.
- [20] B. Maggio, F.A. Cumar, G.A. Roth, C.G. Monferran, G.D. Fidelio, Neurochemical and model membrane studies in demyelinating diseases, *Acta Neuropathol Suppl* 9 (1983) 71–85.
- [21] B. Maggio, M.L. Fanani, C.M. Rosetti, N. Wilke, Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: an assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1922–1944, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.020>.
- [22] B. Maggio, J.M. Sturtevant, R.K. Yu, Effect of myelin basic protein on the thermotropic behavior of aqueous dispersions of neutral and anionic glycosphingolipids and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 2652–2659.
- [23] G. Tettamanti, A. Preti, B. Cestaro, B. Venerando, A. Lombardo, R. Ghidoni, S. Sonnino, Gangliosides, neuraminidase and sialyltransferase at the nerve endings, *Adv. Exp. Med. Biol.* 125 (1980) 263–281, https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7844-0_25.
- [24] M. Masserini, E. Freire, Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length, *Biochemistry* 25 (1986) 1043–1049, <https://doi.org/10.1021/bi00353a014>.
- [25] M. Masserini, P. Palestini, B. Venerando, A. Fiorilli, D. Acquotti, G. Tettamanti, Interactions of proteins with ganglioside-enriched microdomains on the membrane: the lateral phase separation of molecular species of GD1a ganglioside, having homogeneous long-chain base composition, is recognized by vibrio cholerae sialidase, *Biochemistry* 27 (1988) 7973–7978, <https://doi.org/10.1021/bi00420a057>.
- [26] M. Masserini, P. Palestini, E. Freire, Influence of glycolipid oligosaccharide and long-chain base composition on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine large unilamellar vesicles containing gangliosides, *Biochemistry* 28 (1989) 5029–5034, <https://doi.org/10.1021/bi00438a019>.
- [27] C.A.G. Mammarella, P.E.A. Rodríguez, F.A. Cumar, A process for obtaining the gangliosides from nervous tissue of mammals and for the treatment of psychoorganic diseases with said material compositions, in: *European Patent vol. EP 0409473*, 1991.

- [28] P.E.A. Rodríguez, C.A.G. Mammarella, Proceso para obtener gangliósidos puros libres de contaminación debido a agentes infecciosos no convencionales, in: *Argentinean Patent* vol. AR199232289, 1992.
- [29] B. Caruso, E.E. Ambroggio, N. Wilke, G.D. Fidelio, The rheological properties of beta amyloid Langmuir monolayers: comparative studies with melittin peptide, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 146 (2016) 180–187, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.06.003>.
- [30] J.I. Gallea, R. Sarroukh, P. Yunes-Quartino, J.M. Ruyschaert, V. Raussens, M. S. Celej, Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological alpha-acetylated alpha-synuclein, *Biochim. Biophys. Acta* 2016 (1864) 501–510, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.01.011>.
- [31] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces*, 1966.
- [32] R. Mendelsohn, G. Mao, C.R. Flach, Infrared reflection-absorption spectroscopy: principles and applications to lipid-protein interaction in langmuir films, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 788–800, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.11.024>.
- [33] M.N. Jones, *Biological Interfaces: An Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems*, 1975.
- [34] M. Losche, H. Mohwald, Impurity controlled phase transitions of phospholipid monolayers, *Eur. Biophys. J.* 11 (1984) 35–42, <https://doi.org/10.1007/bf00253856>.
- [35] H.M. McConnell, L.K. Tamm, R.M. Weis, Periodic structures in lipid monolayer phase transitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81 (1984) 3249–3253, <https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3249>.
- [36] E.E. Ambroggio, D.H. Kim, F. Separovic, C.J. Barrow, K.J. Barnham, L.A. Bagatolli, G.D. Fidelio, Surface behavior and lipid interaction of alzheimer beta-amyloid peptide 1–42: a membrane-disrupting peptide, *Biophys. J.* 88 (2005) 2706–2713, <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055582>.
- [37] B. Maggio, F.A. Cumar, R. Caputto, Surface behaviour of gangliosides and related glycosphingolipids, *Biochem. J.* 171 (1978) 559–565, <https://doi.org/10.1042/bj1710559>.
- [38] L.A. Bagatolli, B. Maggio, F. Aguilar, C.P. Sotomayor, G.D. Fidelio, Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures: a comparative fluorescence and calorimetric study, *Biochim. Biophys. Acta* 1325 (1997) 80–90.
- [39] L.A. Bagatolli, E. Gratton, G.D. Fidelio, Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence, *Biophys. J.* 75 (1998) 331–341.
- [40] L.A. Bagatolli, G.G. Montich, M. Ravera, J.D. Perez, F. G.D., Fatty acid-indole fluorescent derivatives as probes to measure the polarity of interfaces containing gangliosides, *EMBO Mol. Med.* 78 (1995) 193–202, [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(95\)02499-9](https://doi.org/10.1016/0009-3084(95)02499-9).
- [41] M. Roefzaad, T. Kluner, I. Brand, Orientation of the GM1 ganglioside in langmuir-Blodgett monolayers: a PM IRRAS and computational study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 10140–10151, <https://doi.org/10.1039/b910479h>.
- [42] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers, *Chem. Phys. Lipids* 35 (1984) 231–245.
- [43] G.D. Fidelio, B. Maggio, F.A. Cumar, Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. effect of the lipid physical state, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 862 (1986) 49–56.
- [44] S.T. Milner, J.F. Joanny, P. Pincus, Buckling of Langmuir Monolayers, *Europhys. Lett.* 9 (1989) 495.
- [45] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta* 2010 (1804) 1405–1412, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>.
- [46] L.E. Scriven, C.V. Stermling, The Marangoni effects, *Nature* 187 (1960) 186–188.
- [47] J. Krausser, T.P.J. Knowles, A. Saric, Physical mechanisms of amyloid nucleation on fluid membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117 (2020) 33090–33098, <https://doi.org/10.1073/pnas.2007694117>.
- [48] E. Sparr, S. Linse, Lipid-protein interactions in amyloid formation, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1867 (2019) 455–457, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.006>.
- [49] H. Ahyauch, M. Masserini, F.M. Goni, A. Alonso, The interaction of Abeta42 peptide in monomer, oligomer or fibril forms with sphingomyelin/cholesterol/ganglioside bilayers, *Int. J. Biol. Macromol.* 168 (2021) 611–619, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.112>.
- [50] C. Fabiani, S.S. Antollini, Alzheimer's disease as a membrane disorder: spatial cross-talk among beta-amyloid peptides, nicotinic acetylcholine receptors and lipid rafts, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019) 309, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00309>.
- [51] K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease, *Nat. Med.* 1 (1995) 1062–1066, <https://doi.org/10.1038/nm1095-1062>.
- [52] C.R. Emory, T.A. Ala, W.H. Frey 2nd, Ganglioside monoclonal antibody (A2B5) labels Alzheimer's neurofibrillary tangles, *Neurology* 37 (1987) 768–772, <https://doi.org/10.1212/wnl.37.5.768>.
- [53] N. Fricke, R. Dimova, GM1 softens POPC membranes and induces the formation of Micron-sized domains, *Biophys. J.* 111 (2016) 1935–1945, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.09.028>.
- [54] H. Ahyauch, A.B. Garcia-Arribas, M.E. Masserini, S. Pantano, F.M. Goni, A. Alonso, Beta-amyloid (1–42) peptide adsorbs but does not insert into ganglioside-containing phospholipid membranes in the liquid-disordered state: modelling and experimental studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 2651–2658, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.165>.
- [55] B. Goins, M. Masserini, B.G. Barisas, E. Freire, Lateral diffusion of ganglioside GM1 in phospholipid bilayer membranes, *Biophys. J.* 49 (1986) 849–856, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83714-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83714-6).
- [56] J. Fantini, N. Yahi, Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of alpha-synuclein: key role of tyrosine 39 in membrane insertion, *J. Mol. Biol.* 408 (2011) 654–669, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.009>.
- [57] H. Ueno, T. Yamaguchi, S. Fukunaga, Y. Okada, Y. Yano, M. Hoshino, K. Matsuzaki, Comparison between the aggregation of human and rodent amyloid beta-proteins in GM1 ganglioside clusters, *Biochemistry* 53 (2014) 7523–7530, <https://doi.org/10.1021/bi501239q>.
- [58] C. Di Scala, N. Yahi, S. Boutemour, A. Flores, L. Rodriguez, H. Chahinian, J. Fantini, Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's beta-amyloid peptide and alpha-synuclein, *Sci. Rep.* 6 (2016) 28781, <https://doi.org/10.1038/srep28781>.
- [59] K. Ikeda, K. Matsuzaki, Driving force of binding of amyloid beta-protein to lipid bilayers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370 (2008) 525–529, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.130>.
- [60] K.L. Stewart, S.E. Radford, Amyloid plaques beyond abeta: a survey of the diverse modulators of amyloid aggregation, *Biophys. Rev.* 9 (2017) 405–419, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0271-9>.
- [61] B. Maggio, F.A. Cumar, R. Caputto, Interactions of gangliosides with phospholipids and glycosphingolipids in mixed monolayers, *Biochem. J.* 175 (1978) 1113–1118, <https://doi.org/10.1042/bj1751113>.
- [62] B. Maggio, The surface behavior of glycosphingolipids in biomembranes: a new frontier of molecular ecology, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 62 (1994) 55–117, [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(94\)90006-x](https://doi.org/10.1016/0079-6107(94)90006-x).
- [63] M. Kosicek, S. Hecimovic, Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1310–1322, <https://doi.org/10.3390/ijms14011310>.
- [64] S.G. Correa, I.D. Bianco, C.M. Riera, G.D. Fidelio, Anti-inflammatory effect of gangliosides in the rat hindpaw edema test, *Eur. J. Pharmacol.* 199 (1991) 93–98.
- [65] M. Amico-Roxas, A. Caruso, V.M. Cutuli, U. Scapagnini, A. Morandi, Anti-inflammatory action of AGF44, a ganglioside ester derivative, *Drugs Exp. Clin. Res.* 18 (1992) 251–259.
- [66] E. Tubaro, C. Santiangeli, G. Cavallo, L. Belogi, G. Guida, C. Croce, A. Modesti, Effect of a new de-N-acetyl-lysoglycosphingolipid on chemically-induced inflammatory bowel disease: possible mechanism of action, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348 (1993) 670–678, <https://doi.org/10.1007/BF00167246>.
- [67] N. Yanguas-Casas, A.C. Ojalvo-Sanz, A. Martinez-Vazquez, M.F. Goneau, M. Gilbert, M. Nieto-Sampedro, L. Romero-Ramirez, Neurostatin and other O-acetylated gangliosides show anti-neuroinflammatory activity involving the NFKappaB pathway, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 377 (2019), 114627, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114627>.



Stitching together a nm thick peptide-based semiconductor sheet using UV light

Alain Bolaño Alvarez^a, Marcelo Pino^a, Steffen B. Petersen^{b,*}, Gerardo Daniel Fidelio^{a,*}

^a CIQUIBIC, Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^b Department of Health Science and Technology, Faculty of Medicine, Aalborg University, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

Peptide semiconductor behavior
Lateral conductivity
Amphipathic nanosheet peptide monolayers
Nanoconfined tyrosine crosslinking
Peptide backbone asymmetry

ABSTRACT

Langmuir monolayer allows for a two-dimensional nano-scale organization of amphiphilic molecules. We have adapted this technique to measure lateral and transverse conductivity in confined peptide nanosheets for the first time. We reported that two retro-isomers amphipathic peptides form stable monolayers showing a semiconductor-like behavior. Both peptides exhibit the same hydrophobicity and surface stability. They differ in the lateral conductivity and current-voltage due to the asymmetric peptide bond backbone orientation at the interface. Both peptides contain several tyrosines allowing the lateral crosslinking in neighboring molecules induced by UVB. UVB-light induces changes in the lateral conductivity and current-voltage behavior as well as monolayer heterogeneity monitored by Brewster Angle Microscopy. The semiconductor properties depend on the peptide bond backbone orientation and tyrosine crosslinking. Our results indicate that one may design extended nano-sheets with particular electric properties, reminiscent of semiconductors. We propose to exploit such properties for biosensing and neural interfaces.

1. Introduction

The interface between biology and electronics represents a huge challenge these days [1]. Throughout molecular evolution the biological world has developed many processes that somehow were facilitating the electron transport system often involving photonic input. Photosynthesis and a wide range of redox reactions are good examples. It is not surprising that soft biological material, such as peptide sheets, may possess inherent electrical properties such as semiconductor behavior. Biological organisms are controlled by neuronal circuits where electrical pulses transmit information to and from organs [2,3] helped by proteins specifically inserted in membrane neurons [4,5]. If we could engineer biological entities (peptides) with predefined electric properties, we could modulate or repair neuronal signaling between the brain and organs.

Since the award of the Nobel Prize in Chemistry in 2000 for the discovery of conductive organic polymers [6] it has emerged the interest of about the electronic semiconductor properties in peptides [7]. From late 1950s many investigators have been contributed to describe the electron transfer machinery in cells [8]. Beratan et al. described a model of electronic coupling in proteins, which was named as *Tunneling*

Pathway [9]. These authors framed the interactions in a folded polypeptide to three types: covalent bonds, hydrogen bonds, and through-space contacts [9] such as van der Waals contact between atoms [10].

2D peptide nanofilms could potentially have applications as an organic conducting films, in biocatalysts and in bioelectronics [11–14]. Others authors have also reported that microbial peptide based nanowires as potential candidates for bioelectronics material [15]. Also, some authors have claimed that these studies would help us to further understand the transduction signal phenomenon in transmembrane proteins [16].

Langmuir monolayers allow for tailor-made peptide films [17]. In the present work, we present a 2D nano sheet conductivity and current-voltage studies by using two amphiphilic peptides with reversing sequences that differs in its surface dipolar organization with similar surface properties. The amphiphilicity of each peptide is asymmetric. Both peptides are acetylated and amidated at the N_t or C_t terminus, respectively (see Fig. 1). Additionally, we show that the semiconductor properties acquired by both peptides are modified after UVB illumination due to laterally intermolecular cross-linking of Tyr. Therefore, we conclude that it is possible to design peptide-sheets with

* Corresponding authors.

E-mail addresses: steffen1357@gmail.com (S.B. Petersen), gfidelio@unc.edu.ar (G.D. Fidelio).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111734>

Received 15 January 2021; Received in revised form 11 March 2021; Accepted 26 March 2021

Available online 1 April 2021

0927-7765/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

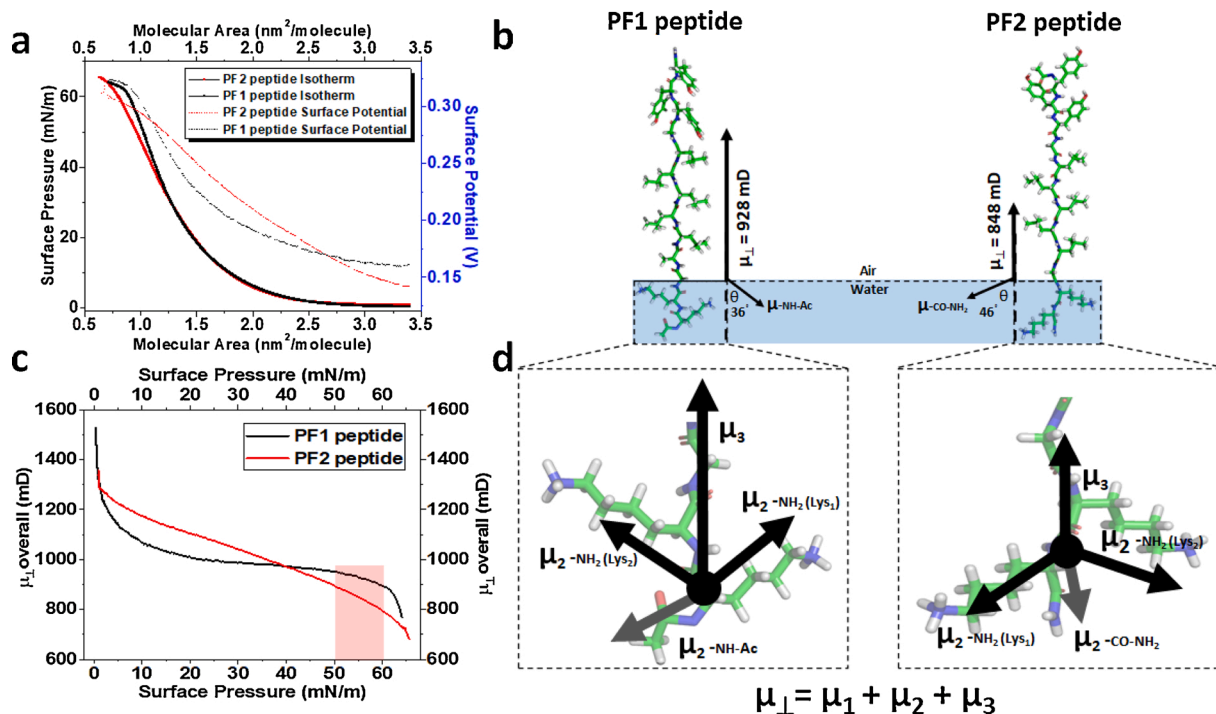


Fig. 1. Surface properties and dipolar organization of PF Tyrosinated peptides at the air-water interface. **a**, Surface pressure-area (π -Area, in straight line) and surface potential (in dot line) isotherms for PF1 (in red) and PF2 (in black) peptides. **b**, Stick representation (using Pymol software) of both peptides with the most probable conformation: extended β -sheet perpendicular at the air-water interface (deducted from the cross-sectional molecular area, see [22]) with the overall dipole moment (μ_{\perp}) and the displacement angle of the hydrophilic portion from low packing (5 mN/m) to high packing (55 mN/m). **c**, Overall dipole moment (μ_{\perp}) dependence of PF1 and PF2 with surface pressure. **d**, Zoom in of the structural representation of the hydrophilic portion for both peptides with the 3D projection of the μ_2 dipole contributions.

predefined chemical as well as semiconductor properties. Peptides may therefore adopt active electronic roles in biosensors with the possibility that the asymmetry property of peptide direction (or device organization) may increase the sensitivity of the biosensors.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Water Milli Q Type II was used routinely in all measurements (Langmuir and conductivity). Peptides were purchased from Biomatik (www.biomatik.com, USA) with the N-terminus acetylated (Ac-NH-) and C-terminus amidated ($-\text{CONH}_2$). The purity of peptides were better than 95 % by HPLC and checked by MS. DMSO and chloroform were from Merck (Darmstadt, Germany). DMPC lipids was from Avanti Polar lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA).

2.2. Monolayer formation and compression π -Area and ΔV -Area isotherms. Calculation of dipolar moment perpendicular to the interface

Langmuir monolayers experiments were performed at a room constant temperature (25 °C), essentially as indicated before [18]. Langmuir monolayers were formed on pure water using a 180 mL volume trough. We prepared stock solutions of about 10 mM of the peptides and DMPC lipid which were dissolved in pure DMSO and chloroform, respectively. Individual diluted working solutions were freshly prepared to $\sim 1 \mu\text{M}$. Around of 15–30 μl of individual working solution was directly spread on the surface of water subphase. The isotherms were obtained by continuous compression of the automatic and simultaneous movement of both barriers that enclose the formed film. The compression rate used was setting at $10 \text{ mm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. It was used the Wilhelmy method for determining the surface pressure, putting a Pt plate on the surface of monolayer. The film area and surface pressure were continuously

recorded using a software provided by KSV Instruments® Ltd. The overall dipole moment perpendicular to the air/water interface μ_{\perp} (according to [19,20]) is given by: $\mu_{\perp} = \frac{A_{\pi} \Delta V_{\pi}}{\pi \cdot 0.12} + \Psi_0$ where A_{π} and ΔV_{π} are the molecular area and the surface potential at the defined surface pressure π , in nm^2 and millivolt units, respectively; Ψ_0 is the potential difference of the ionic double layer of the ionized peptide film (Ψ_0 values are practically the same because of the surface charge density is identical for both peptides). The overall dipole moment perpendicular to the air/water interface μ_{\perp} is the resultant of three contribution: $\mu_{\perp} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3$ [20,21]. μ_1 comes from the oriented water molecules around the hydrophilic portion of the amphiphilic peptide; μ_2 is the contribution of hydrophilic end corresponding to the lysine residues (equivalent to the polar head group in the lipids) and μ_3 comes from the hydrophobic portion of the peptide corresponding to the leucine and tyrosine domains (equivalent to hydrocarbon chains in lipids), see Fig. 1b.

2.3. Brewster angle microscopy

Peptide monolayers were spread on the surface area closed by the electrodes fixed on the interface and inside the illuminating area (see below). The films were directly observed by using a Brewster Angle Microscope (BAM) coupled to an EP3 Imaging Ellipsometer equipment (Accurion, Göttingen, Germany) with a 20x objective (Nikon, Japan, NA 0.35). The adequate amount of peptide was spread on the surface to achieve a high packing of around 55 mN/m. The imaging acquisition were sequentially taken each 10 min after UVB illumination, in order to detect change induced by UVB light on the peptide monolayer. Results obtained with BAM were compared with the spectrums obtained by using RAMAN Microscopy and Fluorescence Microscopy (FM).

2.4. Illumination device coupled to BAM

The UV 265 nm lamp was fixed on the top of the trough of BAM

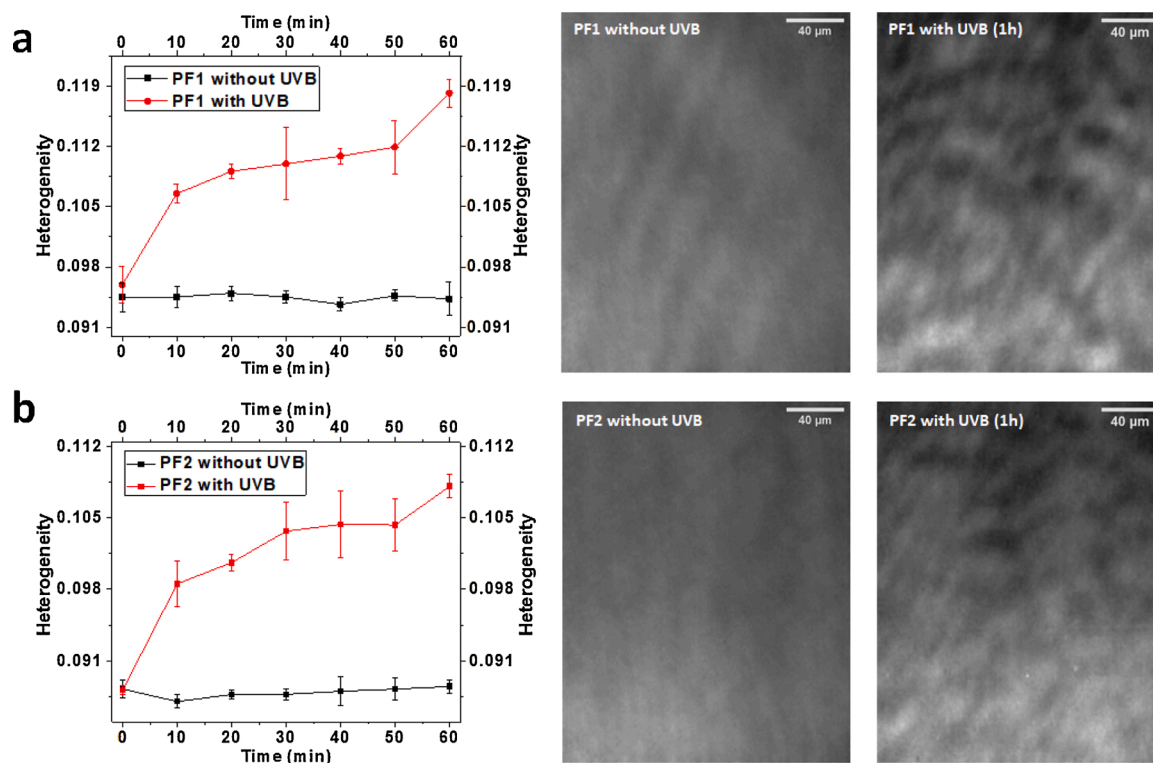


Fig. 2. Heterogeneity of Tyrosinated peptide films upon UVB illumination. a, Heterogeneity analysis of BAM imaging for non-illuminated film (black) and UV-illuminated film (red) for PF1. b, Heterogeneity analysis of BAM imaging for non-illuminated film (black) and UV-illuminated film (red) for PF2. BAM images for PF1 (right upper part) or PF2 (left lower part) after one hour of UV illumination. Have a note that PF1 is more heterogeneous than PF2. The BAM image contrast were enhanced for a better visualization.

equipment; thus, the UV light hits on the monolayer. The laser BAM hits inside the centre of the circular illuminated area. The images from the monolayer were take each 10 min for one hour.

2.5. Heterogeneity measurement

It was taken several (> 10) images from BAM equipment coupled to UVB illumination device after each illumination round. The illumination rounds were each 10 min until 1 h for two peptide monolayers separately. The images were processed with FLJI-Image J software. We determine the heterogeneity from the brightness intensity of all the images obtained, comparing the standard deviation of grey values ratio to grey media values.

2.6. Setting of electronic measurements

In both measurements (conductivity and diode behaviour) a more description of the in-house settings is given in Supplemental Material.

The monolayer was illuminated using a UVB 265 nm lamp (Thorn Labs catalogue model M265L3). The surface electrodes were fixed on the interface and inside the illuminating area. Appropriate amount of peptide (dissolved in pure high quality DMSO) or lipid (dissolved in high quality chloroform) was spread on the surface area closed by the electrodes for each experimental condition in order to achieve a high packing condition (around 55 mN/m). Before illumination and/or conductivity measurement the film was left by 3–5 min.

2.7. Conductivity measurements

Conductivity measurements were performed in three different experimental conditions: *i*) without monolayer illumination and without polarization; *ii*) without monolayer illumination but under film polarization and *iii*) with monolayer illumination and under film polarization

(see Fig. 3). In all cases, measurements were recorded during one hour using SerialPlot software and, in the third experimental condition described above, the UVB illumination was kept constant during all the time. The ad-hoc designed electronic device measures the resistance of the film. The resistance scores were transformed to conductivity values taking into account the electrode diameter and the separation distance between them at the surface. See Supplementary data for further details.

2.8. Diode behaviour measurements

The measurement was performed using two experimental conditions: *i*) without monolayer illumination and *ii*) after five-hour of monolayer illumination. Measurements were recorded during one hour using the PuTTY software. In this case, our in-house circuit measures the current with voltage variation from gate to drain in the range from -8 V to 8 V. The current from gate to drain was predominant to the current from source to drain. See Supplementary data for further details.

3. Results and discussion

3.1. Surface properties and dipolar organization of Tyrosinated amphiphilic peptides

We designed two amphipathic peptides with quite similar surface properties but differing in its surface dipolar organization. PF1: Ac-NH-KKGALLLLGYYY-CONH₂ has its hydrophilic domain at the N-terminus (N_t) whereas its retroisomer PF2: Ac-NH-YYGLLLLLAGKK-CONH₂ at the C-terminus (C_t). Both peptides behave a lipid-like behavior at air water interface and are orientated perpendicular to the interface with the (TYR)₃ domain towards the air end and the hydrophilic (LYS)₂ in contact with water (see Fig. 1). Each peptide was acetylated at the N-terminus (Ac-NH-) and amidated at C-terminus (-CONH₂) to avoid effects of ionic groups on both extreme.

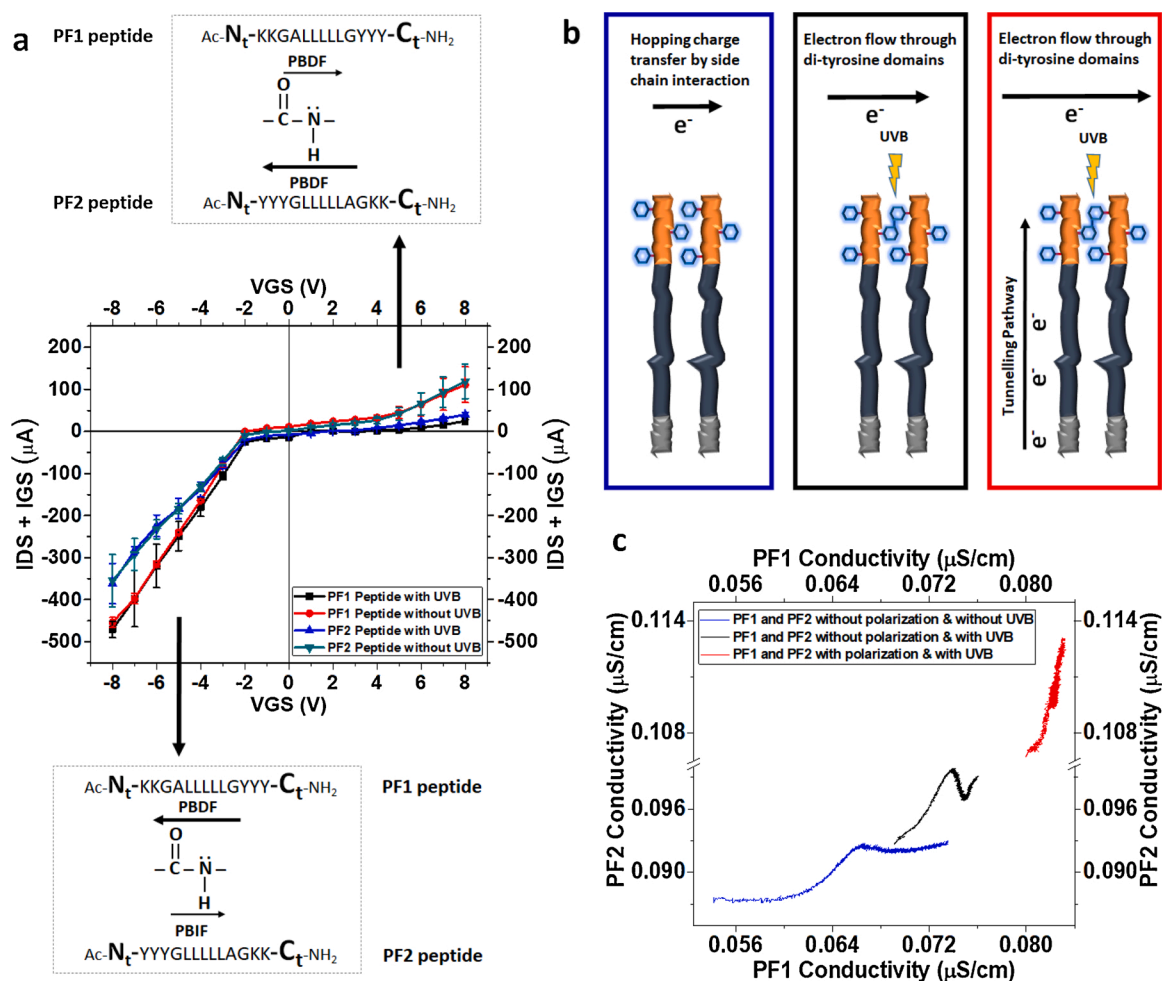


Fig. 3. Conductivity and current-voltage dependence of PF1 and PF2 peptides. **a**, Peptide diode behaviour representation with their respective directions and relative magnitudes of the current electron flow through the oriented tyrosinated peptide backbone from N_t to C_t for PF1 (water to air) and from C_t to N_t for PF2 (water to air). **b**, Schematic diagram of each experimental condition during conductivity measurements, (**blue**) polarization and UVB light in off mode, the electron flow is by hopping charge transfer by side chain interaction [25]; (**black**) polarization in off mode and UVB light in on mode, the electron flow throughout the di-Tyr domains; (**red**) polarization and UVB light in on mode, electron flow throughout the peptide backbone by tunnelling covalent pathway [9] summed to electron flow throughout the di-Tyr domains. **c**, comparative conductivity values of PF2 vs. PF1 peptide according to the conditions displayed in **b** by the respective colour (note that PF2 conductivity is higher than PF1 peptide in all experimental conditions). These values are built from the conductivity vs time plot showed in Fig. S4. The acronyms **PBDF** and **PBIF** mean the **Peptide Bound Direct Flow** and **Peptide Bound Inverse Flow**, respectively; see the text. For a schematic draw of the circuit to measure the conductivity and current-voltage dependence refer to Fig. S4.

The π -A isotherms show a typical profile similar to those observed for hydrophobic signal sequence peptide [22]. Both peptides have a high stability with a collapsing point of around of 55 mN/m and limiting molecular area (at high packing) of around $1.12 \text{ nm}^2 \cdot \text{molecule}^{-1}$ (Fig. 1A). The perpendicular cross-section of this molecular area is compatible with a β -extended structure perpendicular at the air-water interface [22]. In this interfacial organization, each peptide is in contact with the interfacial water through the LYS residues domain corresponding to the hydrophilic end portion (equivalent to the polar head group of a phospholipid).

The reversion in the sequence imposes a small difference in the overall dipole moment of PF2 compared to PF1, step up the idea of a parallel orientation of the peptide bond with respect to interface regardless of backbone orientation of the extended beta sheet [22]. Thus, as expected, the surface potential and overall dipolar moment μ_{\perp} found for both peptides only display minor differences, with some particular behaviour upon compression, (see Fig. 1 and Material and Methods). The analysis of the dipolar moment of PF2 compared to PF1 shows an experimentally difference in dipolar organization at the interface at high packing, close to 55 mN/m (Fig. 1C).

At low packing, around 5–10 mN/m, the overall μ_{\perp} of PF2 is more positive than PF1 and the value is reversed at high packing, see Fig. 1c. This difference is probably due to a higher dependence of $\mu_1 + \mu_2$ (water molecules and hydrophilic end, see Material and Methods) with packing for PF2 in relation to PF1. Accordingly to the theoretical interpretation of surface potential in monolayers [19], the average dipolar moment μ_{\perp} is due to the effective perpendicular moment $\bar{\mu}$, making some angle θ with respect to the vertical to the interface, i.e. that $\mu_{\perp} = \bar{\mu} \cos \theta$. Assuming a close perpendicular orientation of both peptides at the interface is possible to calculate the relative angle of tilting assuming that the orientation at high packing corresponds to a $\cos \theta = 1$. The change in the orientation angle of $\mu_1 + \mu_2$ contribution (the lysine residues and the amide group given by the domain -GKK-CONH₂ plus the hydration water) for PF2 is around 46° when it is compressed from 5 to 55 mN/m, whereas the value for PF1 with its hydrophilic domain Ac-NH-KKG- is about 36° . This is indicating a more rigid hydrophilic portion for PF1 compared with PF2 (or less compression dependence). We commented additional details in Supplementary data (see, Fig. S1).

3.2. Surface cross-linking formation of tyrosinated peptides upon UVB illumination

After spreading, both tyrosine-rich amphiphilic peptides were exposed to UVB illumination for a period of time by using a UV LED lamp (see Fig. S2 for details). At regular intervals, we corroborate the formation of di-Tyr by monitoring the typical fluorescence emission at 410–420 nm [23,24]. We have also validated the formation of both di-Tyr and iso-di-Tyr by using RAMAN microscopy (see Fig. S3 for details).

3.3. Post-illuminated tyrosinated peptides based nano thick sheet

We coupled our UVB illumination source setting to a Brewster Angle Microscopy (BAM) trough to investigate if the di-Tyr formation after illumination induces interfacial heterogeneity at the interface. We performed BAM before and after UVB illumination and the images were taken every 10 min of interval. We observed heterogeneity after illumination in both peptides. However, PF1 shows a detectable more roughness than PF2 (see Fig. 2). The heterogeneity is deduced from the reflectivity values of the films after illumination. The observed heterogeneity after illumination of both peptides is attributable to changes in the surface organization of the film due to the cross-linking of Tyr domains in PF2 peptide and, also to the formation of iso-di-Tyr in PF1 peptide (see Fig. S3b). We estimate the heterogeneity by using the standard deviation ratio to media comparing the brightness intensity throughout all the BAM image (see Material and Methods and Supplementary data for details). In comparison, PF1 shows more heterogeneity than PF2 after one-hour of UVB illumination (Fig. 2a and b). The greater heterogeneity observed in PF1 peptide may be related to the coexistence of different types of cross-linking (di-Tyrosine and iso-di-Tyrosine) compatible with the different pattern obtained by using RAMAN and fluorescence spectroscopy (compare Fig. S3). Thus, we show that it is possible to design peptide-based sheets with predefined chemical and peculiar semiconductor properties (discussed below).

3.4. Semiconductor properties of tyrosinated peptides

We have designed three electronic devices for: d1) to switch on-off the UVB lamp to illuminate the peptide film to induce di-Tyr formation; d2) to measure the lateral film conductivity and d3) to measure the transversal $C_t \rightarrow N_t$ and $N_t \rightarrow C_t$ current-voltage dependence of the spread peptide film at the air/water interface. Also, we coupled to this device the UVB illumination source allowing us the simultaneous measuring of conductivity upon illumination. The UVB light over the negatively polarized plate (polarization) below the tyrosine rich peptide monolayer induces a photoelectric effect. This can be measured by the changes in the peptide monolayer resistance by releasing electrons up the plate towards the interface (see schematic representation of the experimental setting in Fig. S4 of Supplementary data).

In all conditions we observed a higher conductivity for PF2 compared with PF1 peptide. Some authors had proposed that an increase in the electrical conductivity of the delocalized electrons in aromatic amino acids when they dynamically interact through near side chains causing hopping charge transfer [25,26]. This could explain the higher lateral electron flow (conductivity) in the C_t to N_t (water to air) orientation of PF2 peptide than in the N_t to C_t (water to air) orientation of PF1 peptide when polarization and d1 mode is off, (see Fig. 3b blue box and 3c blue curve).

When d1 is on and the polarization is off (see black box in Fig. 3b), the relative lateral conductivity in PF2 is higher with respect to PF1 (compare black box with the blue curve in Fig. 3c). This effect is due to the augmented interchain conductivity through the di-Tyr formation upon UVB-illumination. In the third condition, when d1 and polarization are in on mode (see Fig. 3b red box and 3c red curve) besides the lateral interchain conductivity throughout the di-Tyr domain, we

observed an additional intrachain conductivity due to the peptide backbone by tunnelling pathway [9] (red box representation in Fig. 3b and red curve in Fig. 3c).

A fact to be highlighted that pure lipid monolayer (DMPC) has much less conductivity when compared with both PF1 and PF2 monolayer peptides. So, lipids not only impose a higher resistance barrier across the membrane (in transversal way) but also impose a very low conductivity in the lateral electron current movement (see Fig S4). The non-tyrosinated KL and LK retroisomer peptides have similar lateral conductivities properties regardless of the isomerism (molecular asymmetry) (see Fig S4). Thus, it would appear that the inclusion of a tyrosine domain far away from the hydrophilic portion in the $C_t \rightarrow N_t$ backbone orientation facilitates the electron flow.

Thus, the sequence reversion does not affect the surface properties (lateral stability) but it is substantially affecting the conductivity (and semiconductor) properties as well as the diode-like behaviour as it is mentioned below.

We measured the current by scanning a range of voltage polarization from -8 V to $+8$ V. Thus, we measured the changes in $I_{D,S}$ (drain to source current) + $I_{G,S}$ (gate to source current) under desired voltage polarization after 5 h of UV illumination (the highest degree of tyrosine cross linking), see Fig S4. The results show that both peptides PF1 and PF2 have a diode-like behaviour.

We observe a different behaviour in the current flow in illuminated film (with di-Tyr formation) respect to the non-illuminated condition. Illuminated peptides, show lower resistance to the current flow than non-illuminated condition (Fig. 3a upper panel). However, as we show in Fig. 3a lower panel, the diode behavior was similar in both conditions (illuminated vs. non-illuminated), but it is noteworthy that PF1 showed more absolute current than PF2 (Fig. 3a lower panel). It is clear that the formation of di-Tyr increases the diode-like behaviour in both peptides (see Fig. 3a, upper panel). For comparison, we have used clean air-water interface and non-tyrosinated KL and LK retro peptides as controls [17]. In all cases, the behavior of non-tyrosinated peptides shown a more resistance property compares with the tyrosinated ones (Fig. S4), indicating that not only the direction of peptide backbone is important, but also the specific amino acid sequence.

Others authors have indicated that the paths of the electron transfer process are localized in the backbone [27]. In the peptide bond, nitrogen (N) is the donor [28] whereas oxygen (O) from the carbonyl group is the acceptor with a higher electronegativity [29,30]. This is determining the polarity in the peptide bond creating a way for electron flow through the backbone. So, it is expected that the electrons flow is favoured from N to O which is assimilable to the C_t to N_t direction. We named this direction of electrons flow as "Peptide Bound Direct Flow" (PBDF). Thus, the less favourable electrons flow direction from O to N is assimilable to N_t to C_t orientation. This less favourable electrons flow direction is defined as "Peptide Bound Inverse Flow" (PBIF). In PF1, from tyrosines to lysines domain, the electrons flow is favourable but, the reverse, from the lysines to tyrosines is unfavourable as we exactly found in the inverse situation for PF2 (Fig. 3a).

In this connection, some authors shown that the electron transfer rates depend on the direction along the peptide backbone [31], specifically it is faster from C_t to N_t terminus than the opposite direction [32]. However, we presented two reverse peptides with a β -sheet conformation with its individual dipole moment in the same direction and with close values (Fig. 1b). This is indicating that for electron flow is more important the orientation of the peptide backbone that the overall value of the dipole moment. At the surface, however, the structural orientation of the peptide backbone in α -helix is different [22] and it was reported that the dipole moment has a major influence on the electron transfer [33,34] accelerating it in the same α -helix peptide backbone direction [33]. Thus, our data indicated that in oriented extended β -sheet peptides the conduction from C_t to N_t is faster than N_t to C_t (Fig. 3a). Similar conclusion was reached by using α -helical polyalanines adsorbed on gold surfaces [32] in accordance with Page et al., who emphasizes that

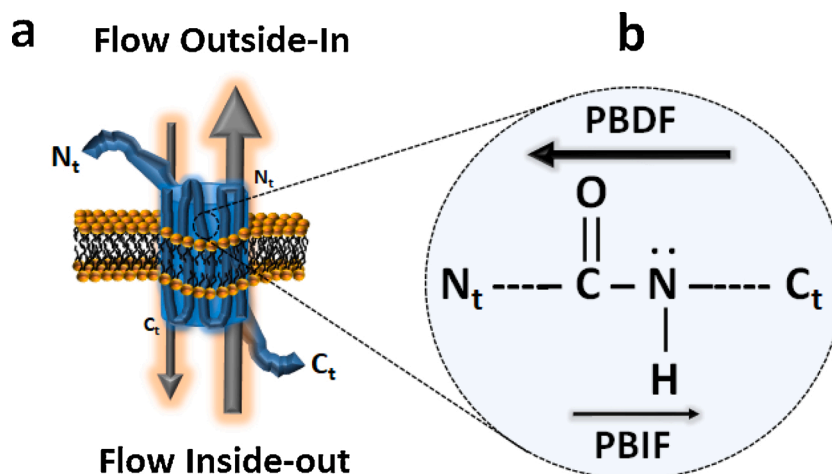


Fig. 4. Cartoon representation of a hypothesized asymmetric transmembrane flow information. **a**, Asymmetric representation of a (multi)spanning transmembrane protein domain showing the different in-out bi-directional transmembrane information flow. **b**, Zoom in of the transmembrane segment showing the peptide bond direction flow. PBDF, peptide bond direct flow; PBIF, peptide bond inverse flow. The facilitated information flow is showed by a bigger arrow.

the electron transfer process in proteins is given regardless of the conformation and heterogeneity [27]. However, according to our results it is legitimate to consider that there are differences in the behavior of electron flow that depends on the peptide bond direction. Indeed, we have observed changes in the conductivity of oriented tyrosinated peptides, either the direction or $N_t \rightarrow C_t$ or $C_t \rightarrow N_t$. In this connection, but with a different approach, it was recently reported that the conductance in protein-ligand systems is sensitive to the charge and the nature of chemical electrical contact between them [35,36]. On the other hand, we constructed a conceptual assimilation of peptide bond backbone to an inorganic semiconductor with diode behavior (see Fig S4 and additional text in Supplementary data).

3.5. Significance of the findings

Some authors have point out that the biological role of electronic conductance in proteins is largely unknown [36]. Extrapolating our experimental data to proteins embedded in lipid bilayers, regarding to information flow across of membranes, we hypothesized the probably importance of its intrinsic asymmetry. Although amphipathic helices are known as model of transmembrane segment of membrane proteins, there are also a lot of experimental evidences of β -sheet structure in such types of proteins. Examples are the well-known β -barrel proteins [37] added to the reported plasticity of membrane proteins to fold either in α -helix- β -sheet arrangement in some membrane proteins involved in cell-virus fusion and amyloids in presence of a defined lipid environment [38].

Fig. 4 shows a cartoon representation of a hypothetical membrane protein with its N-terminus inside and its C-terminus out. As we discussed above, electronic information is different since the electrons have less resistance to flow from C_t to N_t compared to the reverse ones (Fig. 4a). This peculiar behavior conducted us to give an additional conceptual framework of a transmembrane segment in β -sheet configuration (but may extended also to α -helix segment). So, each transmembrane peptide not only is given structural stability as being part of the membrane in a high amphipathic environment with restriction imposed by the lipid bilayer but, different to the lipids, it also gives asymmetric in the in-out electronic information that can be fluxed throughout them.

The increased conductivity due to 265 nm UVB light exposure may have applications in optogenetics [39]. The therapeutic treatments for neurological disorders is limited due of the lack of scalable biomaterials at molecular level for neuronal systems that allow functionalization of cell surface with specific bimolecular array for repairing damage in

some specific neurons with minimal immune response [40]. On the other hand, the conductivity behavior of organized amphiphilic tyrosinated peptides upon illumination may be suggesting a peptides sheet (Fig. 2) based substrate for the construction of bioinspired organic solar cells instead of organic polymers [41,42].

4. Conclusions

The focus of this work was the study of two reversing sequence amphiphilic synthetic peptides with a lipid like behavior at air/water interface. In the hydrophobic region, both peptides have an enriched tyrosine domain able to form di-tyrosines upon surface UVB illumination. Both peptides are able to laterally conduct electrons almost 8 times higher than phospholipids. The conductivity of the confined peptide depends on the peptide bond backbone orientation being the $C_t \rightarrow N_t$ flow more efficient than the $N_t \rightarrow C_t$ ones. The di-Tyr formation increases the conductivity properties of both peptides, suggesting that the laterally formation of cross-linking tyrosines enhance lateral conductivity. When we measured the current-voltage dependence of each peptide under appropriate condition, we evaluate that both have semiconductor diode-like properties. We propose that this conductivity asymmetry may be of biological importance in transmembrane proteins given a novel conceptual framework at molecular level to explain the modulation of in-out information flow in asymmetric biomembranes.

CRedit authorship contribution statement

ABA has done all the experimental work and formal analysis. MP has done all the electronic device, acquisition system and in-house software for conductivity measurements. SP and GDF have been done the conceptualization of the main idea and the design of the sequence of the peptides, writing and editing of the paper.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgements

Authors would like to thank to the support received from CONICET (Argentina), ABA and GDF are fellow and member of research career from this National Institution, respectively

We also thank grants and support from FONCYT (PICT 2016-1010), Argentina, SECyT-UNC (Argentina) and from Aalborg University

Hospital (Denmark).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111734>.

References

- [1] M. Berggren, A. Richter-Dahlfors, *Organic bioelectronics*, *Adv. Mater.* 19 (2007) 3201–3213.
- [2] P.A. Guertin, Central pattern generator for locomotion: anatomical, physiological, and pathophysiological considerations, *Front. Neurol.* 3 (2012) 183.
- [3] C.E. Holt, K.C. Martin, E.M. Schuman, Local translation in neurons: visualization and function, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26 (2019) 557–566.
- [4] T.C. Sudhof, Synaptic neurexin complexes: a molecular code for the logic of neural circuits, *Cell* 171 (2017) 745–769.
- [5] N.R. Wilson, C.A. Runyan, F.L. Wang, M. Sur, Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo, *Nature* 488 (2012) 343–348.
- [6] A.J. Heeger, A.G. MacDiarmid, H. Shirakawa, Nobel Prize in Chemistry “for the Discovery and Development of Conductive Polymers”, 2000.
- [7] C.A.E. Hauser, S. Zhang, Peptides as biological semiconductors, *Nature* 468 (2010) 516–517.
- [8] R.A. Marcus, Electron transfer past and future, in: I. Prigogine, S.A. Rice (Eds.), *Adv Chem Phys*, Wiley, 1999, pp. 1–6.
- [9] D.N. Beratan, J.N. Onuchic, J.J. Hopfield, Electron tunneling through covalent and noncovalent pathways in proteins, *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 4488–4498.
- [10] A.A. Stuchebrukhov, Long-distance electron tunneling in proteins: a new challenge for time-resolved spectroscopy, *Laser Phys.* 20 (2010) 125–138.
- [11] I.V. Paribok, Y.-O. Kim, S.K. Choi, B.Y. Jung, J. Lee, K.T. Nam, V.E. Agabekov, Y.-S. Lee, Tailoring a tyrosine-rich peptide into size- and thickness-controllable nanofilms, *ACS Omega* 3 (2018) 3901–3907.
- [12] A.J. Karlsson, R.M. Flessner, S.H. Gellman, D.M. Lynn, S.P. Palecek, Polyelectrolyte multilayers fabricated from antifungal β -peptides: design of surfaces that exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Biomacromolecules* 11 (2010) 2321–2328.
- [13] W.B. Tsai, R.P. Chen, K.L. Wei, Y.R. Chen, T.Y. Liao, H.L. Liu, J.Y. Lai, Polyelectrolyte multilayer films functionalized with peptides for promoting osteoblast functions, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3467–3477.
- [14] J. Lee, I.R. Choe, Y.O. Kim, S.D. Namgung, K. Jin, H.Y. Ahn, T. Sung, J.Y. Kwon, Y. S. Lee, K.T. Nam, Proton conduction in a tyrosine-rich peptide/manganese oxide hybrid nanofilm, *Adv. Funct. Mater.* 27 (2017).
- [15] Y.A. Tan, R.Y. Adhikari, N.S. Malvankar, J.E. Ward, T.L. Woodard, K.P. Nevin, D. R. Lovley, Expressing the geobacter metallireducens PilA in geobacter sulfurreducens yields pili with exceptional conductivity, *mBio* (2017).
- [16] E.W. Schlag, S.Y. Sheu, D.Y. Yang, H.L. Selzle, S.H. Lin, Charge conductivity in peptides: dynamic simulations of a bifunctional model supporting experimental data, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 1068–1072.
- [17] E.E. Ambroggio, B. Caruso, M.A. Villarreal, V. Raussens, G.D. Fidelio, Reversing the peptide sequence impacts on molecular surface behaviour, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 139 (2016) 25–32.
- [18] A. Bolaño Alvarez, B. Caruso, P.E.A. Rodriguez, S.B. Petersen, G.D. Fidelio, Abeta-amyloid fibrils are self-triggered by the interfacial lipid environment and low peptide content, *Langmuir* 36 (2020) 8056–8065.
- [19] G.L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interface*, John Wiley & Sons, Inc, USA, 1966.
- [20] B. Maggio, F.A. Cumar, R. Caputto, Surface behaviour of gangliosides and related glycosphingolipids, *Biochem. J.* 171 (1978) 559–565.
- [21] K.S. Birdi, *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*, Plenum Press, New York, 1989.
- [22] E.E. Ambroggio, G.D. Fidelio, Lipid-like behavior of signal sequence peptides at air-water interface, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 708–714.
- [23] D.A. Malencik, J.F. Sprouse, C.A. Swanson, S.R. Anderson, Dityrosine: preparation, isolation, and analysis, *Anal. Biochem.* 242 (1996) 202–213.
- [24] A. Nevin, D. Anglos, Assisted interpretation of laser-induced fluorescence spectra of egg-based binding media using total emission fluorescence spectroscopy, *Laser Chem.* 2006 (2006).
- [25] R.C.G. Creasey, A.B. Mostert, A. Solemanifar, T.A.H. Nguyen, B. Virdis, S. Freguia, B. Laycock, Biomimetic peptide nanowires designed for conductivity, *ACS Omega* 4 (2019) 1748–1756.
- [26] N.L. Ing, R.K. Spencer, S.H. Luong, H.D. Nguyen, A.I. Hochbaum, Electronic conductivity in biomimetic alpha-helical peptide nanofibers and gels, *ACS Nano* 12 (2018) 2652–2661.
- [27] M.C. Page, C.C. Moser, X. Chen, P.L. Dutton, Natural engineering principles of Electron tunneling in biological oxidation-reduction, *Nature* 402 (1999) 47–52.
- [28] J.-H. Choi, P.E. Hoggard, Ligand field properties of the peptide nitrogen: the sharp-line electronic spectrum of mer-di(3-aminopropyl)amine(glycylglycinato-O,N,N')-chromium(III), *Polyhedron* 11 (1992) 2399–2407.
- [29] W.B. Jensen, Electronegativity from Avogadro to Pauling: part 1: origins of the electronegativity concept, *J. Chem. Educ.* 73 (1996) 11–20.
- [30] L. Pauling, The nature of the chemical bond IV. The energy of single bonds and the relative electronegativity of atoms, *J. Am. Chem. Soc.* 54 (1932) 3570–3582.
- [31] B. Giese, M. Wang, J. Gao, M. Stoltz, P. Muller, M. Graber, Electron relay race in peptides, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 3621–3625.
- [32] S. Sek, A. Tolak, A. Misicka, B. Palys, R. Bilewicz, Asymmetry of electron transmission through monolayers of helical polyalanine adsorbed on gold surfaces, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 18433–18438.
- [33] S. Yasutomi, T. Morita, Y. Imanishi, S. Kimura, A molecular photodiode system that can switch photocurrent direction, *Science* 304 (2004) 1944–1947.
- [34] T. Morita, S. Kimura, Long-range electron transfer over 4 nm governed by an inelastic hopping mechanism in self-assembled monolayers of helical peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8732–8733.
- [35] K. Garg, S. Raichlin, T. Bendikov, I. Pecht, M. Sheves, D. Cahen, Interface electrostatics dictates the Electron transport via bioelectronic junctions, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 41599–41607.
- [36] B. Zhang, W. Song, P. Pang, H. Lai, Q. Chen, P. Zhang, S. Lindsay, Role of contacts in long-range protein conductance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 5886–5891.
- [37] C.L. Hagan, T.J. Silhavy, D. Kahne, Beta-barrel membrane protein assembly by the bam complex, *Annu. Rev. Biochem.* 80 (2011) 189–210.
- [38] V.S. Mandala, J.K. Williams, M. Hong, Structure and dynamics of membrane proteins from solid-state NMR, *Annu. Rev. Biophys.* 47 (2018) 201–222.
- [39] A. Penzkofer, P. Hegemann, S. Kateriya, Organic dyes in optogenetics, in: D. F.J (Ed.), *Organic Lasers and Organic Photonics*, 2018, pp. 13/11–14.
- [40] H. Acarón Ledesma, X. Li, J.L. Carvalho-de-Souza, W. Wei, F. Bezanilla, B. Tian, An atlas of nano-enabled neural interfaces, *Nat. Nanotechnol.* 14 (2019) 645–657.
- [41] D. Wöhrle, D. Meissner, Organic solar cells, *Adv. Mater.* 3 (1991) 129–138.
- [42] J.L. Bredas, J.E. Norton, J. Cornil, V. Coropceanu, Molecular understanding of organic solar cells: the challenges, *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 1691–1699.

$A\beta$ -Amyloid Fibrils Are Self-Triggered by the Interfacial Lipid Environment and Low Peptide Content

Alain Bolaño Alvarez,[¶] Benjamín Caruso,[¶] Pablo E. A. Rodríguez, Steffen B. Petersen, and Gerardo D. Fidelio*



Cite This: *Langmuir* 2020, 36, 8056–8065



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

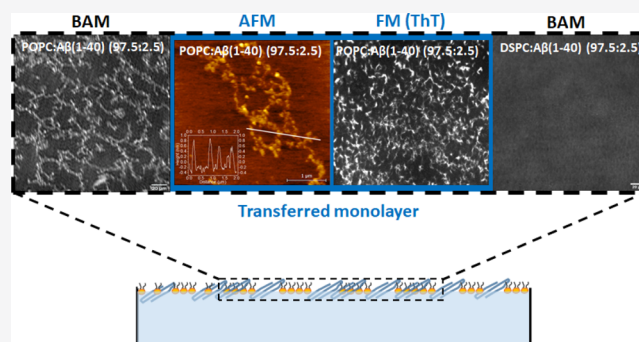


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: We studied the surface properties of $A\beta(1-40)$ amyloid peptides mixed with 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) (liquid state) or 1,2-distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC) (solid state) phospholipids by using nanostructured lipid/peptide films (Langmuir monolayers). Pure $A\beta(1-40)$ amyloid peptides form insoluble monolayers without forming fibril-like structures. In a lipid environment [phospholipid/ $A\beta(1-40)$ peptide mixtures], we observed that both miscibility and stability of the films depend on the peptide content. At low $A\beta(1-40)$ amyloid peptide proportion (from 2.5 to 10% of peptide area proportion), we observed the formation of a fibril-like structure when mixed only with POPC lipids. The stability acquired by these mixed films is within $20-35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ compatible with the equivalent surface pressure postulated for natural biomembranes. Fibrils are clearly evidenced directly from the monolayers by using Brewster angle microscopy. The so-called nanostructured fibrils are thioflavin T positive when observed by fluorescence microscopy. The amyloid fibril network at the surface was also evidenced by atomic force microscopy when the films are transferred onto a mica support. $A\beta(1-40)$ amyloid mixed with the solid DSPC lipid showed an immiscible behavior in all peptide proportions without fibril formation. We postulated that the amyloid fibrillogenesis at the membrane can be dynamically nano-self-triggered at the surface by the quality of the interfacial environment, that is, the physical state of the water–lipid interface and the relative content of amyloid protein present at the interface.



INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in older individuals. Although the major risk is the age, the pathogenesis and degenerative processes are not well known and it can be undetectable a decade before the symptoms become noticeable.¹ However, in postmortem tissue samples, AD is characterized by two neuropathological lesions found in the brain, neuritic plaques accompanied of an extracellular insoluble core of amyloid peptides ($A\beta$ peptides) and intracellular filamentous aggregates of phosphorylated tau proteins denominated neurofibrillary tangles.^{1,2}

It is known that the $A\beta$ peptides (of 1–40 and 1–42 residue lengths) are generated from the proteolytic (mis)processing of the amyloid precursor protein (APP) by two different modes: the nonamyloidogenic and the amyloidogenic pathways.^{1,3} In the nonamyloidogenic pathway, APP is sequentially cleaved by α - and γ -secretases and endocytosed, resulting in an endosomal production of nonamyloidogenic P3 peptide. The amyloidogenic pathway is characterized by the (over)production of insoluble and neurotoxic $A\beta$ fragments (1–40 and 1–42) from the cleavage of APP by β - and γ -secretase, resulting in the formation of $A\beta$ oligomers which are the precursors of the

aggregate plaques.⁴ This vision is known as the consensus β amyloid hypothesis.¹

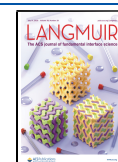
The proteolytic process of APP to generate $A\beta$ peptides is necessarily associated with the membrane environment; however, the implication of the membrane lipids in the early events of pathological aggregates has been neglected or rather, it has been given a more passive role. In this connection, membrane raft (or its more accurately definition as transient lipid nanodomains)⁵ has been implicated in the $A\beta$ accumulation and AD.^{6–8}

1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) is a pivotal lipid in natural membranes because of its importance in the structure and function of cellular membranes.⁷ POPC is the most abundant phospholipid in brain compared to the rest of phospholipids.⁹ It has been reported that the phospholipid

Received: February 19, 2020

Revised: June 17, 2020

Published: June 18, 2020



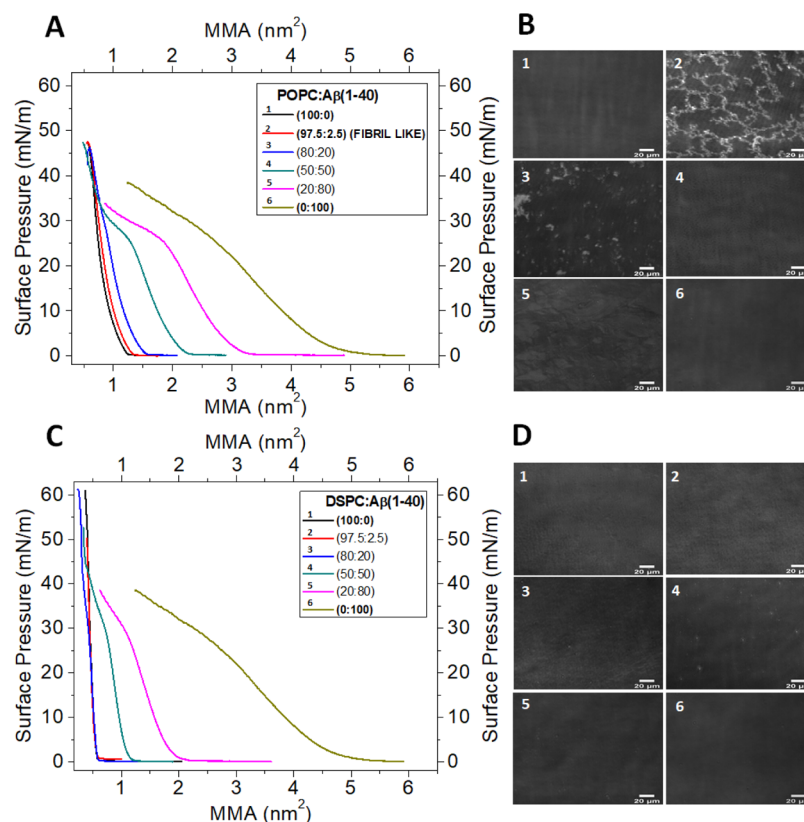


Figure 1. Surface behavior of $A\beta(1-40)$ peptide in mixed films. π -area isotherms for (A) POPC/peptide or (C) DSPC/peptide mixtures and their respective BAM images (B,D) obtained at $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ in pure films or the mixture at the indicate lipid-amyloid percentage of PAP (showed in the inset). The corresponding lipid/peptide mole fraction proportion for POPC/ $A\beta(1-40)$ peptide for each isotherm was 1:0; 0.995:0.005; 0.952:0.047; 0.835:0.164; 0.558:0.441; 0:1. The corresponding lipid/peptide mole fraction proportion for DSPC/ $A\beta(1-40)$ peptide for each isotherm was 1:0; 0.997:0.003; 0.971:0.029; 0.892:0.108; 0.674:0.326; 0:1. At the POPC/ $A\beta(1-40)$ mixture at 97.5:2.5 of PAP, the mixed film shows fibril-like structures (picture B-2), but the picture B-3 at 80:20 of PAP shows domains, indicative of a different immiscibility behavior. Conversely, DSPC/ $A\beta(1-40)$ mixtures at the same PAP proportions showed a different behavior (solid-solid immiscibility at all proportions, see the text). MMA: mean molecular areas of the mixed film were calculated, as indicated in the [Experimental Section](#). The solid bar in the pictures represents $20 \mu\text{m}$. A greater detail of the profile of π -A isotherms at low $A\beta(1-40)$ peptide content can be seen in [Figure S1](#).

level in brain decreases with age by almost 50% between age 40 and 100 years.¹⁰ This apparent “physiological” change with age has induced some authors to suggest that the decrease of phospholipid levels in brain could be related to AD,⁷ specifically POPC.^{11,12} Furthermore, from studies in CSF (cerebrospinal fluid), which is the most informative sample for monitoring the pathological processes in brain, it has been suggested that an increase in POPC hydrolysis could be associated with AD.¹³

APP is a transmembrane protein; thus, the proper interaction with membrane phospholipids or a nonleakage processing of $A\beta$ peptides would contribute to the normal homeostasis in brain. According to the $A\beta$ amyloid hypothesis, the nonphysiological accumulation of $A\beta$ peptides would trigger early oligomerization and neuronal injury and further dissemination of AD.¹ Therefore, taking into account that phospholipids provide an optimal environment to the membrane protein function and contribute to the normal neuronal ionic homeostasis, many authors have focused their studies to the interaction of $A\beta$ peptides and derivatives with lipids using membrane model systems. Particularly, the electrostatic interaction of 25–35 segments of $A\beta$ peptide with negatively charged phospholipid vesicles¹⁴ and the complete $A\beta(1-40)$ sequence with anionic lipid monolayers has been reported.¹⁵

Langmuir monolayers at the air-water interface are a proper technique to study the interfacial behavior of film-forming peptides mixed with lipids. The potential of this approach to study the surface properties of $A\beta$ amyloid peptides has been highlighted by Leblanc and co-workers.¹⁶ Langmuir monolayers allow manipulating the lipid/peptide mole ratio, the amount of the percentage of peptide area proportion (PAP), the physical state of the lipid, and the degree of lateral compactness in a confined environment, mimicking a biological membrane interface. $A\beta$ peptide (either 1–40 or 1–42) is part of the anchoring membrane domain of APP and is very hydrophobic. We have previously described that $A\beta(1-42)$ forms insoluble monolayers at the air-water interface with a lateral stability of around $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and a molecular area at maximal packing of around $2.5 \text{ nm}^2/\text{molecule}$.¹⁷ In the previous report, using giant unilamellar vesicles (GUVs), we described the strong interaction of $A\beta(1-42)$ with GUVs provoking both (i) the reduction of lateral membrane cohesive forces and (ii) the breaking of transbilayer gradient causing a time-dependent release of small and large solutes loaded in the liposomes.¹⁷

More recently, we reported that pure $A\beta$ peptides, under the condition that had been proved to form stable and structured β -sheet monomolecular layers at air-water interface, present a peculiar high elastic shear modulus when compared to pure α -

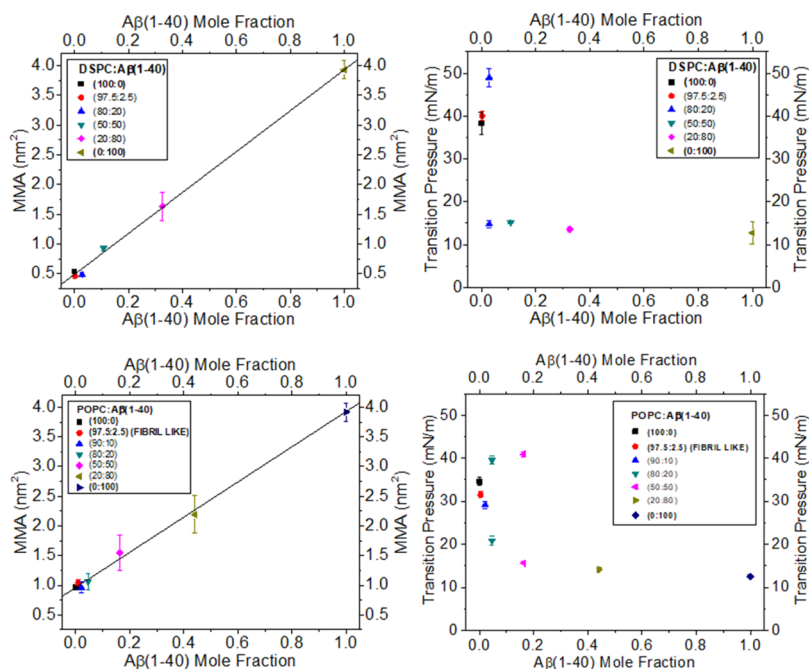


Figure 2. Phospholipid/ $A\beta(1-40)$ peptide miscibility phase diagram. Upper part: phase diagram for DSPC/ $A\beta(1-40)$ mixtures showing lateral immiscibility; left: MMA vs mole fraction taken at $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; right: first collapsing point in the π -area isotherm. Lower part: Phase diagram for POPC/ $A\beta(1-40)$ mixtures. Left: MMA vs mole fraction taken at $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; right: first collapsing point in the π -area isotherm. The POPC/ $A\beta(1-40)$ mixture has a complex miscibility behavior. Here, we included an additional mixture (90:10) for a more complete description of mixing analysis. At POPC/ $A\beta(1-40)$ mixed at (80:20) and (50:50) of PAP proportions the mixture shows lateral immiscibility behavior. At lower $A\beta$ peptide proportion, the mixture shows partial miscibility behavior in which the first collapsing point corresponds to the protein-enriched phase at a value above that observed for pure amyloid (see Figures 1 and S1 for more details). Transition pressure means the first discontinuity point calculated by second derivative of π -area isotherm with respect to area. At intermediate peptide proportions, we also observed a second transition pressure (collapsing point) related to the lipid-enriched phase (see the Experimental Section and Figure S2). The straight black line in the left upper and lower parts corresponds to the ideal molecular area (see the Experimental Section for more details).

helix lytic melittin peptides.¹⁸ A similar behavior was recently reported for the adsorption of the intrinsically disordered C-terminal of the Hendra virus nucleoprotein (N_{TAIL}) to the air-water interface.¹⁹

In the present work, we show that the $A\beta(1-40)$ amyloid peptide forms a fibril-like structure at a particular range of lipid/ $A\beta$ peptide proportion when the mixed surface is dominated by POPC. Certainly, between 2.5 and 10% of $A\beta$ amyloid PAP, the fibril-like structure can be evidenced by thioflavin T (ThT) fluorescence, Brewster angle microscopy (BAM), and atomic force microscopy (AFM). The surface peptide area contribution relative to lipid, PAP, is important when the film-forming molecules have very dissimilar individual molecular areas.²⁰ Percentage of PAP can be calculated from the individual data according to $\text{PAP} = 100(n_p A_p / (n_L A_L + n_p A_p))$, where n_p and n_L are the moles of peptides and lipids in the mixture and A_p and A_L are the individual molecular areas of peptides and lipids, respectively. In addition, we also demonstrate that the fibrillogenesis effect induced by POPC at the air-water interface is sensitive to the physical state of phospholipid because the mixing behavior of $A\beta$ peptide with 1,2-disteraoyl-phosphatidylcholine (DSPC), a lipid in the solid state at room temperature (liquid condensed state in Langmuir monolayer words), shows lateral immiscibility with no fibril formation. The interfacial conditions in which the more natural POPC/ $A\beta$ amyloid peptide mixture induces fibril-like structures strongly depend on lipid/peptide proportion, and it was observable only at low $A\beta$ amyloid proportion.

RESULTS

Surface Properties of $A\beta(1-40)$ in POPC or DSPC Mixed Films. π -Area Isotherms and BAM Analysis. The formation of an insoluble monolayer of many amphiphilic molecules can occur at the air-water interface.²¹ By using a Langmuir trough, the compression of the insoluble monolayer is possible by imposing a movable barrier to generate surface pressure (π)-area isotherms. Surface pressure defined as $\pi = \gamma_0 - \gamma$ is the difference between the pure interfacial tension of water (γ_0) and the surface tension of amphiphilic covered surface (γ) that depends on lateral packing, surface concentration, and miscibility behavior of the components.²¹⁻²⁴ A modern view of the origin of the π value has been related to the changes of surface water activity at the interfacial region.²⁵

According to our previous results, both $A\beta(1-42)$ or the two residues shorter $A\beta(1-40)$ have almost identical behavior in monolayers at the air-water interface.^{17,18} Pure $A\beta$ peptides form insoluble monolayers at the air-water interface with a maximal lateral stability of around $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and a limiting molecular area at maximal packing of around $2.5 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ (Figure 1). The maximal stability of pure $A\beta$ peptide monolayers is in between the stability acquired by the lytic amphiphilic melittin peptide ($\sim 19 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) and pure phospholipids in liquid-expanded state ($\sim 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).²⁶ Pure $A\beta(1-40)$ peptide films behave as a typical solid films with a very peculiar high rheological property.¹⁸ The BAM imaging of pure $A\beta(1-40)$ films is homogeneous with neither observable fibril-like structure (Figure 1), as we have observed

previously,¹⁸ nor sensitivity to the ThT fluorescent probe (see below and Figure 4).

We studied the surface mixing behavior of A β (1–40) peptides with two phospholipids differing in their physical state at room temperature (23 °C). POPC has a completed liquid-expanded isotherm (Figures 1A and S1). On the contrary, DSPC behaves as completely liquid-condensed isotherm at air/NaCl 145 mM subphase (Figure 1C). An expanded figure on the x-axis to appreciate the isotherms in greater detail can be seen in Figure S1 of the Supporting Information. To observe the influence of A β peptide proportions in the mixture, we have used the following percent of PAP: 97.5:2.5, 80:20, 50:50, and 20:80 calculated, as indicated above. Each value of PAP corresponds to a relative high mole fraction of POPC of 0.995; 0.952; 0.835; and 0.558, respectively (see Figure 1), because of the dissimilar molecular areas of the phospholipid compared with A β (1–40) peptides. This is an important concept to take into account when mixing proteins with lipids in Langmuir monolayers because they have great differences in the individual molecular areas; therefore, a small mole fraction of any protein would correspond to a significant high total surface area occupied, therefore, influencing the surface behavior of the mixture.^{20,26} A β (1–40) peptides mixed with the more solid DSPC phospholipid did not form a fibril-like structure regardless of the amyloid proportion. All of the DSPC/amyloid mixtures show solid–solid immiscibility with a first collapsing point similar to the value found for a pure peptide (Figures 1C and 2 upper part and Figure S1). The BAM pattern is compatible with solid phases without the formation of fibril-like structures. Figure 1D shows the π –A isotherms with the corresponding BAM images taken at 10 mN·m^{–1}. At this lateral packing (10 mN·m^{–1}), the molecular area of A β (1–40) peptide of 3.92 nm²·molec^{–1} (see Figure 1) is higher than POPC (0.94·nm²) or DSPC (0.52 nm²·molec^{–1}); thus, the mixed isotherms move toward greater molecular area values as the mole fraction of the amyloid peptide increases.

The miscibility behavior with POPC is completely different. Mixed films of POPC/amyloid at 97.5:2.5 of PAP form an observable fibril-like structure (see Figure 1B, picture 2). It is important to note that this proportion of PAP corresponds to a mole fraction of amyloid of 0.005. We found this particular behavior with POPC at around this proportion. At this proportion, the fibril-like structures are ThT positive (see and Figure 4). If the A β (1–40) peptide proportion is increased more than 10% of PAP, corresponding to a peptide mole fraction of 0.021, the fibril-like structures disappear and the ThT analysis becomes negative.

In mixed interfaces, the profile and behavior of π –area isotherms allow us to experimentally build the phase diagram,²⁷ see Figure 2. For DSPC/A β peptide mixtures, we found a typical solid–solid immiscibility. For these mixtures, the first collapsing point (first discontinuity in the π –area isotherm, see Figure S2) is compatible with the protein phase and appears independent of the A β (1–40) proportion, indicating solid–solid immiscibility²¹ at all peptide proportions (see Figure 2 upper part).

For POPC/A β peptide mixtures, the miscibility behavior is more complex. At low A β peptide mixtures (less than 10% of PAP or less than 0.03 of peptide mole fraction), the surface miscibility analysis suggests that the mixed POPC/A β (1–40) films are miscible where the first collapsing point has an intermediate value in between the pure POPC or pure A β (1–40) peptide, with the concomitant formation of fibril-like

structures observable by AFM (Figure 1), and becomes ThT positive (Figure 4). At greater A β peptide proportion, the miscibility behavior is almost ideal (Figure 2 lower part).

The complexity of POPC/A β peptide mixed behavior can be appreciated from a more perusal BAM analysis. In order to ascertain the complexity of BAM analysis, we have determined the variation of BAM reflectivity upon film compression for POPC/A β (1–40) mixtures. From the analysis, we were able to discriminate into three well-defined patterns of reflectivity (see Figure 3A highlighted with different colors). The high

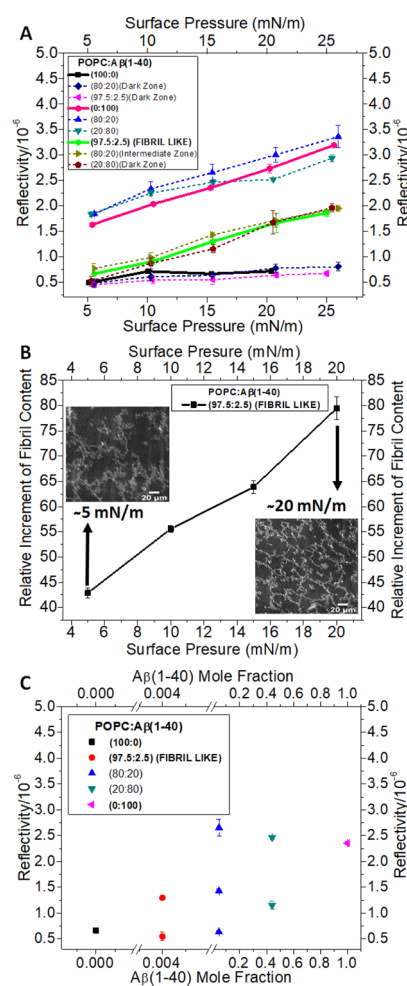


Figure 3. BAM reflectivity analysis of mixed POPC/A β (1–40) films. (A) Reflectivity values indicating the three distinguishable (and measurable) regions in BAM intensity from POPC/A β (1–40) mixtures indicated with three different colors. Low values are close to pure POPC lipid (black); high reflectivity range values were similar to pure A β (1–40) peptides (magenta); and intermediate reflectivity values correspond to fibril-like structures or protein-enriched phases (light green). The inset shows the origin of the data indicating the PAP and the zone where the plotted values of reflectivity were taken. (B) Relative percentage increment of fibril-like formation as surface pressure increases at POPC/A β (1–40) at 97.5:2.5 of PAP proportion; left inset: picture of fibril-like structures taken at low surface pressure, right inset: picture of fibril-like structures taken at high surface pressure. The percentage of relative fibril content in (B) was calculated for each photograph in digital form between an all-black state (0%) and all bright in the grayscale (100%) by using Fiji ImageJ software. (C) BAM reflectivity values of pure POPC, pure A β (1–40), and at different POPC/A β (1–40) proportions taken at the distinguishable domains at 15 mN·m^{–1}.

reflectivity values correspond to pure $A\beta(1-40)$ peptides (pure peptide phase), low reflectivity values are similar to those found for pure POPC lipids (pure lipid phase), and the third one with intermediate reflectivity values are attributable to a more protein-enriched mixed phase including the fibril phase formation. POPC/ $A\beta(1-40)$ at PAP proportions of 97.5:2.5, 80:20, and 20:80, the mixed film domains, have intermediate reflectivity values (Figure 3A). At both extremes, pure POPC or pure $A\beta(1-40)$ peptide films, we have the limits of low and high reflectivity values, respectively. At 97.5:2.5 of PAP (corresponding to a $A\beta$ peptide mole fraction of 0.005), we found the typical fibril-like phase (Figure 3B).

At this particular proportion, the fibril structure grows as the surface pressure increases until almost duplicating the relative domains of fibril-like structures (see Figure 3B). As $A\beta$ peptide proportion increases up to a PAP greater than 20% (above 0.1 of amyloid mole fraction), the mixed films appear with intermediate reflectivity values but no fibril-like structures were detected, and we also observed pure protein domains with high reflectivity. At above 50% of PAP (0.047 of amyloid mole fraction), the mixed surface behaves as pure protein (Figure 3C).

ThT and AFM Analysis of Mixed POPC/ $A\beta(1-40)$ Films. It is well known that the ThT probe has particular fluorescent properties when interacting with fibril-like amyloids in solution^{28,29} or at surfaces by using total internal reflection fluorescence microscopy (FM).³⁰ We have adapted a method to transfer the mixed monolayer to mica support followed of an incubation with a drop of ThT for 10 min and the direct observation by FM (see Experimental Section). We have routinely used this methodology to check if the fibril-like structures observed by BAM of POPC/ $A\beta(1-40)$ films at 97.5:2.5 of PAP are ThT positive. Transferred monolayers, in this proportion, show a fluorescence intensity pattern resembling a fibril-like structure (Figure 4B). We have checked that transferred monolayers of either pure $A\beta(1-40)$ or POPC were ThT negative (Figure 4B). We have quantified the fluorescence intensity of the ThT positive pattern of the fibril-like structure induced by POPC in comparison with the using negative controls (pure lipid and pure peptide, see Figure 4A). We have used fibrils of α -synuclein formed in bulk condition as positive control to check the ThT interaction in a condition similar to that we used in transferred films (see Figure 4B).

DISCUSSION

Any hypothesis about the intimate molecular mechanism of amyloid formation in AD should be based on physiological conditions. The cosolvent effect, higher temperature, or long-period of shaken or combinations of some of them are no normal constraints to trigger amyloid formation in brain. Most of authors converged that the (mis)processing and accumulation of $A\beta$ peptides is initiated at the membrane environment.¹ Recently, the strong interrelationship between lipids and amyloid formation by either the membrane as the promoter of amyloid aggregation or self-assembled forming co-aggregates with lipids that may disturb cell homeostasis has been highlighted.³¹ Both $A\beta$ peptides (1–40) and (1–42) are strongly hydrophobic and they correspond to the trans-membrane segment of the APP protein.¹ Both $A\beta$ peptides are able to form insoluble and stable monomolecular layers at the air–water interface as membrane lipids do, with a relative high lateral stability.^{17,18} Previously, we also demonstrated that $A\beta$ peptide is able to puncture bilayer membranes when the

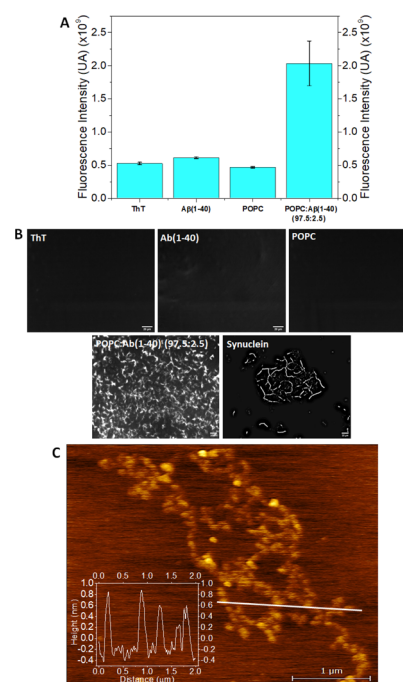


Figure 4. ThT confirmation and AFM observation of amyloid $A\beta(1-40)$ fibrils induced by POPC at the air–water interface. (A) Fluorescence intensity values of transferred films from Langmuir trough (compressed to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) to the solid support after ThT incubation. ThT controls: transferred pure $A\beta(1-40)$ peptide film, transferred pure POPC film; the average intensity of all fluorescence signals without imaging processing is shown. (B) Fluorescence images of negative controls and the fibril-like structure of POPC/ $A\beta(1-40)$ mixed at 97.5:2.5 of PAP compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and then transferred to the mica support. Positive control of α -synuclein formed in bulk condition and transferred to a solid support and incubated with ThT for FM observation. In the lower right corner, the white bar represents $20 \mu\text{m}$. (C) AFM topography imaging from mixed POPC/ $A\beta(1-40)$ at 97.5:2.5 of PAP proportion, compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and then transferred to the mica support; in the inset, the periodicity of the fibril-like structure along of $2 \mu\text{m}$ length is shown (see the big white bar). It is worthy to note that the image of AFM is $4 \times 4 \mu\text{m}$, whereas the BAM image is $200 \times 250 \mu\text{m}$ (see the Experimental Section for more details).

amyloid peptide is externally added to giant liposomes (GUVs).¹⁷ However, in this previous report, we advanced that the lipid/ $A\beta$ peptide miscibility was complex with a great tendency of lateral immiscibility behavior.¹⁷ It is recognized that $A\beta$ amyloid peptides form β -sheet structure at the air–water interface.^{32–34} Depending on the experimental system used, Jiang and co-workers suggested that the structuring in β -sheet conformation may obey a certain pathway with distinguishable intermediates either at the air–water interface, unordered monomer (bulk) \rightarrow α -helix (sublayer) \rightarrow β -sheet (interface),³⁵ or in bulk conditions, amorphous monomer (bulk) \rightarrow colloid-like aggregates (bulk) \rightarrow ordered β -sheet oligomers (bulk) \rightarrow fibrils (bulk).³⁶

The $A\beta$ peptide/lipid miscibility in Langmuir monolayers did not follow the rule similar to other very hydrophobic β -sheet peptides. Indeed, very hydrophobic signal sequence peptides mix quite well with lipids regardless of the lipid phase.³⁷ Another characteristic of pure $A\beta$ amyloid peptide monolayers is its high rheological shear stress at the surface behaving as a two-dimensional solid network with a very low interfacial diffusion coefficient ($D \sim 0.005 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) similar to

or lower than liquid-condensed lipids.¹⁸ In the present report, we confirm our previous study that pure $A\beta$ amyloid peptide monolayers in this solid network did not form fibril-like structures¹⁸ nor they were sensitive to the ThT probe (Figure 4). The presence of nonsolvated liquid-condensed DSPC [a double saturated acyl chain phospholipid that at monolayer working temperature (23 °C) is below its critical transition temperature (54.9 °C)]³⁸ does not promote fibrillation keeping the solid network of $A\beta$ amyloid peptide and shows a solid–solid immiscibility behavior at all DSPC/ $A\beta$ peptide proportions (Figure 1). POPC is the main phospholipid constituent of membrane lipids in brain^{7,9} with a fully liquid-expanded character at air–water interface³⁹ and a critical transition temperature of -3.7 °C.⁴⁰ The introduction of POPC, a more physiological fluid lipid partner at the interface, acts as an inductor of fibril-like structures (see Figures 1B and 3B). This particular and well-characterized behavior is only observed at 2.5–10% of PAP, a small range of $A\beta$ peptide proportion equivalent to 0.005–0.01 of $A\beta(1-40)$ mole fraction in the mixture (Figure 1B). The extent of fibril formation was surface pressure dependent reaching an important and well-defined noncovalent network at 20–30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Figure 3B), a lateral pressure equivalent to bilayer and compatible with membranes.⁴¹ It is important to note that in our experimental conditions, the fibril-like structures that formed as a consequence of the interfacial conditions of peptide proportion, type of lipid, and packing are ThT positive (see Figure 4B). It is widely accepted that the particular reactivity of the fluorescent probe ThT with fibrils is one of the requirements that an aggregate must meet to be considered amyloid.²⁹ In our experimental condition, the ThT-positive amyloid fibrillogenesis only requires 2–5 min of spreading over a physiological saline subphase (NaCl 145 mM at 23 °C), mixed with a normal membrane phospholipid constituent and compressed to an equivalent membrane surface pressure. Therefore, any extreme condition nor artificial co-solvent, high temperature, strong agitation, or long period of incubation time for triggering irreversible amyloid fibrillation was not necessary. It was previously reported that the presence of the lipid-free air–water interface accelerates the formation of amyloids either in $A\beta$ or in α -synuclein peptides.^{42,43} Thus, the required conditions of high bulk concentration, agitation, or long period of incubation time are quite different to those assayed by us. Our approach introduces a more realistic membrane model system with only the presence of a common and natural phospholipid constituent of membranes.

From adsorption experiments, it has been reported that the $A\beta(1-40)$ peptide interacts with the negatively charged polar head groups of POPG/POPC monolayers throughout electrostatic interactions, but with no further penetration into the lipid interface. The interpretation was that the charged surface is acting as local seeding and the β sheet or α -helix content depends on the lipid/peptide mole ratio.⁴⁴ Furthermore, substances that inhibited the state of membrane charges inhibited the toxicity of $A\beta(1-40)$ peptide.⁴⁵ However, the experimental conditions assayed were far to “mimic” a physiological membrane environment because a low ionic strength and high POPG/POPC ratios were employed. However, these results are keeping with ours because the authors remarked that $A\beta(1-40)$ peptide toxicity is mediated by nonspecific physicochemical interactions at the membrane interface. Therefore, all of the data would converge to the concept of highlighting that it is possible that a given particular

condition of the membrane has a more active and harmful role in inducing toxic β amyloid fibrillogenesis.

In our hands, even though $A\beta$ peptides form insoluble and reproducible monolayers,^{17,18} they do not get along with phospholipids. As we have shown, mixed with the solid DSPC, $A\beta(1-40)$ peptide shows immiscibility at all lipid/peptide proportions. This solid–solid lipid/peptide immiscibility in monolayers may be attributable to the strong β -sheet network of $A\beta$ peptide at the interface keeping with a low interfacial solvation and high shear rheology.¹⁸ Here, we demonstrated that this strong β -sheet network of pure $A\beta$ peptide at the interface is ThT negative and does not form a fibril-like structure searched either by BAM or AFM. The interfacial protein concentration in a monolayer at lateral packing compatible with biomembranes (20–30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) is surprisingly high. Taking into account that the molecular area of $A\beta(1-40)$ peptides at 25 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ is about 3 nm^2 and assuming an interfacial thickness of around 2 nm (taken into account the average thickness of AFM image, see Figure 4), it gives a mean surface molecular volume of 6.000 nm^3 ; the real protein surface concentration of a pure $A\beta$ peptide monolayer would reach the huge value of around 0.26 M. This surface concentration corresponds to a protein density of around 1.15 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, that is about the 80% of the reported value for protein density (around 1.35 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).⁴⁶ This is indicating that the local low solvation and high protein concentration of $A\beta(1-40)$ peptide at the interface is not enough to form amyloid fibrils. To trigger amyloid formation at the interface, the joint action of a phospholipid in the liquid state is necessary. We obtained partial miscibility when we introduced POPC as lipid partner in the mixed interface. At POPC/ $A\beta(1-40)$ 97.5:2.5 of PAP (meaning that $A\beta$ peptide contributes with a 2.5% of the total area available of the mixed lipid/protein interface), we clearly see the ThT-positive fibril-like structure. At this particular proportion, we observed slight repulsive interactions according to the miscibility analysis (MMA above to ideal mixed area, Figure 2 lower part). This is keeping with the different BAM reflectivity found for fibril-like structure compared to pure protein, indicating that a change in $A\beta$ peptide conformation is induced by the liquid-expanded environment of POPC. It is noteworthy that this effect occurred when $A\beta$ peptide is surface diluted by the presence of a higher hydrated polar head group of POPC lipid when compared to more solid DSPC lipid. The level of interfacial hydration of phospholipids in different physical states in monolayers was already reported by Brewer et al. by using the properties of fluorescence relaxation of LAURDAN.⁴¹ For liquid expanded interfaces (above phase transition of the phospholipid), the value of LAURDAN GP is around -0.3 , whereas for phospholipid in liquid condensed state, the value of LAURDAN GP is near to 0.5.⁴¹ If we combine these values with the interfacial water activity for liquid expanded phospholipid interfaces proposed by Damodaran,²⁵ the equivalent water activity of our amyloid trigger condition would be around to 0.3, whereas it is expected to be close to 0 for solid phospholipid interfaces. The highly nonsolvated interface of the liquid-condensed phospholipid is not enough to break off the solid arrangement of the $A\beta$ peptide. A more hydrated phospholipid interface (in liquid state) triggers the $A\beta$ peptide conformation to form fibril-like structures with both the typical ThT-positive characteristic and a compatible AFM topography imaging. The hypothesis that the state of interfacial water activity may modulate the formation of fibril-

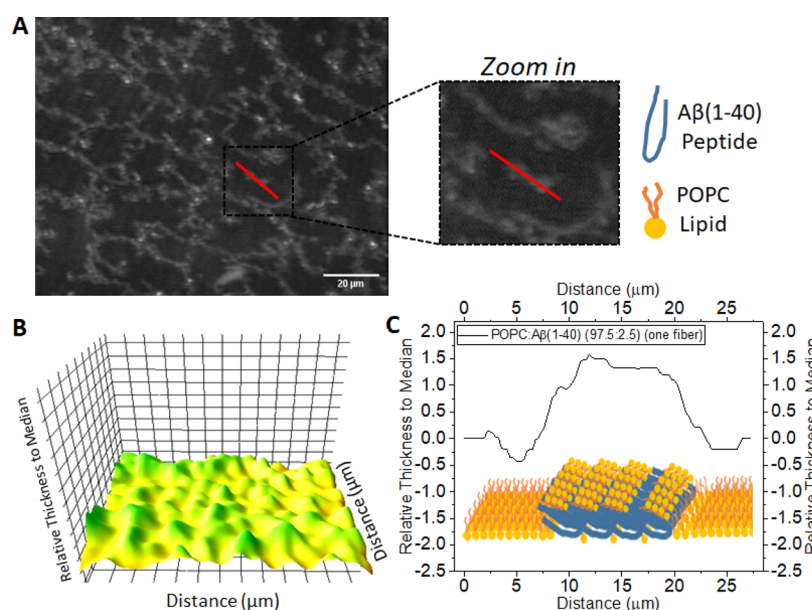


Figure 5. Modeling the fibril-like structure formed by $A\beta(1-40)$ peptides imposed by POPC interfacial conditions. (A) (Left panel) BAM imaging obtained at POPC/ $A\beta(1-40)$ (97.5:2.5 of PAP) showing the interconnected fibril-like structure (higher reflectivity) confining the more enriched POPC phase (lower reflectivity); (right panel) zoom in on the black dot-line square showing details, the transverse red line denotes the pass of the relative thickness plotted in (C) in black line. (B) Three-dimensional representation using the FIJI program showing the relative thickness along the A imaging with false colors, the green color is the maximum height, whereas the yellow color is the minimum. (C) Cartoon view of a possible model of the fibril-like structure formed by lipid-rich coassemblies with $A\beta(1-40)$ peptides in fibril structures keeping the relative thickness of the above zoom-in imaging (approx. $12 \mu\text{m}$ length \times $0.2 \mu\text{m}$ height).

like structure in a liquid-expanded lipid environment is in keeping with the increment of fibrils structure upon film compression, as it is shown in Figure 3B. Indeed, for this type of liquid-expanded phospholipid interface, LAURDAN GP goes from -0.55 to -0.3 with a change in the equivalent interfacial water activity from 0.9 to around 0.3 when the film is compressed from 2 to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.^{25,41} However, at this point, it is necessary to be rigorous and it will be necessary to measure the degree of LAURDAN fluorescence in mixed $A\beta$ -amyloid/lipid Langmuir films, that have not been done yet. We have obtained similar results with 1, 2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a shorter saturated fatty acid phospholipid with a liquid-expanded property equivalent to POPC (data not shown), indicating that the physical state of the phospholipid is critical for $A\beta$ peptide fibrillation. In keeping with these data, a greater binding affinity of $A\beta(1-42)$ peptide for liquid disordered L_d membranes than for liquid ordered L_o environment was reported.⁴⁷ We try to model a 2D lipid/ $A\beta$ peptide organization model in its fibril-like state in accordance with the obtained data (see Figure 5). The fibril-like structures at the interface show intermediate values in BAM reflectivity which it is associated with the refractive index changes on the monolayer. These intermediate values of BAM reflectivity are in between the pure POPC (low values) and high values of the solid arrangement of pure $A\beta$ peptide (see Figure 3).

Probably, the interfacial conditions imposed by the liquid hydrated POPC gives an adequate environment to promote the formation of fibril-like structures of $A\beta(1-40)$ peptide in which the lipid is taking part in the enriched fibril-like phase with a distinguishable intermediate collapsing point in the interface (see the value of collapsing point of this “intermediate phase” corresponding to the red point in Figure 2 lower part right side, of $32 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ and the BAM picture 2 of Figure 1B).

This fibril-like phase has a lateral stability lower than pure POPC of around $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

It is well known that the $A\beta$ amyloid peptides affect the membrane integrity;¹⁷ however the intimate molecular mechanism of membrane disruption or fibril promotion at membranes is not clear yet.³¹ The presence of membranes leading to amyloid peptide aggregation has been proposed by other authors either for $A\beta$ peptides^{48,49} or for α -synuclein.⁵⁰ By using molecular dynamics, the importance of “surface quality” of membrane bilayers in $A\beta$ amyloid binding and fibrillation was already postulated.⁴⁷ The effective participation of phosphatidylcholine in the fibrillation process is supported by the fact that this lipid is found in amyloid fibril deposits in pathologic AD plaques or in Parkinson’s disease.^{51–54} Taking into account the well-probed observation about the active participation of phospholipids in amyloid fibrillogenesis, our experimental pieces of evidence are giving strong biophysical support to the active role of organized phospholipids in the formation of irreversible fibril-like structures in a membrane environment.

CONCLUSIONS

Nano-organized liquid-expanded POPC in lipid monolayers triggers the fibril-like formation structures of $A\beta(1-40)$ peptide at the interface at low PAP. BAM imaging clearly showed protruding fibril structures that are ThT positive and were well visualized by AFM when the nanoarrangements are transferred to a mica support. On the contrary, when the partner lipid of $A\beta(1-40)$ peptides at the surface was the solid DSPC, the amyloid peptide maintains its two-dimensional array and its immiscible lateral behavior without forming amyloid fibrils. The amyloid fibrillation at the interface can be dynamically modulated by the quality of the lipid-phase

environment, the protein area proportion, and the lateral packing.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. $A\beta(1-40)$ ($D^1AEFRHDSGYEVVHQQKLVFFAEDVG^{25}SNKGAIIGLM^{35}VGGVV^{40}$) were purchased from Bachem AG (www.bachem.com). The subphase was NaCl 145 mM. Water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, USA) with a conductivity less than $0.085 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and a surface tension of $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. NaCl from Merck (Göttingen, Germany) was roasted in an appropriate oven at $400-450 \text{ }^\circ\text{C}$ for at least 4 h to eliminate small amounts of surfactant impurities. 1-Pamitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) and 1,2-distearoyl-phosphatidylcholine (DSPC) were purchased from Avanti Polar Lipids, USA. Dimethyl sulfoxide (DMSO) and chloroform were from Merck, Göttingen, Germany.

Peptide and Lipid Monolayer Formation and Compression

π -Area Isotherms. Langmuir monolayer experiments were performed at $23 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. The Langmuir monolayer room was kept at constant temperature with the help of a continuous working individual roof-top air conditioning. Peptide monolayers were formed using a 180 mL volume Langmuir trough. The subphase was unbuffered NaCl 145 mM, pH 5.6. All of the settings were described previously.^{17,18} $A\beta$ peptide and lipids were dissolved in pure DMSO and chloroform, respectively, into stock solutions of about 10 mM. Individual diluted working solutions were freshly prepared to $\sim 1 \mu\text{M}$. Phospholipids were dissolved in pure chloroform and $A\beta(1-40)$ in pure DMSO. For mixed monolayers, peptide and lipids were premixed in solution at the desired proportion just before to perform the experiment. The solution (15–30 μL) was directly spread onto the subphase interface. The surface pressure was determined with a Pt plate using the Wilhelmy method. The continuous symmetric compression was through the automatic simultaneous movement of both barriers that confine the film. The total film area was continuously recorded using trough and software provided by KSV Instruments Ltd. The usual compression rate used was adjusted at $10 \text{ mm}^2\cdot\text{min}^{-1}$, lower barrier speeds were also checked without altering the results. Monolayers formed by pure proteins or their mixtures with lipids usually have a slow collapsing transition process, giving a nonabruptly discontinuity in the π -area isotherms even at the slower compression speed. For this reason, we have shown that the collapsing point or transition pressure of all isotherms shown in Figure 2 is the first discontinuity taken from the second derivative of the π -area isotherm (Figure S2). These mathematically calculated values are lower than the first discontinuities observable at first sight in π -area isotherms in Figure 1. Before compression, the spread films were allowed to be equilibrated by 2–3 min. MMA or the average experimental area per molecule is the available surface area divided by the amount of spread molecules at the interface, according to $\text{MMA} = (A_s/n_L + n_p)$, where A_s is the total available surface area of the trough and n is the amount of lipid n_L or protein n_p molecules or their mixtures $n_L + n_p$ spread onto A_s . A_s is automatically calculated by the appropriate software that takes into account the barrier speed and the size of the available surface trough area upon compression. A_{ideal} is proportional to mole fraction and individual molecular area of the pure components of the mixed monolayer at a defined surface pressure π according to $A_{\text{ideal}} = (A_L X_L + A_p X_p)_\pi$, where A_L and A_p are the individual molecular areas and X_L and X_p the mole fractions of pure lipid and protein, respectively. MMA is the average of at least 4/5 independent determinations with its corresponding standard deviation. The behavior of mixed lipid/peptide monolayers was analyzed by comparing the experimental curves (MMA vs π) with the theoretical isotherms (A_{ideal} vs π) for the corresponding films in which no interactions between the molecules are assumed. In a non-interacting behavior, MMA value tends to be close to A_{ideal} (ideal mixing behavior).^{20,21} Also, the miscibility/immiscibility of the mixed interface was determined according to the surface phase rule.²¹

Brewster Angle Microscopy. Monolayers were spread over a Langmuir film balance, as described above, and the films were directly observed along all π -area isotherm using a BAM coupled to an EP3

Imaging Ellipsometer equipment (Accurion, Göttingen, Germany) with a 20 \times objective (Nikon, Japan, NA 0.35). For each imaging acquisition, the monolayer was compressed by forward compression steps of $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. During imaging acquisition (5–20 s), the lateral pressure did not exhibit any detectable variation. Three to five images were sequentially taken for each surface pressure, in order to have pictures of different regions of the same monolayer. Results obtained with BAM were compared with the images obtained by using AFM and FM.

Transferred Experiments for AFM and FM. Compressed monolayers up to a desired surface pressure were transferred to mica support (Nano-Tec V-1 grade Muscovite of 10 mm diameter and 0.15–0.21 mm thickness, from Innovative Microscopy Suppliers, Argentina); the mica support is packed in several layers which were used by removing one layer per experiment. The mica face was rinsed with distilled water before transferring the surface material. Langmuir monolayers were then transferred to the support by dipping the mica, oriented perpendicular to the trough previously submerged, at the smallest speed ($1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) and keeping the surface pressure constant with a surface barostat coupled to the barriers of the Langmuir trough. Before the transfer, the monolayer was allowed to stabilize ($\sim 2 \text{ min}$). Each monolayer of either pure components or their mixtures was first compressed up to $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ before transferring to the mica support.

FM and Imaging Analysis. The fibril-like structures were visualized by FM by adding a drop of aqueous freshly prepared 10 μM ThT probe to the transferred monolayer onto the mica support and leaving to dry off for 5 min. Excitation wavelength was selected with a cutting filter of 450 nm, and the emission was taken at 482 nm. Negative controls were done: pure ThT, pure lipid, and pure $A\beta$ peptide were subjected to the same procedure (Figure 4B). As a positive control, we tested preformed fibrils of α -synuclein formed in bulk condition according to Gallea and co-workers⁵⁵ and treated in the same way with ThT by using a glass coverslip (Figure 4B). The images were acquired with an Axioplan Carl Zeiss (Germany) fluorescence microscope equipped with an Olympus video camera (USA). We used a 20 \times and 40 \times objectives. The imaging processing and analysis were carried out using both Fiji and Pixinsight v. 1.8.6 software. Both programs allowed us to use some filters and 2D fast Fourier transform to improve imaging resolution.

Atomic Force Microscopy. AFM measurements were performed on a multimode atomic force microscope, SPM, Agilent Technology 5500, USA. We used the mica support as described above. It was used in contact-mode scanning to measure the transferred Langmuir monolayers of $A\beta(1-40)$ peptide/lipid mixed monolayers and their respective controls (pure POPC and pure $A\beta(1-40)$ peptide). All of the experiments were carried out at room temperature. Resolution images of 512×512 pixels were collected at a scanning rate in between 0.3 and 0.4 $\text{ln}\cdot\text{s}^{-1}$. The height and error-signal (vertical deflection), friction, and topography images were taken simultaneously.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.langmuir.0c00468>.

Mixed π -area isotherms of $A\beta(1-40)$ peptide with lipids and compressibility modulus of mixed $A\beta(1-40)$ peptide with lipids (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Gerardo D. Fidelio – Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas and Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba

X5000HUA, Argentina; orcid.org/0000-0001-6234-6814;
Email: gfidelio@unc.edu.ar

Authors

Alain Bolaño Alvarez – Departamento de Química Biológica
Ranwel Caputto, Facultad de Ciencias Químicas and Centro de
Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC,
CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba
X5000HUA, Argentina

Benjamín Caruso – Cátedra de Química Biológica,
Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales and Instituto de Investigaciones Biológicas y
Tecnológicas (IIBYT), CONICET, Universidad Nacional de
Córdoba, Córdoba X5016GCA, Argentina

Pablo E. A. Rodríguez – Ministerio de Ciencia y Tecnología de
la Provincia de Córdoba, Córdoba X5004AAP, Argentina

Steffen B. Petersen – Department of Health Science and
Technology, Faculty of Medicine, Aalborg University, Aalborg
9220, Denmark

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.langmuir.0c00468>

Author Contributions

[†]A.B.A. and B.C. have contributed equally to this work as co-first authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported, in part, by grants from MinCyT Córdoba, CONICET, FONCYT (PICT 2016-1010) and SeCyT-UNC, Argentina. A.B.A. is doctoral fellow from CONICET. G.D.F. and B.C. are members of the Scientific National Research Career (CIC) of CONICET, Argentina. P.E.A.R. is a researcher from Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina. P.E.A.R. and G.D.F. give special thanks to TRB Pharma SA (Buenos Aires, Argentina) and TRB Chemedica International (Genève, Switzerland) for the generous gift of A β (1–40) peptide and by its interest to finance us the research of the effect of different lipids on amyloid fibrillation. S.B.P. is Emeritus Professor at the Department of Health Science and Technology, Faculty of Medicine, Aalborg University, Denmark. All microscopes used in this work belong to the “Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada de Córdoba” (CEMINCO), integrated to the Sistema Nacional de Microscopía (SNM-MINCYT), Argentina. The authors thank Dr. M. S. Celej for the gift of recombinant α -synuclein for ThT staining experiments.

ABBREVIATIONS

A β (1–40), β amyloid 1–40 residue peptide; AD, Alzheimer disease; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine; DSPC, 1,2-distearoyl-phosphatidylcholine; PAP, percentage of peptide area proportion in the lipid/peptide mixed surface; ThT, thioflavin T

REFERENCES

- (1) Selkoe, D. J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608.
- (2) Williamson, R.; Sutherland, C. Neuronal membranes are key to the pathogenesis of Alzheimer's disease: the role of both raft and non-raft membrane domains. *Curr. Alzheimer Res.* **2011**, *8*, 213–221.

- (3) Thinakaran, G.; Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29615–29619.

- (4) Tiwari, S.; Atluri, V.; Kaushik, A.; Yndart, A.; Nair, M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 5541–5554.

- (5) Goñi, F. M. “Rafts”: A nickname for putative transient nanodomains. *Chem. Phys. Lipids* **2019**, *218*, 34–39.

- (6) Fabiani, C.; Antollini, S. S. Alzheimer's Disease as a Membrane Disorder: Spatial Cross-Talk Among Beta-Amyloid Peptides, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Lipid Rafts. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 309.

- (7) Kosicek, M.; Hecimovic, S. Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 1310–1322.

- (8) Oshima, N.; Morishima-Kawashima, M.; Yamaguchi, H.; Yoshimura, M.; Sugihara, S.; Khan, K.; Games, D.; Schenk, D.; Ihara, Y. Accumulation of amyloid beta-protein in the low-density membrane domain accurately reflects the extent of beta-amyloid deposition in the brain. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*, 2209–2218.

- (9) Choi, J.; Yin, T.; Shinozaki, K.; Lampe, J. W.; Stevens, J. F.; Becker, L. B.; Kim, J. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *442*, 187–201.

- (10) Farooqui, A. A.; Liss, L.; Horrocks, L. A. Neurochemical aspects of Alzheimer's disease: involvement of membrane phospholipids. *Metab. Brain Dis.* **1988**, *3*, 19–35.

- (11) Nitsch, R. M.; Blusztajn, J. K.; Pittas, A. G.; Slack, B. E.; Growdon, J. H.; Wurtman, R. J. Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 1671–1675.

- (12) Guan, Z.; Wang, Y.; Cairns, N. J.; Lantos, P. L.; Dallner, G.; Sindelar, P. J. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1999**, *58*, 740–747.

- (13) Mulder, C.; Wahlund, L.-O.; Teerlink, T.; Blomberg, M.; Veerhuis, R.; van Kamp, G. J.; Scheltens, P.; Scheffer, P. G. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* **2003**, *110*, 949–955.

- (14) Del Mar Martínez-Senac, M.; Villalain, J.; Gomez-Fernandez, J. C. Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 744–753.

- (15) Vander Zanden, C. M.; Wampler, L.; Bowers, I.; Watkins, E. B.; Majewski, J.; Chi, E. Y. Fibrillar and Nonfibrillar Amyloid Beta Structures Drive Two Modes of Membrane-Mediated Toxicity. *Langmuir* **2019**, *35*, 16024–16036.

- (16) Thakur, G.; Micic, M.; Leblanc, R. M. Surface chemistry of Alzheimer's disease: a Langmuir monolayer approach. *Colloids Surf., B* **2009**, *74*, 436–456.

- (17) Ambroggio, E. E.; Kim, D. H.; Separovic, F.; Barrow, C. J.; Barnham, K. J.; Bagatolli, L. A.; Fidelio, G. D. Surface behavior and lipid interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide 1-42: a membrane-disrupting peptide. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2706–2713.

- (18) Caruso, B.; Ambroggio, E. E.; Wilke, N.; Fidelio, G. D. The rheological properties of beta amyloid Langmuir monolayers: Comparative studies with melittin peptide. *Colloids Surf., B* **2016**, *146*, 180–187.

- (19) Bénarouche, A.; Habchi, J.; Cagna, A.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Cavalier, J.-F.; Longhi, S.; Carrière, F. Interfacial Properties of NTAIL, an Intrinsically Disordered Protein. *Biophys. J.* **2017**, *113*, 2723–2735.

- (20) Fidelio, G. D.; Maggio, B.; Cumar, F. A. Interaction of myelin basic protein, melittin and bovine serum albumin with gangliosides, sulphatide and neutral glycosphingolipids in mixed monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **1984**, *35*, 231–245.

- (21) Gaines, G. L. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*; Interscience Publishers: New York, 1966.

- (22) Jones, M. N. *Biological Interfaces: An Introduction to the Surface and Colloid Science of Biochemical and Biological Systems*; Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam and New York, 1975.
- (23) McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. Periodic structures in lipid monolayer phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 3249–3253.
- (24) Lösche, M.; Möhwald, H. Impurity controlled phase transitions of phospholipid monolayers. *Eur. Biophys. J.* **1984**, *11*, 35–42.
- (25) Damodaran, S. Beyond the hydrophobic effect: Critical function of water at biological phase boundaries—A hypothesis. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *221*, 22–33.
- (26) Fidelio, G. D.; Maggio, B.; Cumar, F. A. Interaction of melittin with glycosphingolipids and phospholipids in mixed monolayers at different temperatures. Effect of the lipid physical state. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1986**, *862*, 49–56.
- (27) Milner, S. T.; Joanny, J. F.; Pincus, P. Buckling of Langmuir Monolayers. *Europhys. Lett.* **1989**, *9*, 495.
- (28) Levine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- (29) Biancalana, M.; Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 1405–1412.
- (30) Ban, T.; Hamada, D.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 16462–16465.
- (31) Sparr, E.; Linse, S. Lipid-protein interactions in amyloid formation. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2019**, *1867*, 455–457.
- (32) Schladitz, C.; Vieira, E. P.; Hermel, H.; Möhwald, H. Amyloid-beta-sheet formation at the air-water interface. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 3305–3310.
- (33) Maltseva, E.; Brezesinski, G. Adsorption of amyloid beta (1-40) peptide to phosphatidylethanolamine monolayers. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1185–1190.
- (34) Chi, E. Y.; Frey, S. L.; Winans, A.; Lam, K. L. H.; Kjaer, K.; Majewski, J.; Lee, K. Y. C. Amyloid-beta fibrillogenesis seeded by interface-induced peptide misfolding and self-assembly. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 2299–2308.
- (35) Jiang, D.; Dinh, K. L.; Ruthenburg, T. C.; Zhang, Y.; Su, L.; Land, D. P.; Zhou, F. A kinetic model for beta-amyloid adsorption at the air/solution interface and its implication to the beta-amyloid aggregation process. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3160–3168.
- (36) Jiang, D.; Rauda, I.; Han, S.; Chen, S.; Zhou, F. Aggregation pathways of the amyloid beta(1-42) peptide depend on its colloidal stability and ordered beta-sheet stacking. *Langmuir* **2012**, *28*, 12711–12721.
- (37) Ambroggio, E. E.; Fidelio, G. D. Lipid-like behavior of signal sequence peptides at air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 708–714.
- (38) Pressl, K.; Jørgensen, K.; Lagner, P. Characterization of the sub-main-transition in distearoylphosphatidylcholine studied by simultaneous small- and wide-angle X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325*, 1–7.
- (39) Prenner, E.; Honek, G.; Hönig, D.; Möbius, D.; Lohner, K. Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2007**, *145*, 106–118.
- (40) Fidorra, M.; Duelund, L.; Leidy, C.; Simonsen, A. C.; Bagatolli, L. A. Absence of fluid-ordered/fluid-disordered phase coexistence in ceramide/POPC mixtures containing cholesterol. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4437–4451.
- (41) Brewer, J.; de la Serna, J. B.; Wagner, K.; Bagatolli, L. A. Multiphoton excitation fluorescence microscopy in planar membrane systems. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 1301–1308.
- (42) Morinaga, A.; Hasegawa, K.; Nomura, R.; Ookoshi, T.; Ozawa, D.; Goto, Y.; Yamada, M.; Naiki, H. Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of Abeta amyloid fibrils at low concentrations of Abeta monomers. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 986–995.
- (43) Campioni, S.; Carret, G.; Jordens, S.; Nicoud, L.; Mezzenga, R.; Riek, R. The presence of an air-water interface affects formation and elongation of alpha-Synuclein fibrils. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2866–2875.
- (44) Terzi, E.; Hölzemann, G.; Seelig, J. Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14845–14852.
- (45) Hertel, C.; Terzi, E.; Hauser, N.; Jakob-Rotne, R.; Seelig, J.; Kemp, J. A. Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 9412–9416.
- (46) Fischer, H.; Polikarpov, I.; Craievich, A. F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci.* **2009**, *13*, 2825–2828.
- (47) Ahlyayach, H.; Raab, M.; Busto, J. V.; Andracka, N.; Arrondo, J.-L. R.; Masserini, M.; Tvaroska, I.; Goñi, F. M. Binding of beta-amyloid (1-42) peptide to negatively charged phospholipid membranes in the liquid-ordered state: modeling and experimental studies. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 453–463.
- (48) Sparr, E.; Engel, M. F. M.; Sakharov, D. V.; Sprong, M.; Jacobs, J.; de Kruijff, B.; Hoppener, J. W. M.; Killian, J. A. Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 117–120.
- (49) Domanov, Y. A.; Kinnunen, P. K. J. Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 42–54.
- (50) Hellstrand, E.; Grey, M.; Ainalem, M.-L.; Ankner, J.; Forsyth, V. T.; Fragneto, G.; Haertlein, M.; Dauvergne, M.-T.; Nilsson, H.; Brundin, P.; Linse, S.; Nylander, T.; Sparr, E. Adsorption of alpha-synuclein to supported lipid bilayers: positioning and role of electrostatics. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 1339–1351.
- (51) Kaya, I.; Brinet, D.; Michno, W.; Başkurt, M.; Zetterberg, H.; Blenow, K.; Hanrieder, J. Novel Trimodal MALDI Imaging Mass Spectrometry (IMS3) at 10 μm Reveals Spatial Lipid and Peptide Correlates Implicated in Abeta Plaque Pathology in Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8*, 2778–2790.
- (52) Gellermann, G. P.; Appel, T. R.; Tannert, A.; Radestock, A.; Hortschansky, P.; Schroeckh, V.; Leisner, C.; Lutkepohl, T.; Shtrasburg, S.; Rocken, C.; Pras, M.; Linke, R. P.; Diekmann, S.; Fandrich, M. Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 6297–6302.
- (53) Kiskis, J.; Fink, H.; Nyberg, L.; Thyr, J.; Li, J.-Y.; Enejder, A. Plaque-associated lipids in Alzheimer's diseased brain tissue visualized by nonlinear microscopy. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13489.
- (54) Halliday, G. M.; Ophof, A.; Broe, M.; Jensen, P. H.; Kettle, E.; Fedorow, H.; Cartwright, M. I.; Griffiths, F. M.; Shepherd, C. E.; Double, K. L. Alpha-synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. *Brain* **2005**, *128*, 2654–2664.
- (55) Gallea, J. I.; Sarroukh, R.; Yunes-Quartino, P.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V.; Celej, M. S. Structural remodeling during amyloidogenesis of physiological Nalpha-acetylated alpha-synuclein. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1864*, 501–510.