



Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# Regulación de la interacción de $\alpha$ -sinucleína con membranas lipídicas por el sistema Hsp70 humano

**Autor/a:**

Paula Terroba Navajas

Director/a:

Adelina Prado Ruiz

Co-Director/a

Arturo Muga Villate

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>3</b>
3.1 MATERIALES .....	3
3.2 PRUEBA DE SOBREENPRESIÓN DE $\alpha$ -SINUCLEINA.....	4
3.3 PURIFICACIÓN DE $\alpha$ -SINUCLEINA.....	4
3.4 PREPARACIÓN DE LUVs .....	5
3.5 AGREGACIÓN EN PRESENCIA DE LUVs.....	6
3.6 AGREGACIÓN POR AGITACIÓN.....	7
3.7 PURIFICACIÓN DE LAS FIBRAS .....	7
3.8 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	7
3.10 DIGESTIÓN POR PROTEINASA K .....	8
3.11 ENSAYO CON DESAGREGASAS .....	8
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
4.1 AGREGACIÓN EN PRESENCIA DE LUVs.....	9
4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS.....	10
4.3 SOLUBILIZACIÓN DE LAS FIBRAS POR LA DESAGREGASA HUMANA .....	12
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>14</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>15</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

La acumulación de fibras amiloides está relacionada con desórdenes neurológicos tales como el Parkinson (PD), Alzheimer (AD), demencias con cuerpos de Lewy (DLBs), esclerosis lateral amiloide y la enfermedad de Huntington (HD) (1). Estos desórdenes están asociados con un mal plegamiento proteico debido a situaciones de estrés celular, mutaciones o sobreexpresión proteica; procesos que alteran el equilibrio entre la síntesis y degradación proteica, y provocan la acumulación de agregados proteicos que pueden resultar tóxicos. La célula tiene mecanismos intrínsecos cuya misión es mantener la proteostasis y la viabilidad celular, uno de estos mecanismos son los sistemas de chaperonas moleculares que intentan favorecer el plegamiento nativo y en el caso de un mal plegamiento y posterior formación de agregados, las chaperonas lo detectan y colaboran en la solubilización o eliminación de los agregados (2).

Uno de los desórdenes neurológicos más comunes y complejos es la enfermedad del Parkinson, caracterizada por la muerte temprana de neuronas dopaminérgicas localizadas en la “*sustancia nigra pars compacta*” del cerebro (3). Esto provoca una deficiencia de dopamina en los ganglios basales que deriva en desórdenes en el movimiento (4, 5). Esta enfermedad resulta de la combinación de factores genéticos y ambientales, y a nivel morfológico se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy (6). El componente principal de estos cuerpos son los depósitos de fibras formados mayoritariamente por proteína alfa-sinucleína mal plegada que tiende a formar agregados tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas.

Alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn) es una proteína con carga neta negativa que pertenece a una familia con tres miembros: alfa-, beta-, y gamma-syn.  $\alpha$ -syn se encuentra principalmente en los terminales presinápticos asociada a vesículas sinápticas. Aunque la función exacta de esta proteína no se ha determinado, se relaciona con el tráfico vesicular y la regulación de la exocitosis de vesículas. Además,  $\alpha$ -syn participa en el ensamblaje del complejo SNARE, asociado con la liberación de neurotransmisores (7). En el sistema nervioso central presenta dos isoformas, una forma predominante en el citosol intrínsecamente desordena y otra forma con un alto porcentaje de componente alfa helicoidal que se encuentra asociada a membranas (8, 9).

La secuencia de  $\alpha$ -syn se compone de 140 aminoácidos y se puede dividir en tres regiones con distintas propiedades estructurales y dinámicas (10, 11): un segmento amino-terminal (residuos 1-60) con carga neta positiva, un componente no amiloide (NAC; residuos 61-95), y la región carboxilo-terminal (residuos 96-140) con carga negativa. La región N-terminal y NAC contienen repeticiones de una secuencia consenso (KTKEGV) y son considerados segmentos que pueden plegarse en  $\alpha$ -hélices. Además, estos dos segmentos son los encargados de interactuar con las membranas lipídicas mediante un cambio de estructura desordenada a  $\alpha$ -hélice, mientras que la región C-terminal se mantiene desestructurada y expuesta al medio (12).

$\alpha$ -syn responde a las características de las bicapas lipídicas a las que se une, tales como su curvatura, presencia de *rafts* lipídicos o separaciones de fases; adoptando distintas conformaciones. De esta manera, se ha observado que  $\alpha$ -syn muestra una mayor afinidad por aquellas membranas lipídicas cargadas negativamente o que contienen los denominados “defectos de empaquetamiento”. Estos últimos son dominios de baja

densidad y alta exposición de lípidos al medio acuoso debido al desajuste entre la estructura del lípido y la curvatura de la membrana (13, 14). Por otro lado, se ha observado que  $\alpha$ -syn se une mejor a vesículas unilamelares (SUV o LUV) que a vesículas multilamelares (MLV) dado que la concentración de lípidos expuestos al medio acuoso en estas últimas es mayor (12).

Ambas isoformas, tanto el monómero nativo desordenado como la forma unida a membranas rica en  $\alpha$ -hélices, son capaces de sufrir los cambios conformacionales que resultan en la formación de estructuras ricas en hojas beta.  $\alpha$ -syn se encuentra en un equilibrio dinámico, en el que el monómero puede agregar primero en oligómeros de distinto tamaño que se estabilizan por medio de interacciones entre las hojas beta. Éstos pueden formar protofibrillas insolubles de mayor peso molecular que pueden polimerizar dando lugar a las fibras amiloides identificadas en los cuerpos de Lewy, que contienen un alto porcentaje de hojas  $\beta$  cruzadas (15). Este proceso tiene una fase inicial muy lenta, denominada fase de latencia o fase *lag* en la cual se forman núcleos de agregación que forman en un primer lugar estructuras oligoméricas. Los oligómeros, por un lado, si tienen una estructura en hojas  $\beta$  antiparalelas pueden acumularse en la célula llegando a ser tóxicos, mientras que aquellos que no tienen una estructura secundaria definida continúan el proceso de agregación de forma exponencial hasta fibras (16,17,18). Una de las cuestiones que está todavía sin resolver es cuál es el mecanismo que inicia la transición de  $\alpha$ -syn desplegada a fibras ricas en hojas  $\beta$ .

En células sometidas a estrés, las chaperonas moleculares constituyen una primera línea de defensa reconociendo las proteínas mal plegadas, dirigiéndolas a su degradación o estabilizando sus intermediarios conformacionales para favorecer su replegamiento, previniendo así, la formación de fibras. Una chaperona molecular se define como cualquier proteína que interacciona y ayuda en el proceso de plegamiento o ensamblaje de otra proteína sin ser parte de su estructura final (19). En el Parkinson, las primeras evidencias sobre la implicación de las chaperonas moleculares se observaron en estudios *in vivo* donde se detectó la sobreexpresión de las chaperonas Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y Hsp27 asociadas a la presencia de cuerpos de Lewis (20). En concreto, se ha co-localizado Hsp 70 en agregados de  $\alpha$ -syn en cerebros con PD (21).

Hsp70 es una clase de proteína ampliamente distribuida, implicadas en un gran número de controles de calidad proteica, incluyendo proteínas plegadas *de novo*, replegamiento de proteínas desnaturalizadas por estrés, transporte proteico, translocación en membrana, y degradación proteica. Además, la Hsp 70 humana junto con DnaJB1 (componente Hsp40) y Hsp 110 (Apg2) que actúan como co-chaperonas, forman una máquina desagregasa que consigue despolimerizar eficientemente agregados estables de  $\alpha$ -syn y convertirlos en especies menos tóxicas (22). Estos datos relacionan los agregados de  $\alpha$ -syn con el sistema de Hsp70, capaz de actuar tanto para prevenir la agregación como para eliminar los agregados.

Se ha estudiado tanto el proceso de plegamiento como el de agregación tanto en presencia de vesículas lipídicas (23) como en presencia de chaperonas moleculares (22), pero aun así el conocimiento asociado a los mecanismos de toxicidad mediados por  $\alpha$ -syn es limitado. Actualmente, los métodos *in vitro* más utilizados para la formación de fibras son la utilización de ultrasonidos, bicapas o monocapas lipídicas y agitación. En este trabajo, se intentará recrear la cinética de agregación de  $\alpha$ -syn en presencia de vesículas lipídicas ya que

consideramos que es el método más fisiológico. Además, se caracterizará en todo momento las fibras obtenidas en comparación con las obtenidas por agitación. Por otro lado, se va a estudiar la capacidad de las chaperonas moleculares del sistema Hsp70 de disolver los agregados amiloides. Ya que, aunque la unión de  $\alpha$ -syn a membranas está ampliamente caracterizada, la implicación de las mismas en la transformación de  $\alpha$ -syn monomérica a fibras todavía no se entiende completamente, así como tampoco la acción del sistema de chaperonas moleculares.

Sabemos que la formación de agregados amiloides de  $\alpha$ -syn por interacción por liposomas unilamelares y bicapas lipídicas en general depende de su composición lipídica, de la relación molar lípido/proteína de las mezclas e incluso, del grado de curvatura de la bicapa (23, 24). En nuestro ensayo vamos a usar liposomas unilamelares de 100 nm de DMPS (lípido con carga negativa) con los que  $\alpha$ -syn interacciona con alta afinidad. Para optimizar el procedimiento se utilizan LUVs ya que tienen mayor estabilidad que los SUVs (24). La interacción de la proteína con los liposomas aumenta la concentración local de  $\alpha$ -syn lo que va a favorecer el proceso de agregación que se seguirá por medio de cambios en la fluorescencia de Tioflavina T (ThT) lo que nos permitirá optimizar la relación molar lípido/proteína para obtener agregados y fibras. A continuación, se tratará de caracterizar las fibras obtenidas en presencia de liposomas y aquellas obtenidas únicamente con agitación comparando los resultados, para ello se utilizarán los patrones obtenidos tras la digestión de las fibras por proteinasa K, y se estudiarán las conformaciones y tamaños de dichas fibras por difracción circular (DR) y dispersión dinámica de luz (DLS), respectivamente. Por último, una vez caracterizadas las fibras se procederá a estudiar el proceso de solubilización por chaperonas humanas.

## 2. OBJETIVOS

- Optimización y caracterización del proceso de agregación de  $\alpha$ -syn en presencia de vesículas lipídicas de DMPS.
- Caracterización y ensayo de solubilización de fibras de  $\alpha$ -syn por chaperonas humanas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

*Proteínas* — Proteinasa K (PK), seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma – Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), Heat shock chaperone 70 (Hsc70), J-protein B (JB1), ATP and peptide-binding protein in germ cells 2 (Apg-2) (purificadas en el propio laboratorio). *Anticuerpos* — Anticuerpo monoclonal de conejo anti-alfa sinucleína humana (ab138501) (Addgene), Anticuerpo Anti-IgG de conejo unido a HRP #7074 (Cell Signaling Technology, Inc., Leiden, Holanda). *Reactivos* — Tioflavina T (ThT), Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), Ampicilina (Amp), adenosin trifosfato (ATP), fosfoenolpiruvato (PEP), Dodecil sulfato (SDS), Tween 20 adquiridos en su mayoría de Sigma – Aldrich (Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). *Lípidos* — 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DMPS) (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, Alabama, Estados Unidos).

### 3.2 PRUEBA DE SOBREEXPRESIÓN DE $\alpha$ -SINUCLEINA

*Transformación en BL21 (DE3)* — Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) electro-competentes mediante electroporación en Gene Pulser Xcell (BioRad). Las células transformadas con el plásmido pT7-7 que contenía la secuencia de la proteína  $\alpha$ -sinucleína A140C se seleccionaron en placas de medio LB agar con Ampicilina (100  $\mu$ g/mL).

*Expresión* — Para preparar un stock concentrado de células, se dejaron crecer cultivos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pT7-7-  $\alpha$ -syn A140C a 37 °C con agitación en medio LB (25 mL) con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon cuatro matraces con medio LB (45 mL) con Ampicilina (100  $\mu$ g/mL) con 2 mL del medio saturado y se dejó crecer hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub>=0.6-0.8. A continuación, se indujo la expresión de la proteína añadiendo 1 mM IPTG manteniendo el cultivo a 37 °C durante 4 horas.

Las células se recolectaron por centrifugación durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Beckman Avanti J25 con un rotor JA-20 a 5000 x g (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y se resuspendió el sedimento en 5 mL de tampón de lavado (30 mM Tris-HCl pH 7.2, 40% sacarosa, 2 mM EDTA). Se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 20 min a 4 °C a 22000 x g en una centrífuga Beckman Avanti J25 con un rotor JA 14 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se resuspendió el sedimento en 2 mL de tampón de choque osmótico (25 mM Tris-HCl pH 8, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>) para romper la membrana del periplasma. Para separar la fracción celular de los componentes del periplasma, se centrifugó durante 20 min a 4 °C a 22000 x g recogiendo en el sobrenadante la proteína de interés (25).

*Electroforesis en SDS-PAGE* — Las muestras recogidas durante la prueba de sobreexpresión de la proteína fueron analizadas mediante una electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida. Las muestras se prepararon en tampón de carga (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % (p/v) glicerol, 4 % (p/v) SDS, 0.02 % (p/v) azul de bromofenol, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y no se hirvieron para evitar posibles alteraciones de la estructura de la proteína. El gel se corrió en tampón 200 mM glicina, 25 mM Tris – HCl pH 8.3, 1 % (p/v) SDS y en sistemas de electroforesis mini – PROTEAN 3 (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) a un voltaje constante de 180 V. Finalmente, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R – 250 0.1 % (p/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético 10 % (v/v)) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente, y se destiñeron en esta misma solución sin azul de Coomassie (Figura 1A).

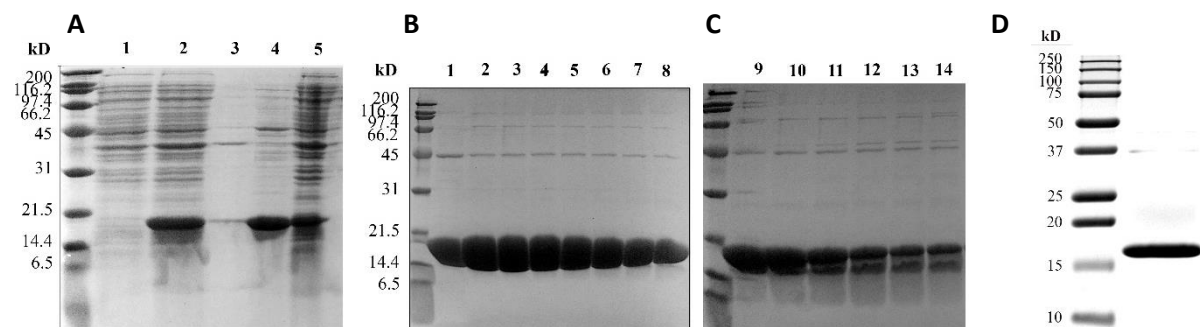
### 3.3 PURIFICACIÓN DE $\alpha$ -SINUCLEINA

Se inocularon cuatro matraces que contenían medio LB (35mL) y Ampicilina (100  $\mu$ g/mL), con *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pT7-7  $\alpha$ -syn A140C y se dejó crecer durante toda la noche a 37 °C. Se realizó un salto de escala a medio LB (750 mL) con Ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se dejó crecer hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub>=0.6-0.8, momento en el que se indujo la expresión con 1 mM IPTG durante 4 horas a 37 °C.

Las células se recolectaron por centrifugación durante 10 min a 4 °C en una centrifuga Beckman Avanti J25 con un rotor JLA-9.1000 a 5000 x g (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se obtuvo la proteína de interés como se ha descrito anteriormente y se sometió a ultrasonidos en 5 ciclos de 20s.

La muestra se filtró con filtros de 0.2 µm y se cargó en una columna de intercambio aniónico HiLoad Q-Shepharosa 26/60 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). α-syn se eluyó en 25 mM Tris-HCl pH 8 con un gradiente de sal de 0 mM a 600 mM NaCl.

Las fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida (Figura 1B y C). Aquellas fracciones que contenían la proteína α-syn pura se dializaron durante toda la noche en 25 mM Tris-HCl pH 7.5. La proteína total se concentró en filtros Amicon de 3 kDa y su concentración final se midió mediante el método descrito en (26). Por último, se analizó la proteína purificada mediante otra electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida (Figura 1D). Esta proteína se utilizará en estudios futuros. En este trabajo se utiliza α-syn nativa obtenida de la misma manera que se ha descrito para el mutante.



**Figura 1. Sobreexpresión y purificación de α-sinucleína.** Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida en tampón 200 mM glicina, 25 mM Tris – HCl pH 8,3, 1 % (p/v) SDS a 180V. Tinción con azul de Coomassie. A) Prueba de sobreexpresión. Calles: patrón de peso molecular, (1) proteínas iniciales, (2) proteínas tras la inducción de la expresión de α-syn por IPTG, (3) proteínas presentes en el medio debido a rotura celular tras la precipitación de las células, (4) proteínas presentes en el periplasma, (5) proteínas descartadas. B y C) Calles: Patrón de peso molecular y fracciones obtenidas tras la purificación de α-syn (1-14). D) Calles: patrón de peso molecular y α-syn purificada.

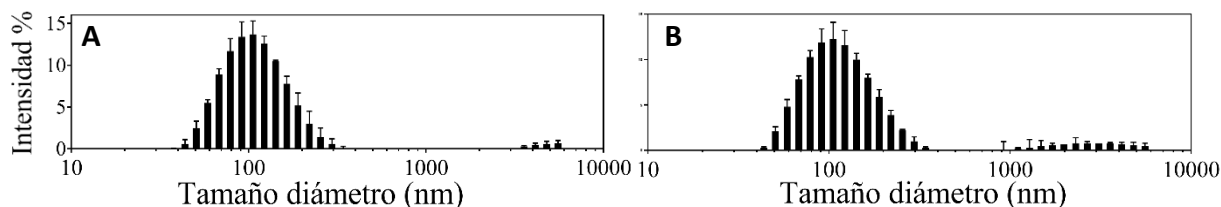
### 3.4 PREPARACIÓN DE LUVs

1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DMPS) se disolvió en una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) y a continuación, se evaporó el disolvente orgánico aplicando un flujo de nitrógeno. Para retirar cualquier resto de disolvente se mantuvo la muestra durante 2 horas en vacío.

La muestra se hidrató en 20mM tampón fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 6.5 realizando tres ciclos de agitación e incubación a 45°C durante un minuto, manteniendo la muestra siempre a una temperatura superior a la temperatura de transición del lípido. La solución se congeló y descongeló 10 veces usando nitrógeno líquido y baño de agua a 45°C, respectivamente. La preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs) se realizó mediante el método de extrusión a 45°C utilizando filtros de policarbonato Whatman de 0.1 µm de diámetro de poro (27).

Tras la extrusión, se midió la concentración de los LUVs con el método descrito en (28), y se comprobó el tamaño de los mismos mediante un sistema de dispersión dinámica de luz (DLS) Zetasizer Nano ZSP (Malvern

Instruments, Malvern, UK). El tamaño medio de la población mayoritaria de LUVs es de 100 nm, si bien se aprecia la aparición de otra población en torno a los 2.000 nm (Figura 2A). Esta población es debida a la agregación de las vesículas y la población se incrementa con el tiempo, al igual que el rango de su diámetro (3000 nm) (Figura 2B), motivo por el cual, se decidió realizar los ensayos inmediatamente después de obtener los LUVs tras la extrusión.



**Figura 2. Distribución del tamaño de la población de LUVs.** Diámetro de los LUVs medido mediante DLS 2 horas después de la preparación (A) y tras 5 horas (B). Se muestra la media y la desviación estándar de cada uno de los valores representados (n=17).

Tras observar este fenómeno de agregación de las vesículas se decidió preparar las muestras inmediatamente después de obtener los LUVs tras la extrusión.

### 3.5 AGREGACIÓN EN PRESENCIA DE LUVs

*Preparación de muestras*—  $\alpha$ -syn (50  $\mu$ M) se incubó en tampón 20 mM fosfato sódico pH 6.5 en presencia de 50  $\mu$ M de ThT y concentraciones crecientes de LUVs de DMPS (450-1800  $\mu$ M) en un volumen final de 125  $\mu$ l. Para la obtención de fibras, se realizó este experimento a una concentración de 200  $\mu$ M  $\alpha$ -syn y concentraciones de 200 y 600  $\mu$ M de LUVs sin ThT.

*Obtención de datos*— El cambio en la señal de fluorescencia de ThT se monitorizó usando un lector de placas Synergy™ HTX Multi-Mode (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, Estados Unidos) en condiciones estáticas,  $\lambda_{ex}$ = 400/30 nm,  $\lambda_{em}$ = 485/20 nm y T= 30 °C. Para el experimento se utilizaron placas de 96 pocillos Corning (3881, poliestireno, negras con fondo transparente) y superficie antiadherente, midiendo la fluorescencia en la parte superior de los pocillos. A T=30 °C los lípidos de los liposomas que interactúan con la proteína se mantienen en fase fluida. Los datos de fluorescencia se han corregido restando la contribución del tampón y de los liposomas.

*Modelo y análisis de la cinética de agregación* — Las cinéticas de formación de fibras se pueden describir como curvas sigmoideas con una fase de latencia o fase *lag* caracterizada por un cambio pequeño en la señal de fluorescencia, un incremento exponencial de la intensidad de fluorescencia y un *plateau* con valores de intensidad de fluorescencia constantes que indican el final de la formación de fibras. Los valores de fluorescencia obtenidos se representan en función del tiempo y se ajustan a una curva sigmoidea utilizando la siguiente ecuación en SigmaPlot:

$$Y = Y_0 + a_{max}/(1 + \exp - ((X - X_0)/b)) \quad (1)$$



Donde  $Y$  es la intensidad de fluorescencia,  $Y_0$  es la fluorescencia en la fase *lag*,  $a_{\max}$  es la fluorescencia máxima,  $X$  es el tiempo,  $X_0$  es el tiempo en el cual la fluorescencia es la mitad del máximo y  $b$  es  $1/k_{\text{app}}$  siendo  $k_{\text{app}}$  la constante aparente de velocidad de agregación. La duración de la fase *lag* se calcula como  $X_0 - 2b$  (29).

### 3.6 AGREGACIÓN POR AGITACIÓN

Se incubó 100  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -syn en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl y 0.05% azida en un volumen total de 400  $\mu\text{l}$  durante 8 días a 37 °C y 1000 rpm en un sistema Thermomixer R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

### 3.7 PURIFICACIÓN DE LAS FIBRAS

*Purificación de las fibras formadas en presencia de LUVs*— Cuando las muestras que contenían ThT alcanzaron el *plateau* durante la cinética de agregación, las muestras sin ThT (200  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -syn y 200 y 600  $\mu\text{M}$  de LUVs) se centrifugaron para recolectar las fibras. Para ello, se centrifugaron 30 min a 90.000 x g y 20 °C en una ultracentrífuga Optima Max con rotor TLA-100 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) realizando 3 lavados seguidos de centrifugación con tampón de replegamiento (40 mM Hepes-KOH pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM DTT). El sedimento de la última centrifugación se resuspendió en el mismo tampón.

*Purificación de las fibras formadas en agitación*— Se centrifugaron las muestras 15 min a 16.000 x g y 4 °C en una microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) realizando 3 lavados con centrifugación y tampón de replegamiento y, en la última centrifugación, resuspendiendo el sedimento en el mismo tampón.

*Cuantificación de las fibras*— La concentración de fibras se estimó diluyendo en cloruro de guanidinio 8 M las fibras resuspendidas en tampón de replegamiento, y midiendo la absorbancia a 275 nm, usando un coeficiente de extinción molar 5606  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Se utilizó dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar la distribución de tamaños de las fibras formadas en ambos casos, en agitación y en presencia de LUVs. Las fibras resuspendidas en tampón de replegamiento se diluyeron hasta una concentración de 5  $\mu\text{M}$  en agua miliQ y se analizaron en un sistema de DLS Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments, Malvern, UK). Como muestra control se utilizó 100  $\mu\text{M}$  de monómero.

### 3.9 DICROÍSMO CIRCULAR

Se utilizó dicroísmo circular (DC) para determinar la estructura secundaria de las fibras purificadas. En esta técnica se utiliza luz polarizada circularmente que será absorbida de distinta manera por la muestra en función de su estructura. Midiendo la diferencia de luz polarizada circularmente transmitida a la izquierda y a la derecha, se calcula el valor de la elipticidad que corresponde con:

$$\theta = \frac{2.303 \cdot (A_L - A_R) \cdot 180}{4\pi} \text{ (grados)} \quad (2)$$

Donde  $A_L$  es luz transmitida a la izquierda y  $A_R$  a la derecha. Para poder comparar los resultados de las distintas muestras, se expresa la actividad óptica en elipticidad molar por residuo:

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta \text{ miligrados}}{c_M \cdot l_{mm} \cdot n_{molécula}} (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) \quad (3)$$

Donde  $c_M$  es la concentración de la muestra,  $l_{mm}$  el paso óptico y  $n_{molécula}$  el número de residuos de la molécula. Las fibras resuspendidas en tampón de replegamiento se diluyeron en agua miliQ a una concentración de 5 y 20  $\mu\text{M}$  las fibras formadas por agitación y a 5  $\mu\text{M}$  las formadas en presencia de LUVs. A continuación, se midió su estructura secundaria mediante dicroísmo circular en un espectropolarímetro Jasco J-810 en el intervalo de longitudes de onda 210-250 nm. El espectro final se obtiene de la media de 15 medidas individuales. El espectro final se corrigió mediante un algoritmo de desplazamiento de media en el programa de análisis del sistema Jasco.

### 3.10 DIGESTIÓN POR PROTEINASA K

Las fibras resuspendidas en tampón de replegamiento se diluyeron a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  en 25 mM Tris-HCl pH 7.4 y 100 mM NaCl y fueron tratadas con concentraciones crecientes de proteinasa K (PK) (0, 0.1 y 0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) a 37 °C durante 20 minutos. La reacción se paró añadiendo 5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) seguido de 3 M tiocianato de guanidinio para disolver la muestra, que se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Por último, se diluyeron las muestras en tampón de carga y agua hasta una concentración de 2 M de tiocianato de guanidinio, y se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos. Como control se utilizó 40  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -syn monomérica tratada igual pero sin añadir el agente caotrópico.

El gel se corrió en tampón 200 mM glicina, 25 mM Tris – HCl pH 8.3, 1 % (p/v) SDS utilizando sistemas de electroforesis mini – PROTEAN 3 (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) a un voltaje inicial de 60 V para permitir la entrada de la muestra y, a continuación, a un voltaje constante de 180 V. Finalmente, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie y se destiñeron en esta misma solución sin azul de Coomassie. Los geles fueron cuantificados con el programa informático ImageJ.

### 3.11 ENSAYO CON DESAGREGASAS

*Solubilización de fibras*— Las fibras resuspendidas en tampón de replegamiento se incubaron a una concentración de 2  $\mu\text{M}$  en disoluciones que contenían 10  $\mu\text{M}$  Hsc70, 5  $\mu\text{M}$  JB1, distintas concentraciones de Apg2 (0-10  $\mu\text{M}$ ) y sistema regenerador (2 mM ATP, 3 mM PEP, 20 ng/ $\mu\text{L}$  PK) durante 5 horas a 30 °C sin agitación. Por último, se centrifugaron 30 min a 16.000 x g y 4 °C, añadiendo al sobrenadante tampón de carga y resuspendiendo el sedimento en el mismo tampón.

*Western blot*— Las muestras obtenidas tras la resolubilización de las fibras se separaron mediante una electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida. El gel se corrió en tampón 200 mM glicina, 25 mM Tris – HCl pH 8.3, 1 % (p/v) SDS y en sistemas de electroforesis mini–PROTEAN 3 (Bio – Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos) a un voltaje constante de 180 V. Una vez las bandas están completamente separadas se procede a realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro (GE

Healthcare LifeSciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos) en tampón de transferencia (50 mM Tris, 386 mM Glicina, 0.10 % (p/v) SDS) con un amperaje constante de 0,5 A durante dos horas a 4°C en un sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos). A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual, se incubó con el anticuerpo primario a una concentración 1:5000 en leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras tres lavados de 10 min con TBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario a una concentración 1:2000 con leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T y se volvieron a realizar otros tres lavados de 10 min con TBS-T.

Las membranas se revelaron mezclando los reactivos de SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate en una relación 1:1 y cubriendo las membranas con la mezcla durante 5 min. Las membranas se cubrieron con un plástico protector y se capturaron mediante Thermo Scientific™ MYECL™ Imager. Las bandas de las membranas fueron cuantificadas con el programa informático Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AGREGACIÓN EN PRESENCIA DE LUVs

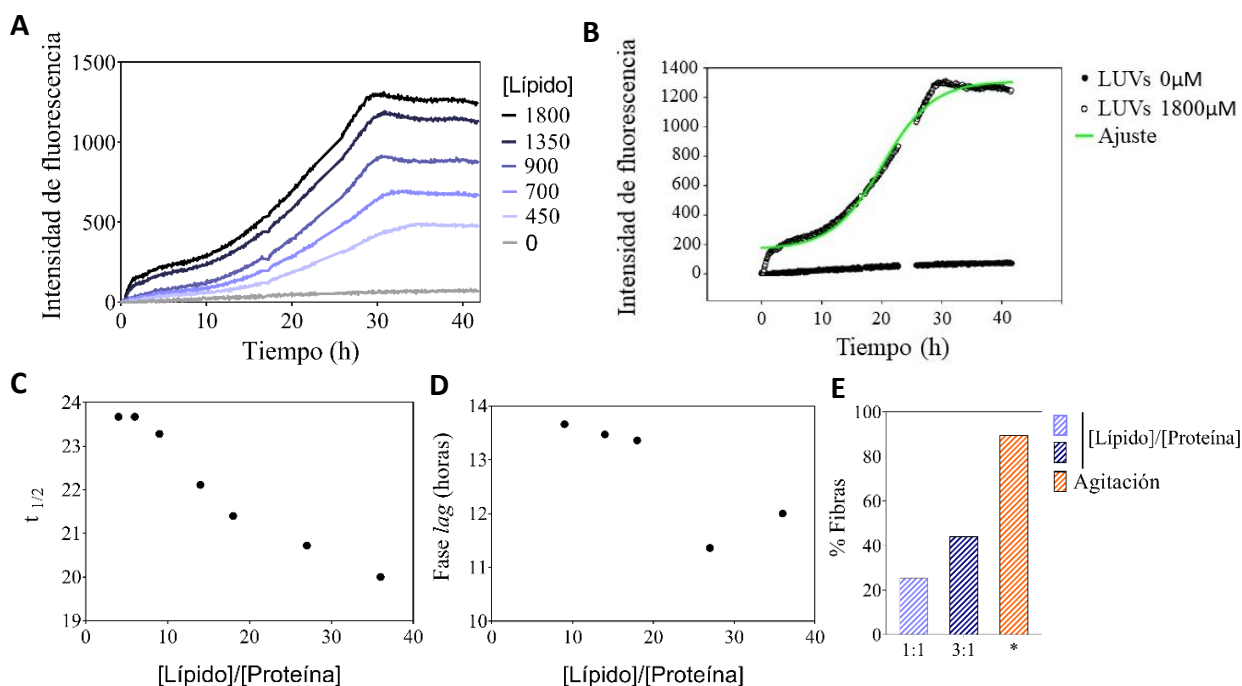
Una vez se tienen los liposomas, se lleva a cabo la medida de la cinética de agregación de  $\alpha$ -syn en presencia de DMPS. Para ello, se han seguido los cambios en la intensidad de fluorescencia de ThT de muestras con una concentración de 50  $\mu$ M de  $\alpha$ -syn y concentraciones crecientes de LUVs (100-1800  $\mu$ M), utilizando como control  $\alpha$ -syn sin liposomas (Figura 3A).

En esta cinética, se observa una fase *lag* que varía desde las 12 horas a concentraciones de lípido de 1800  $\mu$ M, hasta las 13 horas cuando las concentraciones de lípido son inferiores a 900  $\mu$ M. Es decir, aumentando la concentración de lípidos la fase *lag* disminuye. El máximo de fluorescencia se observa a las 30 horas, a partir del cual permanece constante. Por tanto, cuanto mayor es la relación molar lípido/proteína mayor es el cambio en la intensidad de fluorescencia (Figura 3A). En ausencia de LUVs, no se observa un aumento significativo de la señal de fluorescencia de ThT durante las 40 horas que dura el ensayo.

La cinética sigmoidea que se observa en las gráficas se puede explicar asumiendo un modelo, basado en datos ya publicados, en el que el monómero libre se une a la membrana lipídica donde forma, en primer lugar, núcleos de agregación, que darán lugar a oligómeros y por último, a fibras (29). El ajuste de los datos a la ecuación (1) nos permite caracterizar las cinéticas con los parámetros descritos en las Figuras 3C y D, y comparar el efecto sobre la cinética de agregación de las distintas concentraciones de lípido. El tiempo al que la fluorescencia es el 50% del máximo ( $t_{1/2}$ ) disminuye conforme aumenta la relación molar lípido/proteína (Figura 3C), al igual que la fase *lag* o tiempo de latencia (Figura 3D), mientras que en los valores de  $k_{app}$  no se ha observado una variación significativa. Estos resultados indican que al aumentar la relación molar lípido/proteína la cinética de agregación es más rápida, fundamentalmente por la disminución de la fase *lag*.

Las relaciones molares lípido/proteína necesarias para producir un aumento máximo de la intensidad de fluorescencia con respecto al control sin liposomas en nuestro ensayo, son mayores (una relación de 36) que en ensayos de cinética de agregación de  $\alpha$ -syn en presencia de vesículas lipídicas de DMPS con tamaños comprendidos entre 20 y 60 nm (relación de 15) (23, 24). Por otra parte, en nuestros ensayos no observamos el efecto de solubilización de las fibras por los liposomas que esos mismos autores han descrito a partir de relaciones DMPS/proteína superiores a 20 (23, 24). Esto puede deberse a que, como ya ha sido descrito por varios autores (14,17), la afinidad de  $\alpha$ -syn por vesículas unilamelares entorno a los 100 nm (LUVs) es menor que su afinidad por SUVs (20-60 nm). Lo cual implica que para ver el mismo efecto necesitamos mayor relación molar lípido/proteína.

La cantidad de fibra obtenida en presencia de liposomas depende tanto de la concentración inicial de  $\alpha$ -syn como de la relación lípido/proteína (23, 24). Dado que la cantidad de fibra que se ha obtenido a partir de 50  $\mu$ M de  $\alpha$ -syn es muy baja, se realiza otro ensayo a dos relaciones molares de lípido/proteína con una concentración de 200  $\mu$ M de  $\alpha$ -syn. En la relación 3:1 la concentración de fibra formada es aproximadamente del 40% casi el doble que en la relación 1:1 en la que se obtiene un 22%. Estos valores son bastante inferiores a los conseguidos en agitación donde partiendo de una concentración inicial de 100  $\mu$ M el porcentaje de  $\alpha$ -syn en fibras se aproxima al 90% (Figura 3E).



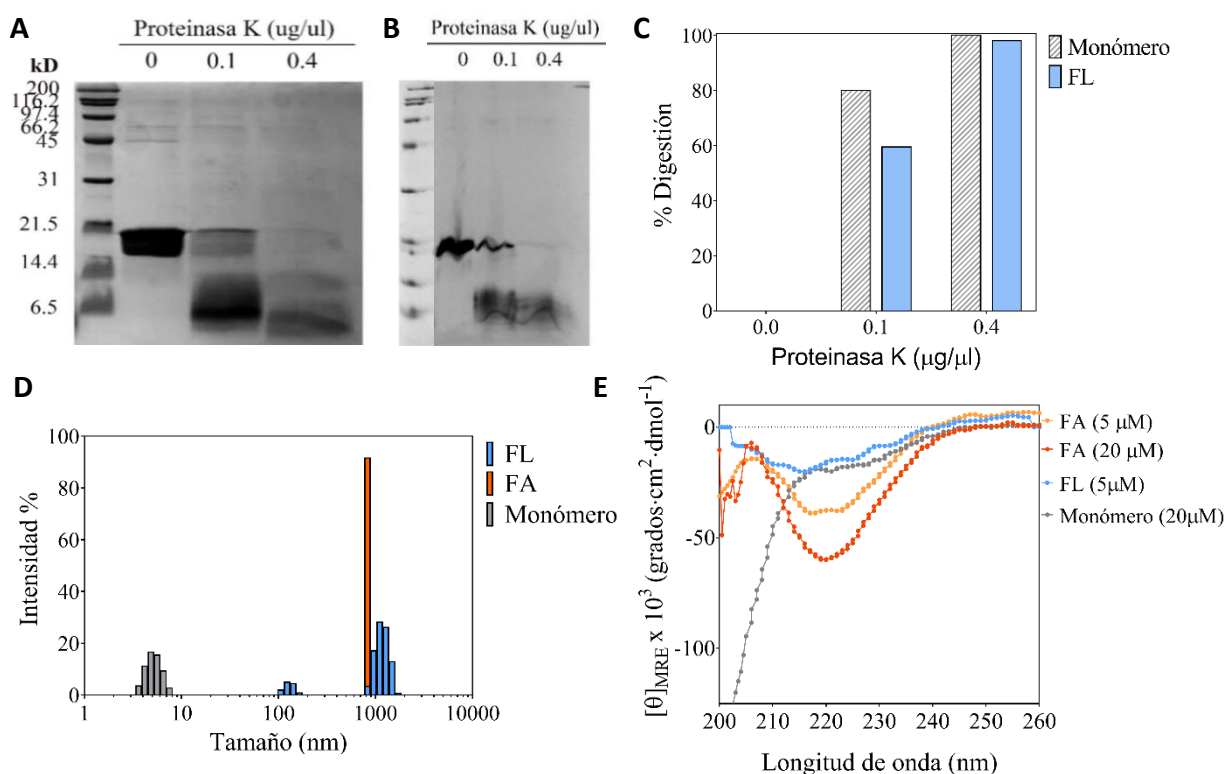
**Figura 3. Modulación de la cinética de agregación de  $\alpha$ -syn por vesículas lipídicas.** A) Medidas de fluorescencia de ThT a lo largo del tiempo (43 horas) de  $\alpha$ -syn (50  $\mu$ M) incubada en ausencia (0  $\mu$ M) y en presencia de concentraciones crecientes de DMPS (450  $\mu$ M), 700  $\mu$ M, 900  $\mu$ M, 1350  $\mu$ M, 1800  $\mu$ M). B) Cinética de agregación a concentración 1800  $\mu$ M de LUVs con el ajuste a una curva sigmoidea según la ecuación (1). C) Tiempo al cual la fluorescencia es la mitad del máximo ( $t_{1/2}$ ) de las cinéticas de agregación obtenidas en presencia de LUVs calculado mediante la ecuación (1). D) Fase lag en horas obtenidas a partir del análisis mediante la ecuación (1). E) Porcentaje de fibras obtenidas a distintas relaciones molares lípido/proteína (1:1 y 3:1) y en agitación (\*).

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS

Para caracterizar las fibras, se comparó el patrón de digestión por proteinasa K de las fibras frente al patrón obtenido con el monómero. Los patrones de digestión de monómero, oligómero y fibras son distintos, ya que,

a igual concentración de las distintas especies, se necesita una mayor concentración de proteinasa K para digerir las fibras.

Al comparar los resultados obtenidos, se observa que a una concentración de proteinasa K de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  el monómero está digerido prácticamente al completo, mientras que en la muestra con fibras todavía se aprecia una banda correspondiente a muestra no digerida (Figura 4A y B). La cuantificación de las bandas (Figura 4C) muestra que el monómero a una concentración de proteinasa K de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  se ha digerido un 80% mientras que las fibras un 50% (Figura 4C). En ambos casos a una concentración de proteasa de 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  la digestión es completa (100%).

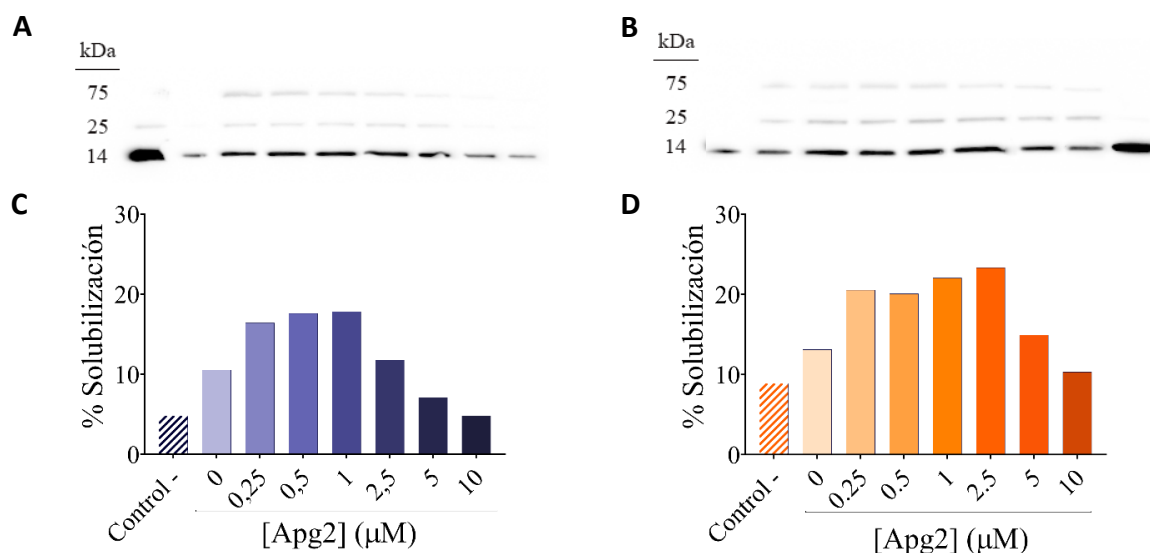


**Figura 4. Caracterización de las fibras.** Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida donde se observa el patrón de digestión del monómero (A) y de las fibras formadas en presencia de LUVs (B), por proteinasa K a distintas concentraciones (0, 0.1 y 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Patrón de pesos moleculares (calle 1) y tinción con azul de Coomassie. C) Porcentaje de digestión calculado tras la densitometría de los geles A y B mediante el programa ImageJ. D) Distribución de tamaños medida mediante DLS de muestras de monómero (100  $\mu\text{M}$ ) y 5  $\mu\text{M}$  de fibras formadas tanto por agitación (FA) como en presencia de LUVs (FL). E) Análisis de la estructura secundaria del monómero y las fibras a las concentraciones indicadas, mediante dicroísmo circular en el intervalo de longitudes de onda de 200 a 260 nm, los valores de elipticidad se han normalizado a elipticidad molar según la ecuación (3).

A continuación, se ha medido el tamaño de las fibras mediante DLS (Figura 4D) y se ha observado que aquellas obtenidas en presencia de LUVs presentan dos poblaciones. Una de ellas se encuentra en torno a 100 nm, que puede deberse a que no se ha conseguido retirar completamente los LUVs ya que las especies oligoméricas se ha descrito que tienen un tamaño entre 160 y 500 nm (16). La otra población se encuentra centrada a más de 1000 nm que correspondería con las fibras. La señal obtenida con las fibras preparadas por agitación indica la presencia de una población homogénea centrada a los 900 nm. Estos valores se han comparado con el tamaño observado en una muestra de monómero cuya población está en torno a 5 nm (Figura 4D). Los tamaños de las fibras se corresponden con lo descrito previamente en la bibliografía (16).

Por otro lado, se ha medido la estructura secundaria de las fibras y la  $\alpha$ -syn monomérica mediante dicroísmo circular. En un primer lugar, se ha medido la elipticidad de las fibras formadas por ambos métodos a una concentración de 5  $\mu$ M pero el ruido que se obtenía era elevado, aunque se puede apreciar un mínimo hacia 218 nm (Figura 4E). La medida se volvió a realizar a concentraciones más altas, en concreto, a 20  $\mu$ M, pero debido a la poca cantidad de fibra formada en presencia de LUVs, solo se pudo repetir con las fibras formadas en agitación. En este caso, se obtuvo un mínimo de elipticidad en torno a 218 nm (Figura 4E). El mínimo hacia 200 nm que aparece en fibras obtenidas por agitación, (tanto a 5  $\mu$ M como a 20  $\mu$ M) podría indicar que las fibras se están deshaciendo y que son más inestables que las formadas en presencia de LUVs. La señal obtenida del monómero tiene el mínimo de elipticidad por debajo de 200 nm, perfil característico de una estructura intrínsecamente desordenada. Tanto los patrones de elipticidad de las fibras como el del monómero coinciden con los descritos en la bibliografía (16).

#### 4.3 SOLUBILIZACIÓN DE LAS FIBRAS POR LA DESAGREGASA HUMANA



**Figura 5. Patrón de solubilización de fibras amiloides.** Detección de  $\alpha$ -syn mediante inmunoblotting tras la solubilización de fibras formadas en presencia de LUVs (A) y en agitación (B). Cuantificación por densitometría de fibras solubilizadas mediante el programa informático Quantity One de las fibras formadas en presencia de LUVs (C) y en agitación (D), y obtención de porcentajes de solubilización frente a un control con 2  $\mu$ M de  $\alpha$ -syn (100 %). El ensayo se ha realizado en presencia de Hsc70 (10  $\mu$ M), JB1 (5  $\mu$ M) y concentraciones crecientes de chaperona Apg2 (0-10 $\mu$ M).

Por último, se realiza un ensayo de solubilización de las fibras en presencia del sistema de desagregasas Hsc70 (10  $\mu$ M), JB1 (5  $\mu$ M) y Apg2 (0-10  $\mu$ M). Este ensayo va a permitir distinguir diferencias en la compactación de las fibras, ya que su grado de compactación condiciona su solubilización. Además, en muchas ocasiones el efecto de la concentración de Apg2 en la solubilización es distinto en oligómeros y fibras. Las relaciones fibra/sistema de desagregasas y la relación molar entre las chaperonas había sido optimizado, previamente, en estudios llevados a cabo por Aitor Franco en nuestro grupo de investigación. Los sobrenadantes obtenidos en estos ensayos se analizan por Western Blot donde además del monómero (banda a 14 kDa) se observan dos especies más con mayor peso molecular a 25 y 75 kDa aproximadamente, una de ellas que se observa en uno de los controles (25 kDa) se corresponde con el dímero de la proteína (Figura 5A y B). La banda de 75 kDa corresponde a especies oligoméricas que resultan de la solubilización por chaperonas y son etapas intermedias

entre el estado monomérico y las fibras. Las bandas obtenidas se han cuantificado y se han calculado los porcentajes de solubilización cuyo valor máximo se encuentra en torno al 20%, utilizando como control la cantidad de monómero libre que se tendría que obtener si se diera el 100% de solubilización (Figura 5C y D).

Los porcentajes de solubilización obtenidos a cada concentración de chaperona dan lugar a un patrón que coincide en las muestras de ambos tipos de fibras. Este patrón se caracteriza por un aumento y luego una disminución del porcentaje de solubilización conforme aumenta la concentración de Apg 2, obteniéndose, por tanto, los valores más altos de solubilización a concentraciones intermedias de chaperonas. Aunque en el caso de las fibras obtenidas por agitación los porcentajes obtenidos son ligeramente mayores, puede deberse a que este tipo de fibras son más inestables, como se ha comentado con anterioridad, ya que el control negativo de las fibras sin chaperonas presenta valores más elevados.

## 5. DISCUSIÓN

Enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Parkinson (PD) o las demencias con cuerpos de Lewy (DLBs) están relacionadas con la acumulación de agregados de  $\alpha$ -syn. La unión de  $\alpha$ -syn a membranas lipídicas promueve cambios conformacionales que pueden favorecer el mal plegamiento de la proteína y, por tanto, su agregación. Para evitar su acumulación y mantener la proteostasis existen mecanismos intrínsecos de control como son las desagregasas que se encargan de deshacer los agregados. Esto justifica nuestro interés por estudiar *in vitro* el efecto de un sistema de desagregasas humanas en el proceso de formación de fibras  $\alpha$ -syn inducido por liposomas.

La unión de  $\alpha$ -sinucleína a membranas lipídicas se ve favorecida, entre otros factores, por su carga neta negativa y por su curvatura. Se ha sugerido que la unión de  $\alpha$ -syn a membranas cargadas negativamente implica la adsorción de la proteína a la superficie de la membrana mediante interacciones electrostáticas entre los aminoácidos cargados positivamente, abundantes en la región N-terminal, y los grupos polares de los lípidos cargados negativamente (12).

La cinética de agregación de  $\alpha$ -syn en presencia de LUVs sigue una curva sigmoidea donde la fase *lag* disminuye conforme aumenta la concentración de lípidos, al igual que el tiempo al cual la fluorescencia es la mitad del máximo ( $t_{1/2}$ ). Hechos que se corresponden con un proceso de agregación más rápido. Esto se ha explicado sugiriendo que una mayor relación lípido/proteína aumenta la concentración local de  $\alpha$ -syn y, por tanto, aumenta el número de centros de nucleación provocando que la formación de fibras sea más rápida (12). Por el contrario, no se observa el efecto de disminución de la fluorescencia y agregación de la proteína a relaciones lípido/proteína mayores de las mencionadas en el apartado anterior, descrito por otros autores (23,24). Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta la menor afinidad de  $\alpha$ -syn por las vesículas de 100 nm (LUVs) que por las de 20-60 nm (SUVs), ya que para obtener el mismo efecto se necesitaría una mayor relación molar lípido/proteína.

Se han descrito un gran número de especies oligoméricas de  $\alpha$ -syn con características generales, pero con diferencias estructurales, en el proceso de formación de fibras y en el mecanismo de toxicidad (16). Por ello, se procede a caracterizar las fibras obtenidas en presencia de LUVs, es decir, en condiciones más fisiológicas,

y comparar sus características con las que se obtienen por agitación, que son aquellas que más se utilizan en la bibliografía. En un primer lugar, en la cinética de agregación se da un cambio conformacional durante la fase *lag*, desde la estructura intrínsecamente desordenada del monómero libre, a una estructura  $\alpha$ -hélice unida a la membrana y finalmente, a una estructura en hoja beta cruzada característica de las fibras amiloides como se ha comprobado en los datos de dicroísmo circular, analizando el monómero y las fibras. Por otro lado, conforme aumenta la relación molar lípido: $\alpha$ -syn el *plateau* se alcanza a valores más altos de fluorescencia de ThT lo que, en principio, se corresponde con una mayor cantidad de fibras. Aunque los valores siguen siendo inferiores a los porcentajes de fibras obtenidos por agitación. Esto sugiere que el proceso de formación de centros de nucleación en la superficie de las membranas puede suponer en cierta medida una limitación en el proceso de formación de fibras en comparación con el proceso por agitación. La caracterización se ha completado con un patrón de digestión de proteinasa K y un análisis de la distribución de tamaños por DLS, cuyos resultados en ambos casos, y en comparación con la bibliografía (16), corroboran la existencia de fibras formadas en presencia de LUVs.

Por último, se realiza un ensayo de solubilización de las fibras que además, va a permitir comparar su estado de empaquetamiento. Los valores que se obtienen son bajos, esto puede deberse a que las fibras amiloides son especies compactas y muy estables, por lo que su solubilización es muy difícil. Además, tras este proceso se observan dos especies distintas: monómeros, que es la especie mayoritaria, y oligómeros, que pueden ser tanto los dímeros que se forman espontáneamente a partir de las especies monoméricas o especies oligoméricas intermedias producto de la solubilización. Estas especies deberán ser caracterizadas.

Comparando los resultados obtenidos en los ensayos de DLS, DC, patrón de proteinasa K y medida de fluorescencia de ThT con los que hay en la bibliografía se puede concluir que en presencia de LUVs a partir de  $\alpha$ -syn monomérica se forman fibras. Aunque se debería seguir caracterizando mediante transmisión de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica (ME), además de caracterizar las especies intermedias y determinar su toxicidad en el organismo. Estos experimentos se han realizado sólo con una especie lipídica, en un futuro se pueden realizar de nuevo en mezclas lipídicas y tamaños más fisiológicos, pudiendo de esta manera caracterizar mejor las condiciones y concentraciones de los lípidos que favorecen la agregación proteica.

## 6. CONCLUSIONES

- La formación de fibras inducida por liposomas depende tanto de la concentración inicial de  $\alpha$ -syn como de la relación molar lípido/proteína. Obteniéndose que a mayor relación molar lípido/proteína la cinética de producción de fibras es más rápida.
- Los datos obtenidos por DLS, DC, patrón de proteinasa K y medida de fluorescencia de ThT indican que las fibras obtenidas tanto en presencia de LUVs como en agitación tienen características estructurales similares.
- La actividad del sistema desagregasa formado por Apg2, Hsc70 y JB1 permite la solubilización de las fibras, obtenidas tanto en presencia de liposomas como por agitación, a monómeros y oligómeros.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ross C, Poirier M (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10:10.
2. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F (2013) *Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis* doi:10.1146/annurev-biochem-060208-092442.
3. Wirdefeldt K, Adami H-O, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J (2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 26(S1):1–58.
4. Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79(4):368–376.
5. Kalia L V., Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet* 386(9996):896–912.
6. Gibb WRG, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:745–752.
7. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton M, Südhof T (2010)  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* (80- ) 329(5999):1663–1667.
8. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35(43):13709–13715.
9. Burré J, Sharma M, Südhof TC (2014)  $\alpha$ -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(40):4274–4283.
10. Changyoun K, Seung-Jae L (2008) Controlling the mass action of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *J Neurochem* 107(2):303–316.
11. Uversky VN, Eliezer D (2009) Biophysics of Parkinson's Disease: Structure and Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein. *Curr Protein Pept Sci* 10(5):483–499.
12. Choi TS, Han JY, Heo CE, Lee SW, Kim HI (2018) Electrostatic and hydrophobic interactions of lipid-associated  $\alpha$ -synuclein: The role of a water-limited interfaces in amyloid fibrillation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* (February). doi:10.1016/j.bbamem.2018.02.007.
13. Varkey J, Isas J, Mizuno N, Jensen M, Bhatia V, Jao C, Petrlova J, Voss J, Stamou D, Steven A, Langen R. (2010) Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem* 285(42):32486–32493.
14. Middleton ER, Rhoades E (2010) Effects of curvature and composition on  $\alpha$ -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys J* 99(7):2279–2288.
15. Xu S (2009) Cross  $\beta$  Sheet Structure in Amyloid Fiber Formation. *J Phys Chem B* 113(37):12447–55.
16. Chen SW, Drakulic S, Deas E, Ouberai M, Aprile FA, Arranz R, Ness S, Roodveldt C, Williams T, De-Genst EJ, Klenerman D, Wood NW, Knowles TPJ, Alfonso C, Rivas G, Abramov AY, Valpuesta JM, Dobson CM, Cremades N (2015) Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during  $\alpha$ -synuclein fibril formation. *Proc Natl Acad Sci* 112(16):1994–2003.
17. Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N, Ying L, Dobson CM, De Simone A (2017) Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers. *Science* 358(6369):1440–1443.
18. Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, Singleton A, Olanow CW, Merchant KM, Bezard E, Perski GA, Meissner WG. (2015) Targeting  $\alpha$ -synuclein for treating Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 14(8):855–866.
19. Ellis RJ, van der Vies SM (1991) Molecular Chaperones. *Annu Rev Biochem* 60(1):321–347.
20. Sharma SK, Priya S (2017) Expanding role of molecular chaperones in regulating  $\alpha$ -synuclein misfolding; implications in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 74(4):617–629.
21. Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ (2011) Molecular Chaperones in Parkinson's Disease – Present and Future. *J Park Dis* 1(4):299–320.
22. Gao X, Carroni M, Nussbaum-Krammer C, Mogk A, Nillegoda N, Szlachcic A, Guilbride D, Saibil H, Mayer M, Bukau B (2015) Human Hsp70 Disaggregase Reverses Parkinson's-Linked  $\alpha$ -Synuclein Amyloid Fibrils. *Mol Cell* 59(5):781–793.
23. Galvagnion C, Buell AK, Meisl G, Michaels TCT, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Dobson CM (2015) Lipid vesicles trigger  $\alpha$ -synuclein aggregation by stimulating primary nucleation. *Nat Chem Biol* 11(3):229–234.
24. Galvagnion C, Brown JWP, Ouberai MM, Flagmeier P, Vendruscolo M, Buell AK, Sparr E, Dobson CM (2016) Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci* 113(26):7065–7070.
25. Huang C, Ren G, Zhou H, Wang CC (2005) A new method for purification of recombinant human  $\alpha$ -synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 42(1):173–177.
26. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1–2):248–254.
27. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 858(1):161–168.
28. Fiske CH, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66(2):375–400.
29. Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky VN, Fink AL (2001) Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. *Biochemistry* 40(28):8397–8409.