

## TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Desarrollo de estrategias para la inhibición de la agregación amiloide de  
alfa-sinucleína y la estabilización de nuevos agregados intermedios  
como posibles biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de  
Parkinson**

Development of strategies for the inhibition of amyloid aggregation of  
alpha-synuclein and the stabilization of new intermediate aggregates as  
potential biomarkers for Parkinson's disease diagnosis

Autor: Andrea Pamplona López

Directores: Nunilo Cremades, Javier Sancho, José D. Camino

*Máster en Biología Molecular y Celular (2019-2020)*

*Instituto Universitario de Investigación de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos*



# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	página 4
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	página 6
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	página 17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	página 18
4.1. Materiales.....	página 18
4.2. Obtención de $\alpha$ -sinucleína humana recombinante pura.....	página 18
4.3. Dispersión dinámica de la luz.....	página 20
4.4. Cinéticas de agregación mediante medidas de fluorescencia de Tioflavina T.....	página 21
4.5. Espectroscopía de infrarrojo.....	página 22
<b>5. RESULTADOS</b> .....	página 25
5.1. Expresión y purificación de $\alpha$ -sinucleína.....	página 25
5.2. Caracterización de los compuestos por DLS.....	página 29
5.3. Estudio de la inhibición de la agregación de $\alpha$ -sinucleína mediante cinéticas de agregación.....	página 35
5.4. Caracterización de la estructura de las fibras.....	página 40
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	página 42
<b>7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	página 46
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	página 47
<b>ANEXOS</b>	

## 1. RESUMEN/ABSTRACT

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína intrínsecamente desordenada que puede plegarse de forma errónea y formar agregados amiloides, esto es, estructuras depositadas en el tejido neuronal de afectados por la enfermedad neurodegenerativa de Parkinson. Para que se formen estos agregados se debe dar el auto-ensamblaje de monómeros de proteína en forma, inicialmente de oligómeros y, finalmente, de fibras. El proceso se ha asociado a la inducción y progresión de neurodegeneración, con un papel muy relevante de las especies oligoméricas intermedias en la inducción de toxicidad.

Actualmente, se están centrando todos los esfuerzos en encontrar biomarcadores para un diagnóstico precoz de Parkinson, ya que en la actualidad el diagnóstico es por una serie de características fenotípicas que aparecen cuando la enfermedad está ya muy avanzada y sólo se puede confirmar *post-mortem*. Por este motivo, en este trabajo abordamos el estudio cinético de una serie de compuestos previamente testados que pueden ser adecuados para inhibir la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y, de esta manera, atrapar algunas de las conformaciones oligoméricas con las que poder desarrollar biomarcadores específicos para un diagnóstico temprano de la enfermedad. Nuestros resultados indican que el compuesto flavonoide quercitina podría ser un candidato plausible para inhibir la agregación amiloide.

*$\alpha$ -synuclein is an intrinsically disordered protein that can misfold and form amyloid aggregates that accumulate in neuronal tissue in Parkinson disease's patients. Monomers of protein self-assemble into initially oligomers and eventually fibers. The process has been associated with the induction and progression of neurodegeneration, with a key role of the intermediate oligomeric species in the induction of toxicity.*

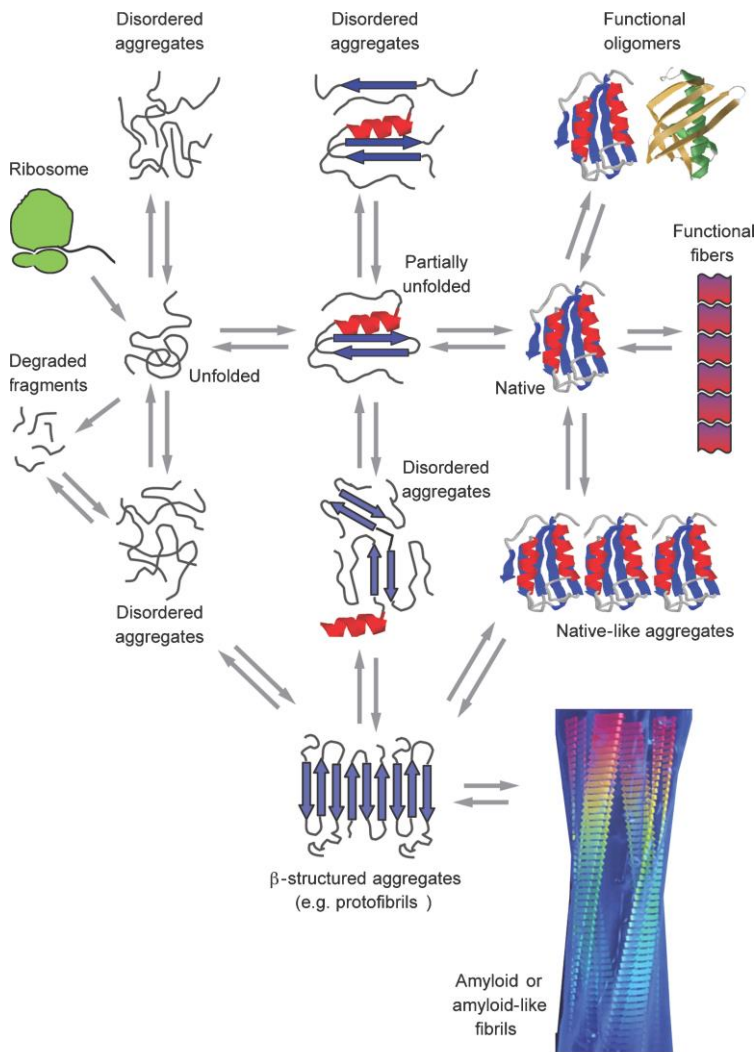
*Nowadays, scientific research is focused on finding biomarkers to make an early diagnosis of Parkinson disease, since the current diagnosis is based on phenotypic characteristics that appear at very late stages of the disease and it is only confirmed post-mortem. For this reason, we take on a kinetic study of a variety of compounds*

*(previously tested) that may inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation and in this way trap some of the intermediate oligomeric conformations with which develop specific biomarkers for an early diagnosis of the disease. Our results point out that the flavonoid quercetin might be a plausible candidate for this purpose.*

## 2. INTRODUCCIÓN

### Enfermedades debidas al mal plegamiento proteico (*misfolding diseases*): enfermedad de Párkinson

Existe un gran número de patologías humanas producidas por un fallo en el plegamiento de ciertas proteínas (Figura 1), lo que en algunos casos conlleva a una reducción de su disponibilidad o actividad [1]. Dicha disminución en su disponibilidad puede deberse a los mecanismos postraduccionales de control de la célula, que degradan las proteínas mal plegadas (es el caso de la fibrosis cística) [2]; o, a un fallo del transporte celular (como el caso del efisema temprano) [3]. Sin embargo, un gran número de este tipo de enfermedades es causado por la generación y acumulación de agregados de una proteína en cuestión que se pliega incorrectamente y se auto-ensambla en especies que adquieren una conformación de lámina  $\beta$ , bastante estable, y típicamente en forma de agregados fibrilares [4-6].

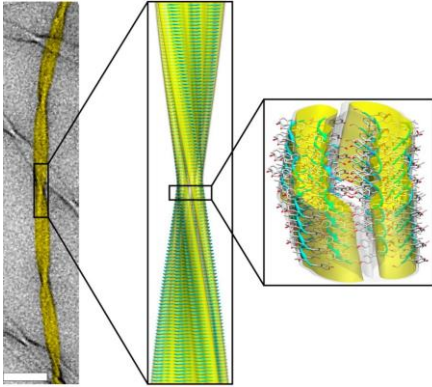


**Figura 1.** Esquema sobre los distintos tipos de estados conformacionales de las proteínas. Cuando los mecanismos reguladores de la célula fallan y se produce un mal plegamiento de la proteína, se pueden formar agregados ricos en lámina  $\beta$ , que darán lugar a la acumulación de fibras amiloides en determinados tejidos ya que estos agregados amiloides son muy estables y resistentes a la degradación de proteasas. Figura adaptada de Chiti and Dobson, 2016 [1].

Estos agregados se acumulan en diferentes órganos o tejidos, y suponen una de las características más relevantes de este tipo de enfermedades. Así, por ejemplo, la acumulación de agregados fibrilares del péptido  $\beta$  amiloide o de la proteína tau es uno de los rasgos de la enfermedad de Alzheimer y de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, de la enfermedad de Parkinson [1, 4].

Las fibras amiloides típicas están generalmente constituidas por varios protofilamentos que interactúan lateralmente. Cada uno de estos protofilamentos está formado por moléculas de proteína que adquieren estructura de láminas  $\beta$  y que se disponen una encima de la otra interactuando principalmente mediante puentes de

hidrógeno entre átomos de la cadena principal (interacciones intermoleculares), generando una estructura denominada lámina  $\beta$  cruzada [7-9] (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de una fibra amiloide, donde se aprecia la arquitectura lámina  $\beta$  cruzada de la misma. Figura adaptada de Cremades and Dobson, 2018 [10].

Aunque aún falta por esclarecer las causas de la toxicidad asociada al proceso de las fibras amiloides, es ampliamente aceptado que las especies oligoméricas intermedias, que se generan durante el proceso de agregación amiloide, presentan toxicidad neurológica que en la mayoría de los casos es superior a la que inducen las especies fibrilares finales [11, 12]. De hecho, se cree que las especies oligoméricas tienen un papel relevante en el desarrollo y probablemente progresión de la enfermedad [5]. Estudiar las especies oligoméricas intermedias que se generan durante el proceso, no obstante, ha resultado ser extremadamente difícil debido a su naturaleza transitoria y a su baja población en cualquier momento de la reacción (en torno al 5-10% como máximo) [13]. Es necesario por tanto el desarrollo de protocolos experimentales para atrapar estas especies y de esta manera estudiar su naturaleza y los mecanismos por los que causan toxicidad [14]. En algunos casos, se han atrapado especies oligoméricas adicionando moléculas o compuestos orgánicos capaces de interactuar con algunas de estas especies y evitar su transformación a fibras [15]. Sin embargo, el desarrollo de estos protocolos ha sido relativamente reciente y el número de especies oligoméricas que se han podido aislar es mínimo [15], por lo que la información de la que disponemos en la actualidad sobre estas especies es muy limitado.

En el caso de la enfermedad de Parkinson, su desarrollo y progresión se relaciona con la presencia de agregados y depósitos amiloides de la proteína  $\alpha$ -sinucleína [5], que se acumulan principalmente en las células nerviosas involucradas en el control motor, en



su mayoría células dopaminérgicas del sistema nigrostriatal [16]. Se trata de una enfermedad crónica, caracterizada por la presencia de temblores, bradiquinesia (lentitud en el inicio de movimientos) y rigidez. Se considera una enfermedad asociada al envejecimiento, con una prevalencia del 2% en mayores de 65 años [17] y se estima que alrededor del 70% de las neuronas mueren antes de que se observen los síntomas claramente [18]. De este modo, su diagnóstico se confirma post mortem, mediante un examen histopatológico de la pérdida neuronal y la presencia de cuerpos de Lewy y de neuritas de Lewy) [19].

Existen otras enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en forma de fibra amiloide y que se les denominan globalmente alfa-sinucleinopatías, como la demencia con cuerpos de Lewy o la atrofia del sistema múltiple [20, 21]. Recientemente, se ha observado que algunas formas mal plegadas de  $\alpha$ -sinucleína y otras proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas se propagan por sí mismas de una célula a otra infectando células sanas y propagando de esta manera la enfermedad [22-26].

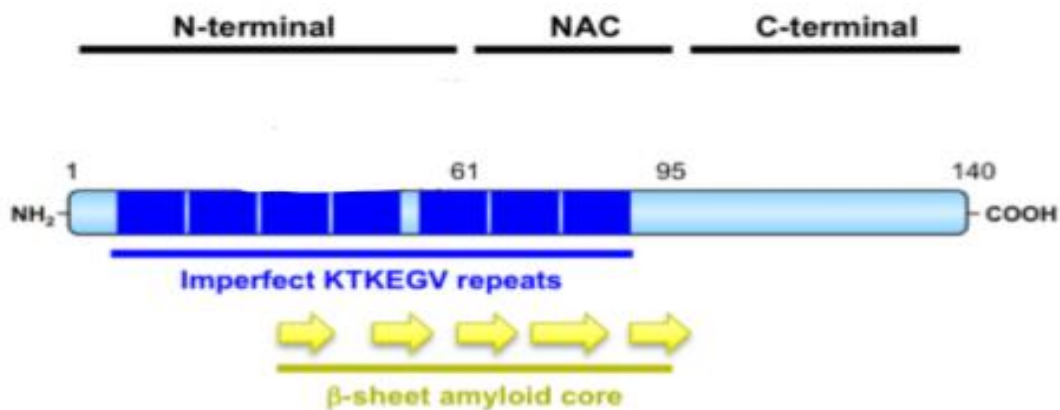
Actualmente, no hay una terapia que prevenga el Parkinson, pero sí se han desarrollado estrategias para inhibir o retrasar la agregación amiloide de  $\alpha$ -sinucleína y que podrían constituir potenciales fármacos para prevenir la enfermedad. Estas estrategias incluyen anticuerpos, péptidos sintéticos, chaperonas moleculares y compuestos químicos [27].

### Características generales de la $\alpha$ -sinucleína

La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína de 140 residuos que se encuentra intrínsecamente desordenada en su forma nativa.

Según su secuencia, podríamos dividir la proteína en tres regiones (Figura 3): N-terminal (residuos 1-60), caracterizada por una carga neta positiva (a pH neutro); la región central, denominada región NAC (por las siglas en inglés de "non-Ab component") [28] (residuos 61-95), y que es una región muy hidrófoba; y, la región C-terminal (residuos 96-140), que contiene muchas cargas negativas a pH neutro [5, 16].

Un rasgo característico de la secuencia de  $\alpha$ -sinucleína es que contiene siete repeticiones imperfectas KTKEGV entre las regiones N-terminal y NAC que hacen que la proteína adquiera una conformación de  $\alpha$ -hélice anfipática en estas regiones en contacto con interfases hidrofílicas/hidrofóbicas [29]. Es de esta manera que se une a membranas lipídicas, especialmente si tienen un alto contenido en cargas negativas [30-32], proceso que parece ser importante para desarrollar su función [33]. Por otro lado, la región NAC se ha propuesto que es esencial para la agregación amiloide de la proteína y constituye el núcleo común de plegamiento amiloide en las diferentes fibras de  $\alpha$ -sinucleína que hasta ahora se han resuelto [34]. Con el fin de evitar la agregación de la proteína y, por tanto que las regiones NAC interaccionen entre ellas, se ha propuesto que la región C-terminal estaría estableciendo interacciones transitorias con las otras dos regiones de la proteína en la conformación desordenada, nativa [35].

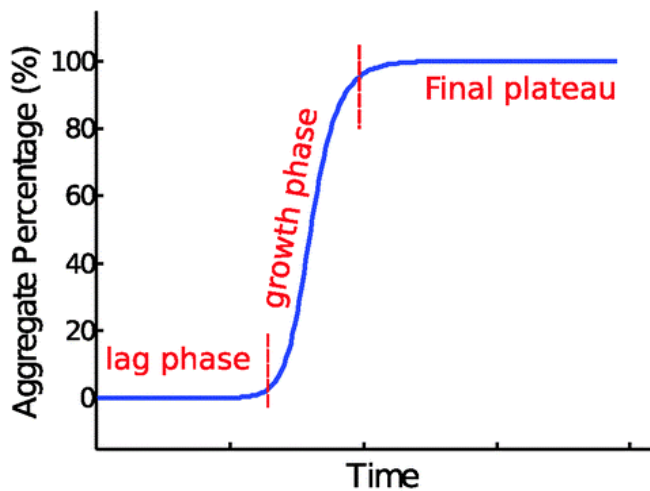


**Figura 3.** Representación esquemática de las regiones y secuencia KTKEGV características de  $\alpha$ -sinucleína. Figura adaptada de Cremades et al., 2017 [5].

### La formación de agregados amiloides y la naturaleza de su toxicidad asociada

La formación de las fibras amiloides se lleva a cabo mediante un proceso de nucleación [1, 5], en el que los monómeros de una proteína, en el caso de la  $\alpha$ -sinucleína, intrínsecamente desordenada, se auto-ensamblan inicialmente para formar oligómeros, componiendo una estructura en lámina  $\beta$ , hasta alcanzar la configuración más estable en

forma, normalmente, de la de fibra amiloide [5, 10]. El modelo de nucleación-conversión-polimerización se ha estudiado para el caso de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, donde se ha observado la formación inicial de oligómeros principalmente desordenados que luego adoptan secuencialmente una estructura más compacta en lámina  $\beta$  y resistente a la degradación por proteasas [5, 13, 36]. Debido a que la formación de los primeros núcleos de la agregación es un proceso mucho más lento que la unión de monómeros a núcleos ya formados, las cinéticas de agregación amiloide presentan una curva de crecimiento sigmoidea [37-39] (Figura 4), dividida en tres fases: una primera fase de latencia donde todavía no hay un número relevante de agregados amiloides; una fase de crecimiento exponencial, donde se produce la mayoría de la conversión de las moléculas de proteínas a agregados amiloides; y, la fase final de estancamiento, donde se alcanza el equilibrio con la máxima concentración de fibra formada para una concentración inicial de monómeros de proteína dada [40].



**Figura 4.** Curva típica de agregación amiloide que muestra el porcentaje de agregados amiloides frente al tiempo, así como las fases de la curva. En la fase de crecimiento es donde se produce la formación de la gran mayoría de los agregados amiloides [40].

La agregación amiloide de proteínas se puede reproducir en un tubo de ensayo ya que es un proceso intrínseco de las proteínas amiloidogénicas [4], lo que permite su estudio en detalle. La técnica más ampliamente utilizada para monitorizar la formación de agregados y fibras amiloides es el cambio en el rendimiento cuántico de la emisión de fluorescencia de la molécula tioflavina T (ThT) al unirse de forma específica a agregados amiloides con estructura en lámina  $\beta$  cruzada [41-43]. La adición de ThT al inicio de la reacción de agregación, por tanto, nos permite monitorizar *in situ* la formación de fibras amiloides de forma muy sencilla y con un gasto relativamente pequeño de proteína, lo

que permite su aplicación a gran escala en formato de placas multipocillo. Varios factores limitantes en este tipo de experimentos para el estudio de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína es la duración del proceso (típicamente en torno a 4-6 días) y la falta de reproducibilidad del proceso en las condiciones más utilizadas *in vitro* para el estudio del proceso [44]. En estudios recientes de cribado de quimiotecas, por tanto, se han ideado estrategias para reducir en gran medida estos factores, como el caso de adicionar vesículas lipídicas sintéticas o bolas de politetrafluoroetileno (PTFE) para inducir el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína mediante la nucleación heterogénea a través de la interfase hidrofílica/hidrofóbica generada en la superficie de las vesículas o las bolas [45].

A pesar de que la caracterización de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína es complicada por su naturaleza transitoria y su variabilidad [14], se han identificado dos tipos distintivos en base a su toxicidad, aunque con morfología y tamaño similares así como similares a las fibras amiloides: las especies formadas al principio de la agregación, no tóxicas, denominados oligómeros A; y, los oligómeros B, más estables, con mayor proporción de estructura lámina  $\beta$  (y mayor resistencia a la degradación por proteinasa K) y tóxicos [13-15]. Estos últimos podrían tener un papel clave en el origen y progresión del Parkinson al unirse a las bicapas lipídicas de las células neuronales, destruyendo la integridad de las membranas celulares [14, 15].

#### Búsqueda de compuestos que inhiban el proceso de la agregación amiloide y atrapen especies oligoméricas intermedias

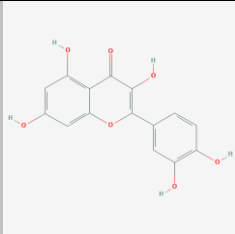
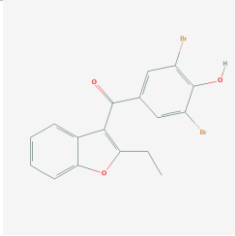
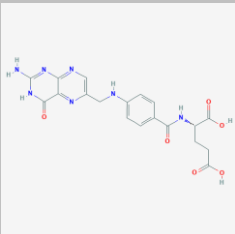
En la actualidad no existe un biomarcador ni una prueba específica para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson, y se ha postulado que especies oligoméricas intermedias de  $\alpha$ -sinucleína podrían ser utilizadas como biomarcadores tempranos de la enfermedad [46]. Últimamente, se ha dedicado gran esfuerzo a identificar y caracterizar la naturaleza de los oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína. Se han desarrollado una serie de estrategias para atrapar las formas oligoméricas de esta proteína: cambiar las condiciones fisicoquímicas de la agregación, modificar la proteína o añadir compuestos inhibidores que interaccionen con los oligómeros y así inhiban su elongación y posterior conversión en fibras [5]. Es esta última estrategia la que se

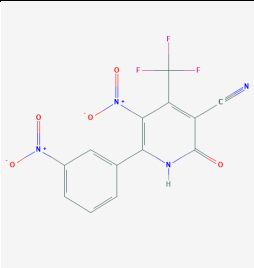
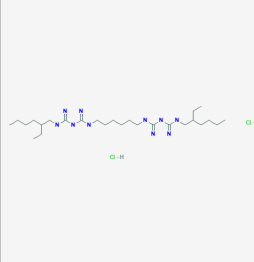
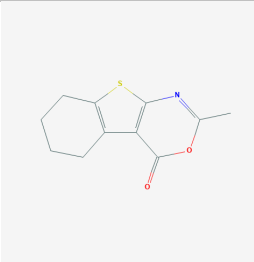
pretende explorar en este estudio. Para ello, se han seleccionado una serie de compuestos para estudiar su capacidad de atrapar diferentes conformaciones oligoméricas intermedias de  $\alpha$ -sinucleína durante el proceso agregación amiloide.

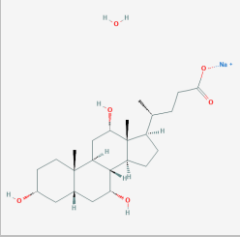
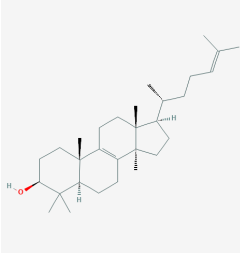
La base para la selección de estos ocho compuestos ha sido la siguiente. Dos de los compuestos ya han sido identificados como inhibidores de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en estudios previos, concretamente la quercitina [27, 47] y SynuClean-D [44, 48]. Por otro lado, se escogieron otros dos compuestos que se habían descrito como inhibidores de la agregación del péptido  $\beta$  amiloide [49] y que hasta la fecha no se había probado para  $\alpha$ -sinucleína: alexidine dihidroclórico y el compuesto 2-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-[1]benzothio[2,3-d][1,3]oxazin-4-one (al que llamaremos de ahora en adelante “6° compuesto”). Se han analizado además otros dos compuestos que fueron identificados en un cribado de compuestos como inhibidores de la agregación de amilina, péptido involucrado en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo II: benzobromarona y ácido fólico [50]. Por último, se han añadido dos compuestos más que no habían sido evaluados hasta la fecha para la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Uno es el lanosterol, que es un derivado de la escualamina. Ésta sí se ha identificado como inhibidor de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína [51-53]. La diferencia es que el lanosterol no tiene la cola hidrofílica de espermidina de la escualamina y queríamos estudiar su efecto. Finalmente, se añadió también el colato sódico a la lista por su capacidad anfipática y su similitud al lanosterol.

En la siguiente tabla (Tabla 1), se muestran los compuestos elegidos para realizar este trabajo, indicando su fórmula, características y su relación con la inhibición con la agregación amiloide.

**Tabla 1.** Selección de compuestos que pueden inhibir la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Información obtenida en PubChem.

Compuesto	Fórmula molecular Peso molecular	Nombre IUPAC	Tipo de molécula	Características	Estructura 2D	Inhibición agregación amiloide
<b>Quercitina</b>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> PM: 302.23 g/mol	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one	Flavonoide pentahidroxiflavona con cinco grupos OH en posiciones 3-, 3'-, 4'-, 5- y 7	Agente antibacteriano, antioxidante, inhibidor de quinasas Presente en frutas y verduras		Inhibición agregación $\alpha$ -syn [27], [47] y de amilina [50]
<b>Benzobromarona</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PM: 424.1 g/mol	(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-(2-ethyl-1-benzofuran-3-yl)methanone	1-benzofurano sustituido en C-2 por grupo etilo y en C-3 por 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoil	Inhibidor de xantina oxidasa no purínico Tratamiento gota (en EEUU no aceptado). Agente uricosúrico		Inhibición agregación amilina [50]
<b>Ácido fólico</b>	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> PM: 441.4 g/mol	(2S)-2-[[4-[(2-amino-4-oxo-3H-pteridin-6-yl)methylamino]benzoyl]amino]pentanedioic acid	Ácido pteroilglutámico Vitamina B9 Inactivo: es convertido a tetrahidfolato y metiltetrahidfolato por dihidrofolato reductasa	Reacciones de transferencia de C en metabolismo de aminoácidos y síntesis de purinas y pirimidinas		Inhibición agregación amilina [50]

<b>SynuClean-D</b>	$C_{13}H_5F_3N_4O_5$ PM:354.2 g/mol	2-hydroxy-5-nitro-6-(3-nitrophenyl)-4-(trifluoromethyl)nicotinonitrile	AM-P227			Inhibición agregación de $\alpha$ - syn [44, 48]
<b>Alexidine dihidroclórico</b>	$C_{26}H_{58}Cl_2N_{10}$ PM:581.7 g/mol	1,1'-Hexamethylenebis[5-(2-ethylhexyl)]biguanide dihydrochloride	Alexidine HCl Derivado de piridina	Antiséptico Quimioterapia (induce apoptosis)		Inhibe agregación péptido $\beta$ amiloide [49]
<b>“6° COMPUESTO”</b>	$C_{11}H_{11}NO_2S$ PM: 221.28 g/mol	2-methyl-5,6,7,8-tetrahydro-[1]benzothio[2,3-d][1,3]oxazin-4-one				Inhibe agregación péptido $\beta$ amiloide [49]

<b>Colato sódico</b>	C <sub>24</sub> H <sub>41</sub> NaO <sub>6</sub> PM: 448.6 g/mol	Sodium;(4R)-4- [(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17 R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl- 2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- tetradecahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-17- yl]pentanoate;hydrate	Ácido cólico	Sal biliar con 4 grupos hidroxilo que se conjuga con papaína y pancreatina		
<b>Lanosterol</b>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O PM: 426.7 g/mol	(3S,5R,10S,13R,14R,17R)-4,4,10,13,14- pentamethyl-17-[(2R)-6-methylhept-5- en-2-yl]-2,3,5,6,7,11,12,15,16,17- decahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	3β-esterol, triterpenoide tetracíclico y esteroide 14β- metilo	De él derivan todos los esteroles (escualeno, colesterol...) Metabolito de plantas, animales, bacterias... Inhibidor de la agregación de proteínas mal plegadas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas		Un derivado, la escualamina, se identifica como inhibidor de la agregación α-syn [51-53]



### 3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de la posible capacidad inhibitoria de varios compuestos que ya fueron identificados previamente en otros estudios de cribado de  $\alpha$ -sinucleína o de otras proteínas o polipéptidos amiloidogénicos, así como otros compuestos seleccionados en el grupo, con el fin de identificar compuestos que actúen a nivel de oligómero y, de esa manera, estabilicen algunas de las conformaciones oligoméricas que se generan durante la agregación amiloide de  $\alpha$ -sinucleína con el fin último de que pudieran ser utilizados como posibles biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad de Parkinson.

Para ello, se han llevado a cabo una serie de etapas en la investigación:

- Expresar y purificar  $\alpha$ -sinucleína humana (tipo silvestre).
- Caracterizar el rango de concentraciones en el que los diferentes compuestos se mantienen estables y monoméricos, en solución acuosa en las condiciones de estudio, utilizando dispersión dinámica de la luz.
- Estudiar la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de compuestos mediante espectroscopía de fluorescencia.
- Caracterizar estructural y morfológicamente los agregados generados en los casos más relevantes a través de espectroscopía de infrarrojo y microscopía de fuerza atómica.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Materiales

*Proteína-*  $\alpha$ -sinucleína purificada en el laboratorio en el que se realiza el TFM.  
*Células-* cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

*Potenciales inhibidores-* benzobromarona (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), quercitina (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), ácido fólico (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), SynuClea-D (sintetizado por el Dr. Alejandro Mahía en el grupo de investigación ProtBioCom de la Universidad de Zaragoza), alexidine dihidroclórico (Cymit, Barcelona, España), 6<sup>o</sup> Compuesto (Enamine, Riga, Letonia), lanosterol (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), colato sódico (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania).

*Reactivos-* Tioflavina T (ThT), Isopropil- $\beta$ -D-1tiogalactopiranosido (IPTG), Ampicilina (Amp), adquiridos en su mayoría de Merck, Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania).

*Otros materiales-* cubetas de plástico desechables (3 × 3 mm, 5 × 5 mm, 10 × 10 mm) (Merck, Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania), microplacas de 96 pocillos con recubrimiento de PEG, con recubrimiento hidrofóbico y con recubrimiento de vidrio (Merck Darmstadt, Alemania), bolas de teflón de diámetro 1/8" (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemania), ventanas CaF<sub>2</sub> de 32x3 mm (Harrick Scientific Products, Pleasantville, Estados Unidos), espaciador de PTFE de 25x0.056 mm (Harrick Scientific Products, Pleasantville, Estados Unidos) y discos de mica (Agar Scientific, Stansted, Reino Unido), marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoFisher.

### 4.2 Obtención de $\alpha$ -sinucleína humana recombinante pura

*Transformación en BL21 (DE3)-* Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico, incubando las células y el plásmido pT7-7 WT que contiene el gen que codifica para  $\alpha$ -sinucleína humana (variante silvestre o WT por sus siglas en inglés) a 42 °C durante 45 segundos después de haber incubado la mezcla en hielo

durante 2 minutos. Tras el choque térmico, las muestras de células se incubaron a 37 °C, 220 rpm durante 1 hora y se seleccionaron las colonias transformadas en una placa de LB con 100 µg/ml de Amp.

*Expresión-* Se cultivaron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido a 37 °C con agitación en medio LB (250 ml) y con Amp (100 µg/ml) durante toda la noche. Al día siguiente se inocularon 60 ml del pre-cultivo a 2 l de medio LB con Amp (100 µg/ml). En total, se crecieron células en 6 l de medio LB. Se dejó crecer hasta una densidad óptica de 0.65 a 600 nm. 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 centrifugaron en tubos de centrifugación de 500 ml durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga (Beckman Coulter) con un rotor JA-10 a 9700 rpm y se resuspendieron los sedimentos en 200 ml de PBS (62 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 208 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1.752 g NaCl en 200 ml H<sub>2</sub>O). Se centrifugaron varias veces hasta reducir al mínimo el pellet y al final se centrifugaron en tubos de 50 ml durante 30 min a 4 °C a 13000 rpm en la misma centrífuga pero con un rotor JA-20. Llegados a este punto, los pellets se guardaron a -80°C.

*Purificación-* Se descongelaron los pellets y se resuspendieron en 120 ml de tampón de lisis (1 M Tris pH 7.7 + 0.5 M EDTA + inhibidor de proteasas), 20 ml de tampón de lisis por cada litro de cultivo (20 ml de tampón de lisis por cada litro de cultivo). A continuación, se indujo la rotura de las membranas celulares por ultrasonicación en hielo (5 ciclos de 1 minuto de sonicación con 1 minuto de pausa entre cada uno) con el ultrasonicador Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (Newtown, EEUU) y se centrifugó la solución obtenida durante 30 minutos, a 4°C y 13000 rpm con un rotor JA-20. Los fragmentos de membrana se desecharon y la solución obtenida (extracto crudo) se llevó a ebullición durante 20-25 minutos. Al ser  $\alpha$ -sinucleína una proteína intrínsecamente desordenada, permanece soluble a temperaturas tan elevadas a diferencia de un gran número de proteínas del extracto crudo que precipitan. Se conserva, por tanto, el sobrenadante. Posteriormente, se precipita el ADN de la solución al añadir sulfato de estreptomicina (10 mg por cada 1 ml de sobrenadante) y se recoge el sobrenadante al centrifugar como se hizo anteriormente. Este paso de precipitación con estreptomicina se repite para eliminar la máxima cantidad de ADN posible de la muestra.

El último paso de precipitación consiste en añadir sulfato amónico para que precipite  $\alpha$ -sinucleína (361 mg por cada 1 ml de sobrenadante). Se mantuvo en agitación durante 30 minutos a 4°C y se finalmente se centrifugó la solución durante 30 minutos, a 4°C, a 13000 rpm en un rotor JA-20 conservándose esta vez el pellet. El pellet es posteriormente resuspendido en 40 ml de 25 mM Tris pH 7.7 y se dializa en una membrana de 3500 Da con 4 l de tampón de diálisis (Tris 25 mM, pH 7.7) a 4°C durante la noche. A continuación, la muestra se filtra con filtros de 0.2  $\mu$ m y se carga en una *columna cromatográfica de intercambio aniónico*, HiPrep<sup>TM</sup> Q FF 16/10 (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). La elución de  $\alpha$ -sinucleína se llevó a cabo en Tris-HCl 25 mM, pH 7.7 con un gradiente de 1.5 M de NaCl. La muestra de proteína eluida se filtró con un filtro de 0.45  $\mu$ M y se cargó en una *columna cromatográfica de exclusión molecular* HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). Se recogieron las fracciones correspondientes a la elución asignada a  $\alpha$ -sinucleína monomérica y se confirmó su identidad y pureza a través de la medición de la masa real de la muestra a través de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) a través del Servicio de Proteómica de la Universidad de Zaragoza. Por último, se determinó la concentración de la muestra en un espectrofotómetro (NanoValue Plus, Biochrom) midiendo la absorbancia a 275 nm y, aplicando la ley de Beer-Lambert (el coeficiente de extinción utilizado es:  $\epsilon_{275\text{nm}}=5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [54]).

### 4.3 Dispersión dinámica de la luz

Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) para determinar el rango de concentraciones en el que los diferentes compuestos se mantienen principalmente monoméricos en las condiciones a las que se realizarán las cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína. Ya que el equipo de DLS del que se dispone, DynaPro NanoStar, de Wyatt (Santa Bárbara, Estados Unidos), tiene un rango de partículas con un radio hidrodinámico (asumiendo una esfera) entre 1 y 5000 nm, desarrollamos una estrategia para estimar el porcentaje, *grosso modo*, de compuesto que se encuentra agregado (ya que las moléculas de compuesto monomérico no pueden ser detectadas en este equipo). Para ello, añadimos 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína a las diferentes

muestras de compuesto como molécula de referencia para poder establecer comparaciones de poblaciones. Se escogió  $\alpha$ -sinucleína monomérica como molécula de referencia ya que el radio hidrodinámico de la proteína en las condiciones de estudio está ampliamente caracterizado y descrito en la bibliografía [55-58]. De este modo, haciendo un análisis comparativo de la abundancia de posibles agregados de compuestos con la abundancia de  $\alpha$ -sinucleína podemos realizar una estimación de la cantidad de agregados de compuesto presentes en cada muestra. Para este análisis se asume que no hay interacción entre  $\alpha$ -sinucleína monomérica y los compuestos. Este análisis se realizó a temperatura ambiente en soluciones de PBS con 5% vol. de DMSO. El análisis se repitió tras incubar las soluciones de compuestos en PBS sin proteína a 37°C durante 2 días en condiciones idénticas a las requeridas para el proceso de agregación de la proteína con el fin de caracterizar la estabilidad de los compuestos durante las primeras etapas del proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en las condiciones utilizadas en este estudio.

El equipo promedia de 20 adquisiciones por cada medida, y se han realizado una media de 15 medidas por compuesto que fueron analizadas y, a su vez, promediadas. Se usaron cubetas de plástico (3 × 3 mm, 5 × 5 mm, 10 × 10 mm) translúcidas desechables. Se midieron los compuestos a 100 y 300  $\mu$ M y, la proteína, a 20  $\mu$ M.

#### **4.4 Cinéticas de agregación mediante medidas de fluorescencia de Tioflavina T**

Se incubó 50  $\mu$ M  $\alpha$ -sinucleína en tampón PBS con 5% vol DMSO, 1% azida, 25  $\mu$ M ThT y distintos compuestos a concentraciones de 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M en un volumen total de 200  $\mu$ l (se realizaron, al menos, triplicados de cada condición) utilizando tres tipos de microplacas de 96 pocillos: una microplaca de poliestireno (PS) con recubrimiento de polietilenglicol (PEG) también llamadas “non-binding”, una microplaca de PS no tratada y una microplaca de PS con recubrimiento de vidrio. A las soluciones de proteína se les adicionó una bola de teflón de 1/8” de diámetro y se incubaron las placas durante 5-7 días, a 37 °C, en ciclos de 30 minutos en un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania). En el punto final de las agregaciones, se recogieron las muestras agregadas, se centrifugaron a 16000 rpm

y los sobrenadantes se cargaron en geles SDS-PAGE 15% acrilamida 25 mM Tris – HCl pH 8,3, 20 % (p/v) SDS a 180V. Los geles fueron revelados mediante una tinción con azul de Coomassie para cuantificar la concentración de monómero en la fase final de equilibrio entre formas agregadas y el monómero en solución tras finalizar la reacción de agregación, para así poder cuantificar el rendimiento de formación de fibras. Las cinéticas de agregación obtenidas como emisión de fluorescencia de ThT, se han modificado para que reflejen el porcentaje de fibras formadas según la emisión de fluorescencia en la fase final de estancamiento y el porcentaje de fibras final formado según la estimación obtenida por análisis electroforético.

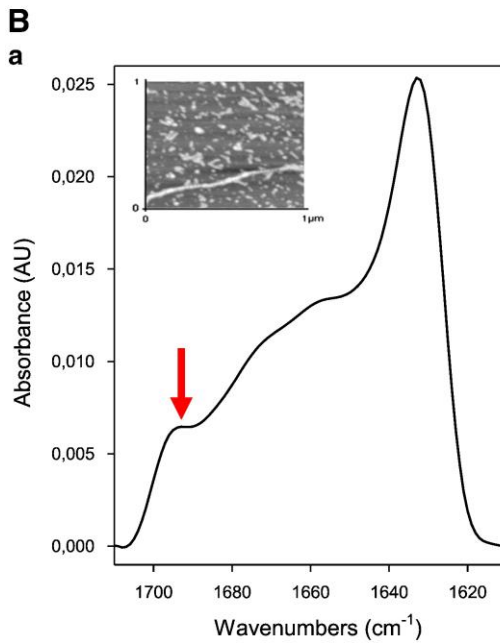
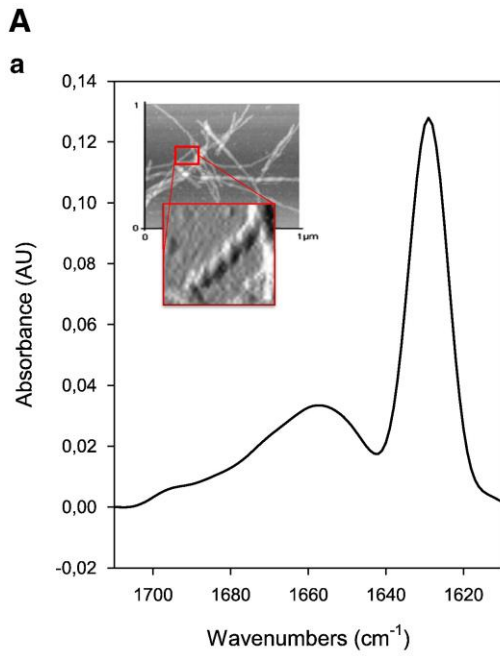
#### **4.5 Espectroscopía de infrarrojo**

La espectroscopía de infrarrojo y, en particular, la espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés), nos da información sobre la estructura secundaria de la proteína cuando se encuentra en diferentes estados o especies a través del espectro en la región  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones del enlace amida I (principalmente provenientes del enlace C=O del enlace peptídico) [59]. Comparando la cantidad de estructura en random coil y en lámina  $\beta$  de los agregados se puede permitir diferenciar entre fibras y oligómeros de proteínas amiloides [60].

En un espectro infrarrojo de proteínas en la banda de la amida I se observan picos cuya posición respecto al número de onda indica el tipo de estructura secundaria que presenta la proteína y su intensidad indica la proporción de ese tipo de estructura. Sabemos que las fibras amiloides son ricas en estructura en lámina  $\beta$  intermolecular y este tipo de estructura presenta una banda en la región amida I característica en torno a  $1620-1625\text{ cm}^{-1}$  [60]. En el caso de fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína, el contenido en lámina  $\beta$  es alrededor de un 60%, mientras que el de las especies oligoméricas es significativamente menor. Así, en el caso de dos tipos de oligómeros que han sido atrapados previamente, denominados oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína tipo A y tipo B, el contenido en láminas  $\beta$  es esencialmente nulo en el caso del oligómero tipo A o en torno al

30% en el caso del oligómero tipo B (estimación obtenida por FT-IR y resonancia magnética nuclear en estado sólido) [14, 15].

Las muestras de agregados para su análisis por FT-IR se prepararon de la siguiente manera: una muestra de fibras de  $\alpha$ -sinucleína de 30  $\mu$ l se centrifugó dos veces, 10 minutos a 16 000 rpm en una centrífuga (Microfuge 16 centrifuge, Beckman Coulter) y se resuspendió el pellet formado en 25  $\mu$ l de tampón PBS deuterado (obtenido al resuspender PBS en óxido de deuterio), teniendo una concentración de al menos 4 mg/ml. La muestra se deposita entre dos ventanas CaF<sub>2</sub> de 32x3 mm separadas por un espaciador de PTFE de 25x0.056 mm y se mide en el espectrofotómetro VERTEX 70 FTIR (Bruker, Billerica, Estados Unidos), equipado con un detector MCT refrigerado en nitrógeno líquido.



**Figura 5.** Espectro FT-IR en la región amida I de fibras (A) y de oligómeros (B) del péptido Ab42. La flecha roja indica la banda centrada a  $1695 \text{ cm}^{-1}$ , que constituye la mayor diferencia entre ambos espectros. Figura adaptada de Sarroukh et al., 2013 [60].

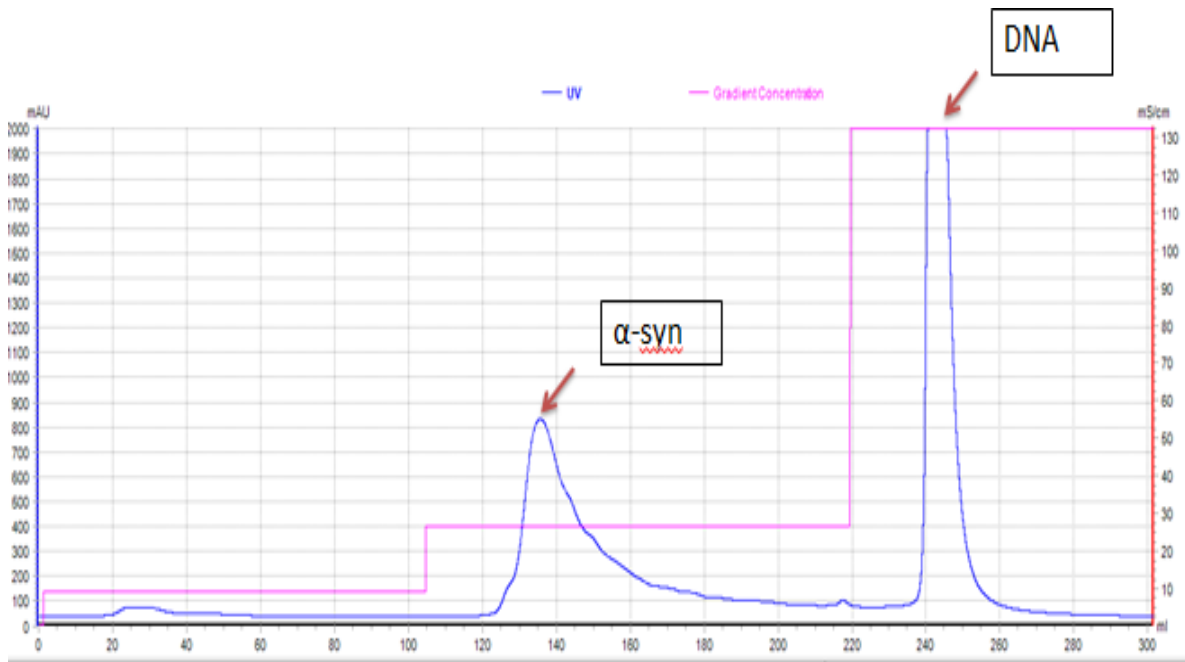


## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expresión y purificación de $\alpha$ -sinucleína

Se transformaron las células de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) mediante choque térmico y después se sobreexpresó y purificó la  $\alpha$ -sinucleína. Durante la purificación, se tomaron alícuotas de distintas partes del proceso que fueron analizadas por SDS-PAGE electroforesis para comprobar el proceso de purificación. Finalmente, se midió la concentración de la proteína obtenida por espectroscopía de absorbancia. En los siguientes apartados se muestran los resultados.

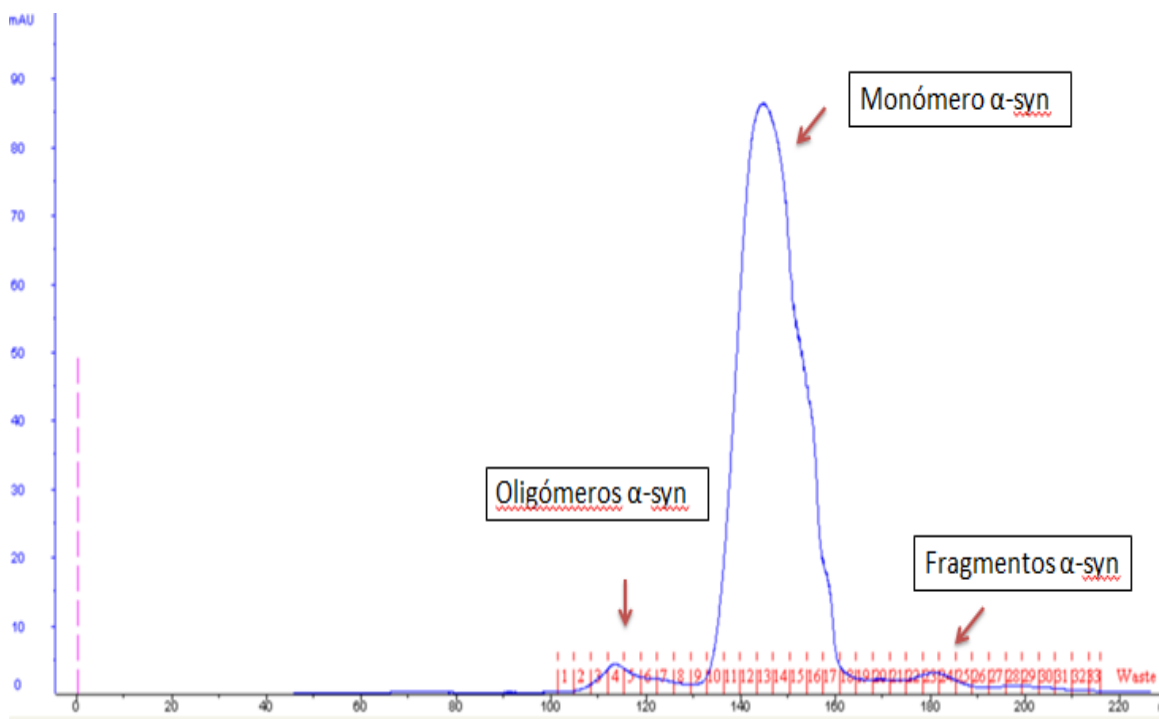
*Cromatografía de intercambio aniónico-* Se realizó un gradiente discontinuo en solución de alta concentración de sal (solución B), en tres escalones para optimizar la purificación de la proteína. Al comienzo de la elución aparece una cantidad residual de proteínas que eluyen a 0% de solución B, mientras que al aumentar al 20% la solución en B,  $\alpha$ -sinucleína eluye de la columna, observándose un pico en la absorbancia a 280 nm. Tras más de dos volúmenes de columna, se cambió a un 100% de solución B para que eluya el ADN remanente en la solución de proteína (que permanece tras dos precipitaciones con sulfato de estreptomicina; ver Materiales y Métodos, sección 4.2).



**Figura 6.** Cromatograma de intercambio aniónico de  $\alpha$ -sinucleína.

*Cromatografía de exclusión molecular*- Las fracciones recogidas correspondientes al pico de  $\alpha$ -sinucleína observado en el paso de cromatografía de intercambio aniónico se cargaron en una columna de exclusión molecular tras un paso de diálisis en PBS.

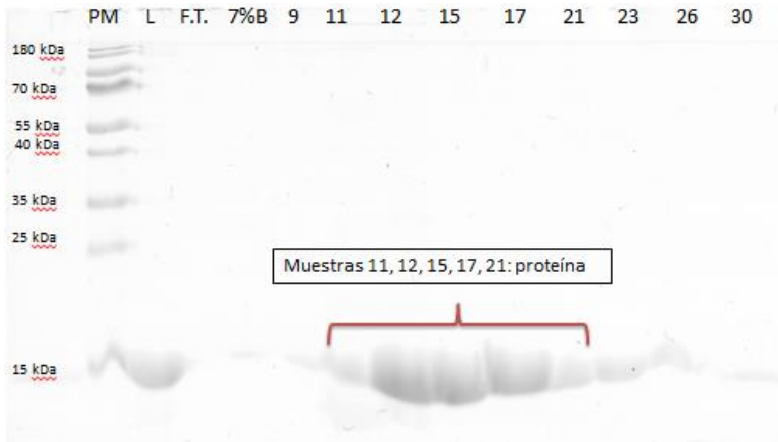
En el cromatograma de elución (Figura 7) observamos un primer pico correspondiente a la fracción de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína. En torno a los 140 ml de elución, aparece un pico con una absorción muy intensa que corresponde al monómero de  $\alpha$ -sinucleína. Por último, se observa un pico posterior poco intenso que corresponde a la fracción de fragmentos de proteína.



**Figura 7.** Cromatograma de exclusión molecular de obtenido durante la purificación de  $\alpha$ -sincucleína humana silvestre recombinante.

En las siguientes figuras (Figuras 8 y 9), se muestran dos geles de electroforesis SDS-PAGE 15 % acrilamida correspondiente a las diferentes alícuotas durante la cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión molecular, respectivamente.

Por un lado, en figura 8, se observa una banda alrededor de 15 kDa, correspondiente a la proteína (muestras 11, 12, 15, 17, 21); el resto, al no haber banda presente, confirman la ausencia de proteína.



**Figura 8.** Gel de las fracciones provenientes de cromatografía de intercambio iónico. Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida. Calles 7-11:  $\alpha$ -sinucleína. PM: marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, ThermoFisher).

Por otro lado, en la figura 9, se analizaron mediante electroforesis muestras obtenidas tras la cromatografía de exclusión molecular. Se tomaron varias alícuotas, donde la muestra 15 representa el monomero de proteína, mientras que las demás corresponden a oligómeros (muestra 4) o fragmentos de proteína (muestras 17, 18, 20 y 23).



**Figura 9.** Gel de la fracción monomérica de  $\alpha$ -sinucleína obtenida en la cromatografía de exclusión molecular. Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida. Calle 15: monómero de  $\alpha$ -sinucleína. PM: marcador de peso molecular.

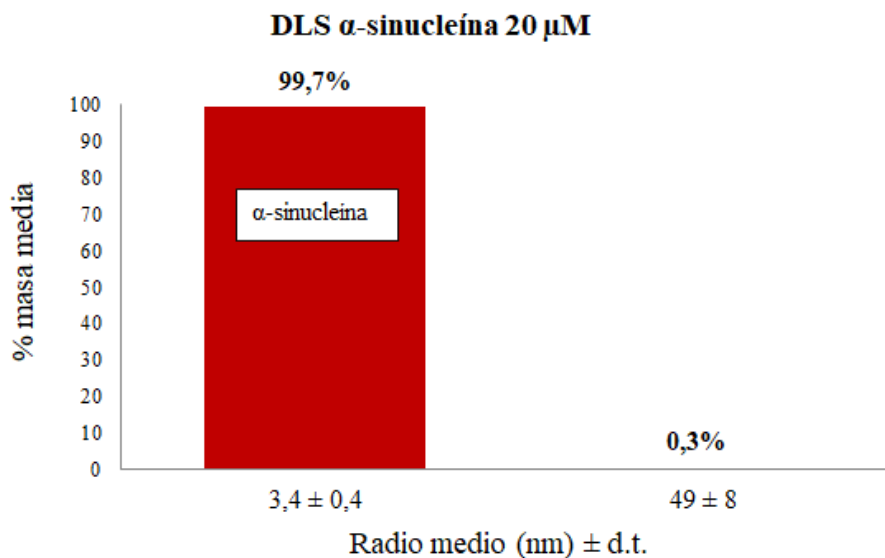
Por último, mediante la técnica MALDI-TOF se determinó el peso molecular de la proteína. Se obtuvo un único pico significativo con una masa de 14 442.11 Da (Servicio de Proteómica del Centro de Investigación Biomédica de Aragón, CIBA), el cual se aproxima bastante bien al peso molecular teórico obtenido en la página web de ProtParam, Expasy, de 14 460.16 Da. La concentración de proteína en la muestra final

de purificación fue de 227.5  $\mu\text{M}$ , con un rendimiento de la purificación de 8 mg por litro de cultivo.

## 5.2 Caracterización de los compuestos por DLS

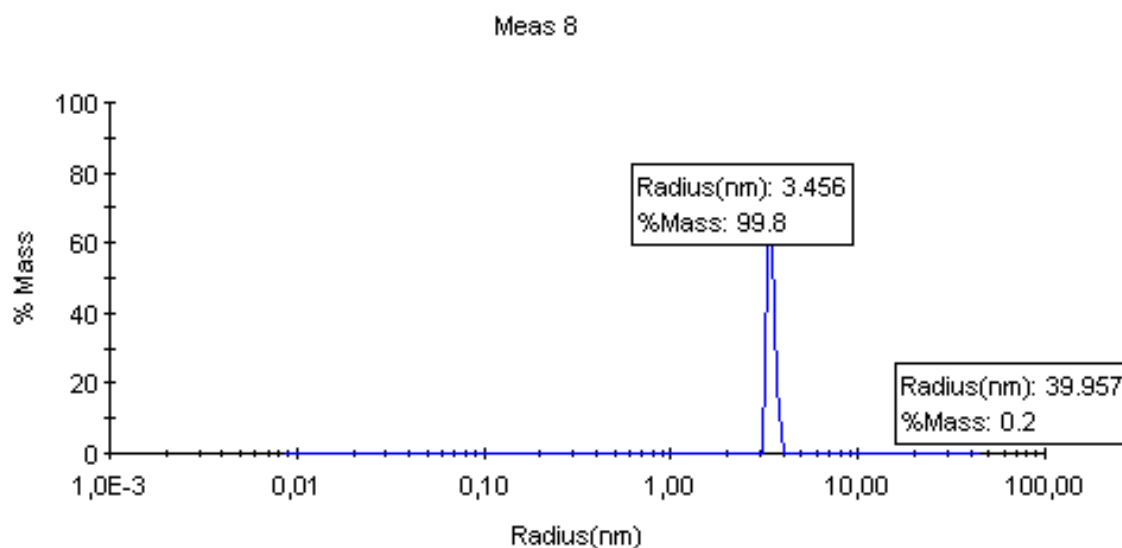
Para poder comprender mejor cómo se comportan los inhibidores durante el proceso de agregación de  $\alpha$ -sinucleína, se realizaron ensayos de DLS para comprobar la estabilidad de los compuestos y su tendencia a formar agregados o clústers de compuestos a las concentraciones y condiciones de medida. Esta técnica mide la velocidad del movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de la partícula. El movimiento browniano es un movimiento al azar de las partículas debido al “golpeteo” de las moléculas del solvente alrededor de ellas. Entonces, esta determinación puede realizarse sobre partículas en suspensión líquida. A mayor tamaño, más lento es su movimiento. Debido a que la intensidad de luz dispersada por una partícula viene dado por la sexta potencia de su tamaño (radio hidrodinámico), partículas pequeñas como los compuestos, en su forma monomérica, utilizados en este trabajo no entran en el rango dinámico de medida del equipo de DLS utilizado. Es por eso, que se desarrolló una estrategia para estimar, de forma aproximada, el porcentaje de compuesto que haya podido formar agregados en la muestra durante el tiempo que duran las primeras etapas de la reacción de agregación de la proteína (dos días). A diferentes concentraciones de compuesto se le añadió 20  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -sinucleína en condiciones idénticas a los experimentos de agregación, pero con menor concentración de proteína y sin bolas de teflón, por lo que no se promueve la agregación. En estas condiciones, se descartaron las concentraciones de compuestos donde se identificaron concentraciones significativas de compuesto agregado para su utilización en los experimentos de inhibición.

Como primer experimento, se caracterizó una muestra de 20  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -sinucleína como control y se obtuvo una especie mayoritaria (aprox. 100%) con un radio hidrodinámico promedio de 3.4 nm  $\pm$  0.4 (Figuras 10 y 11), que coincide muy bien con los valores obtenidos para esta proteína en su estado monomérico tanto por DLS y como por otras técnicas como resonancia magnética nuclear [61].



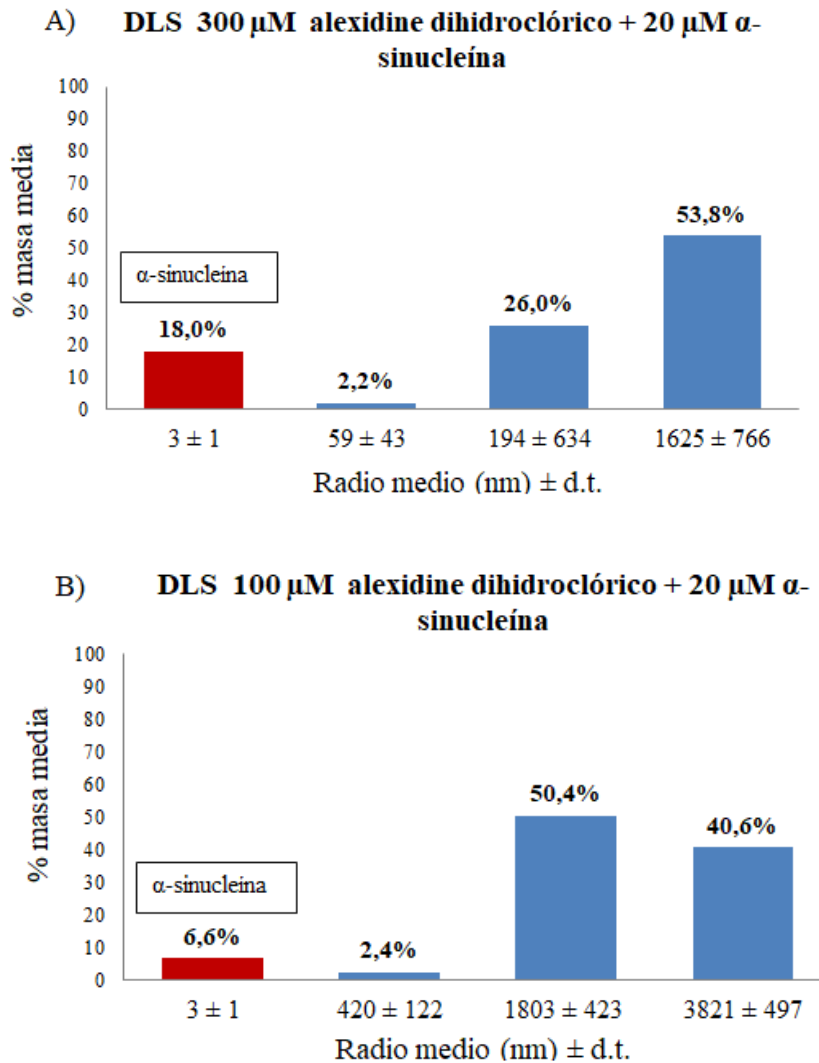
**Figura 10.** Gráfica de DLS de  $\alpha$ -sinucleína a 20  $\mu$ M. En el eje X se muestra el radio medio (medido en nanómetros, nm)  $\pm$  desviación típica y, en el eje Y, el porcentaje de masa media. La proteína está en su mayoría no agregada (barra roja).

Asimismo, en la siguiente figura (Figura 11), mostramos una medida del radio hidrodinámico y porcentaje en masa que realiza el equipo de DLS.



**Figura 11.** Datos obtenidos de una medida de DLS de la  $\alpha$ -sinucleína a 20  $\mu$ M. En la gráfica se muestra el radio medio (medido en nanómetros, nm) en el eje X y, el porcentaje en masa de las diferentes especies, en el eje Y. Se observa esencialmente un pico correspondiente a la forma monomérica de la proteína.

Cuando los diferentes compuestos fueron analizados, se observaron compuestos que presentaban concentraciones significativas de compuesto agregado a las dos concentraciones de estudio (más del 10% de la concentración total de compuesto se encuentra agregado, siendo las dos concentraciones de estudio 100 y 300  $\mu\text{M}$ ). Es el caso del alexidine dihidroclorico (Figura 12). En otros casos, se observó agregación significativa a 300  $\mu\text{M}$  pero no a 100  $\mu\text{M}$ , como es el caso de SynuClean-D y el ácido fólico (Figura 13). Por último, se encontraron compuestos que no mostraban agregación significativa a ninguna de las concentraciones analizadas, como es el caso de la quercitina, benzobromarona, 6° compuesto, colato sódico y lanosterol (Figura 14). En todas las figuras se han calculado los valores medios del radio y el porcentaje en masa teniendo en cuenta de 15 a 20 medidas.

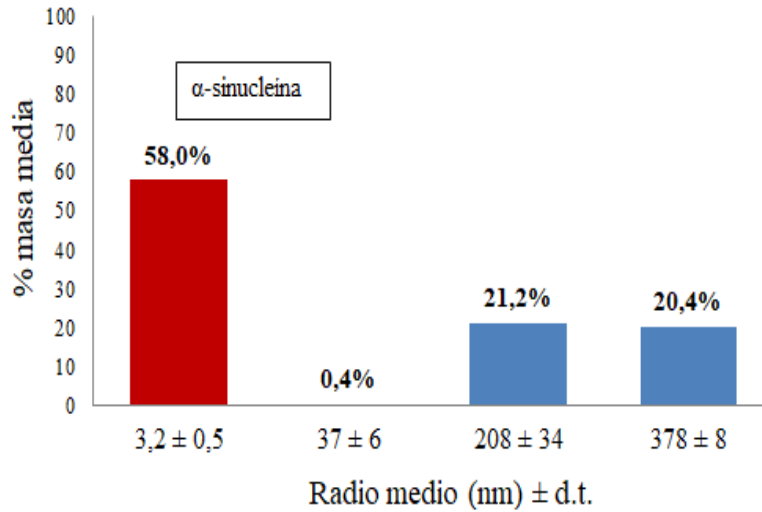


**Figura 12.** Resultados del análisis por DLS de 300  $\mu$ M (A) y 100  $\mu$ M (B) de alexidine dihidroclórico + 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína.

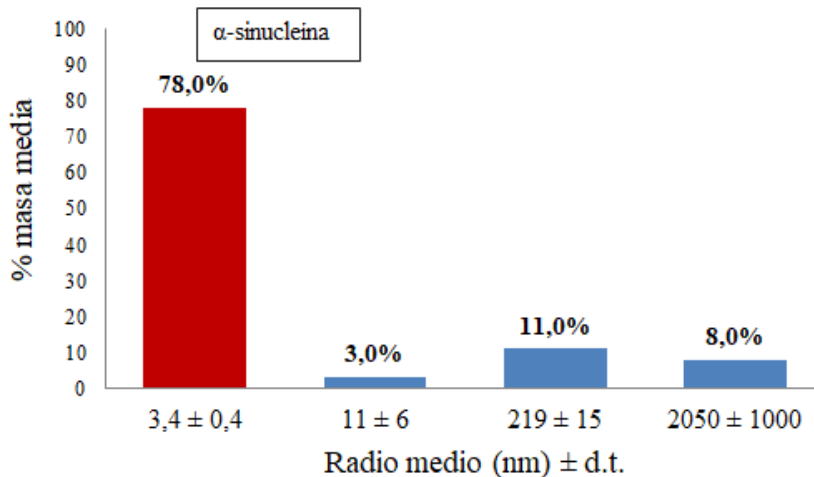
En ambos casos, la mayoría de la masa de especies detectada corresponde a agregados de compuesto que en todos los casos a estas concentraciones y condiciones de estudio, supone más del 20% de compuesto agregado; en algunos casos incluso prácticamente la totalidad del compuesto



**A) DLS 300  $\mu$ M ácido fólico + 20  $\mu$ M  $\alpha$ -sinucleína**



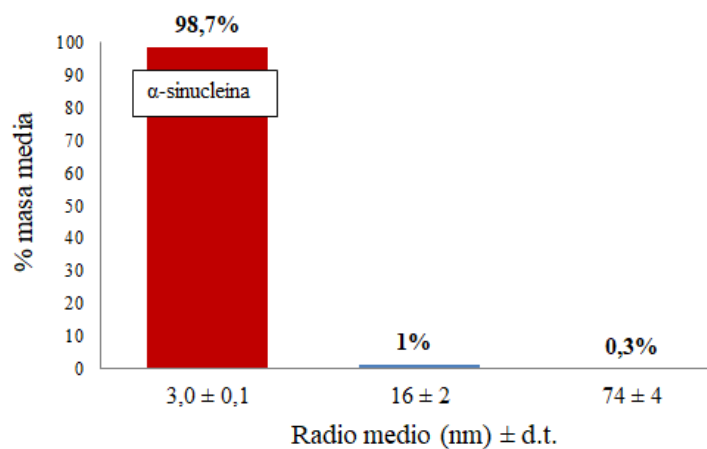
**B) DLS 100  $\mu$ M ácido fólico + 20  $\mu$ M  $\alpha$ -sinucleína**



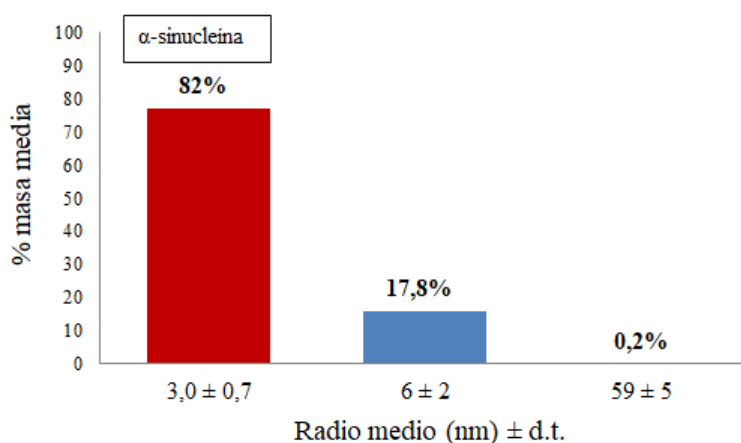
**Figura 13.** Resultados del análisis por DLS de muestras de 300  $\mu$ M (A) y 100  $\mu$ M (B) de **ácido fólico** + 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína.

A 300  $\mu$ M de ácido fólico (A), el 42% de la masa de especies detectadas corresponde al compuesto agregado, mientras que el 58% corresponde a  $\alpha$ -sinucleína monomérica (barra roja); lo que supone una concentración de compuesto agregado estimada de ca. 15%. A 100  $\mu$ M de ácido fólico (B), el porcentaje en masa de compuesto agregado detectado baja al 20%, lo que supone una concentración de compuesto agregado estimada de ca. 5%.

A) **DLS 300  $\mu$ M quercitina + 20  $\mu$ M  $\alpha$ -sinucleína**



B) **DLS 100  $\mu$ M quercitina + 20  $\mu$ M  $\alpha$ -sinucleína**



**Figura 14.** Resultados del análisis por DLS de muestras de 300  $\mu$ M (A) y 100  $\mu$ M (B) de **quercitina** + 20  $\mu$ M de  $\alpha$ -sinucleína. En el eje X se muestra el radio medio (medido en nanómetros, nm)  $\pm$  desviación típica y, en el eje Y, el porcentaje de masa media..

El compuesto se encuentra esencialmente en forma no agregada (concentración menor al 5% en el peor de los casos) a las dos concentraciones analizadas, ya sólo se detecta de forma muy mayoritaria  $\alpha$ -sinucleína a 20  $\mu$ M.

Este análisis se repitió tras la incubación de los compuestos a 37  $^{\circ}$ C por dos días en presencia de una bola de teflón en idénticas condiciones a las que se utilizan en los experimentos de agregación de  $\alpha$ -sinucleína y no se vio un cambio de comportamiento con respecto a las muestras iniciales antes de incubar (Tabla 2). Las concentraciones de compuestos donde se identificaron concentraciones de compuesto agregado igual o mayor al 10% de la concentración de compuesto total fueron descartadas para su utilización en los experimentos de inhibición.

**Tabla 2.** Estimación del rango de concentraciones de compuesto en las condiciones de medida en el que los agregados de compuesto suponen menos del 10% de la masa de la proteína.

<b>Compuestos</b>	<b>A tiempo inicial de la incubación</b>	<b>Después de 2 días de incubación</b>
<b>Quercitina</b>	$\leq 300 \mu\text{M}$	$\leq 300 \mu\text{M}$
<b>Benzobromarona</b>	$\leq 300 \mu\text{M}$	$\leq 300 \mu\text{M}$
<b>Ácido fólico</b>	$\leq 100 \mu\text{M}$	$\leq 100 \mu\text{M}$
<b>SynuClean-D</b>	$\leq 100 \mu\text{M}$	$\leq 100 \mu\text{M}$
<b>Alexidine dihidroclórico</b>	$\leq 50 \mu\text{M}$	$\leq 50 \mu\text{M}$
<b>6° compuesto</b>	$\leq 300 \mu\text{M}$	$\leq 300 \mu\text{M}$
<b>Colato de sodio</b>	$\leq 300 \mu\text{M}$	$\leq 300 \mu\text{M}$
<b>Lanosterol</b>	$\leq 300 \mu\text{M}$	$\leq 300 \mu\text{M}$

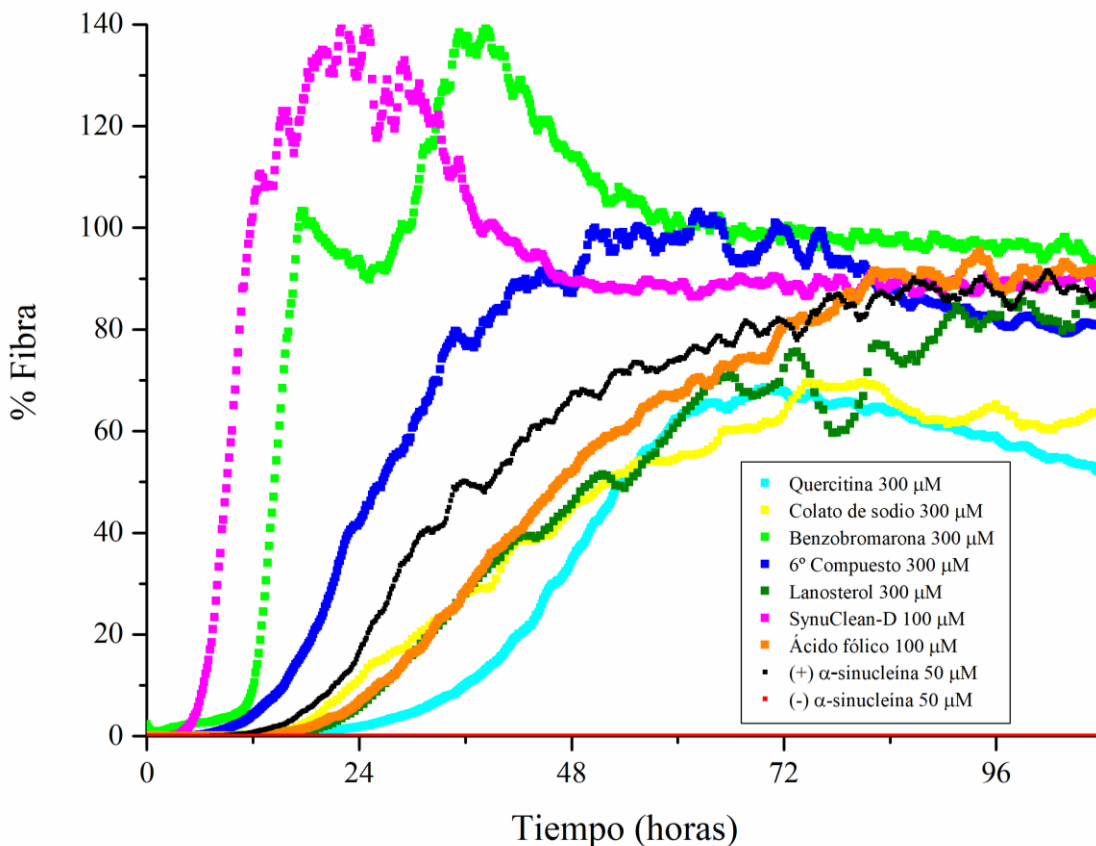
En vista a estos resultados, se descartó el alexidine dihidroclórico para realizar posteriores experimentos de cinéticas de inhibición, de la misma forma que se escogieron las concentraciones de  $300 \mu\text{M}$  para quercitina, benzobromarona, 6° compuesto, colato sódico y lanosterol y, de  $100 \mu\text{M}$ , para SynuClean-D y ácido fólico. En todas las medidas de todas las muestras, el porcentaje de polidispersidad estimado por el equipo fue menor del 15% ( $\%Pd < 15\%$ ), de modo que la estimación de los radios hidrodinámicos asumiendo que las especies son esféricas es aceptable.

### **5.3 Estudio de la inhibición de la agregación de $\alpha$ -sinucleína mediante cinéticas de agregación**

Una vez realizado el estudio de la estabilidad de los compuestos, se realizaron los estudios de la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína a una concentración de proteína de

50  $\mu\text{M}$ , en presencia de los distintos compuestos a 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$  de concentración siguiendo los cambios de la intensidad de fluorescencia de ThT.

Las cinéticas de agregación en presencia de compuesto siguen una curva sigmoidea similar a la cinética del control [40] en la que en algunos casos vemos una aceleración aparente de la agregación, como en el caso de la benzobromarona o SynuClean-D; en este último caso fuera de todo lo esperado, ya que se esperaba que inhibiera la agregación [48]. En la figura 15 se muestra una curva representativa (N=3-6; ver reproducibilidad de las curvas por cada condición en los Anexos, Figuras A1-A7) para cada uno de los compuestos analizados a la máxima concentración usada (que varía de acuerdo al análisis previo de las estabildades de los compuestos por DLS) en microplacas de PS con recubrimiento de PEG (muy hidrofílicas) y que, por tanto, no favorecen la unión de la proteína a las paredes del pocillo (de ahí que se las denomine también “low-binding”, “con baja unión”, traducido del inglés).

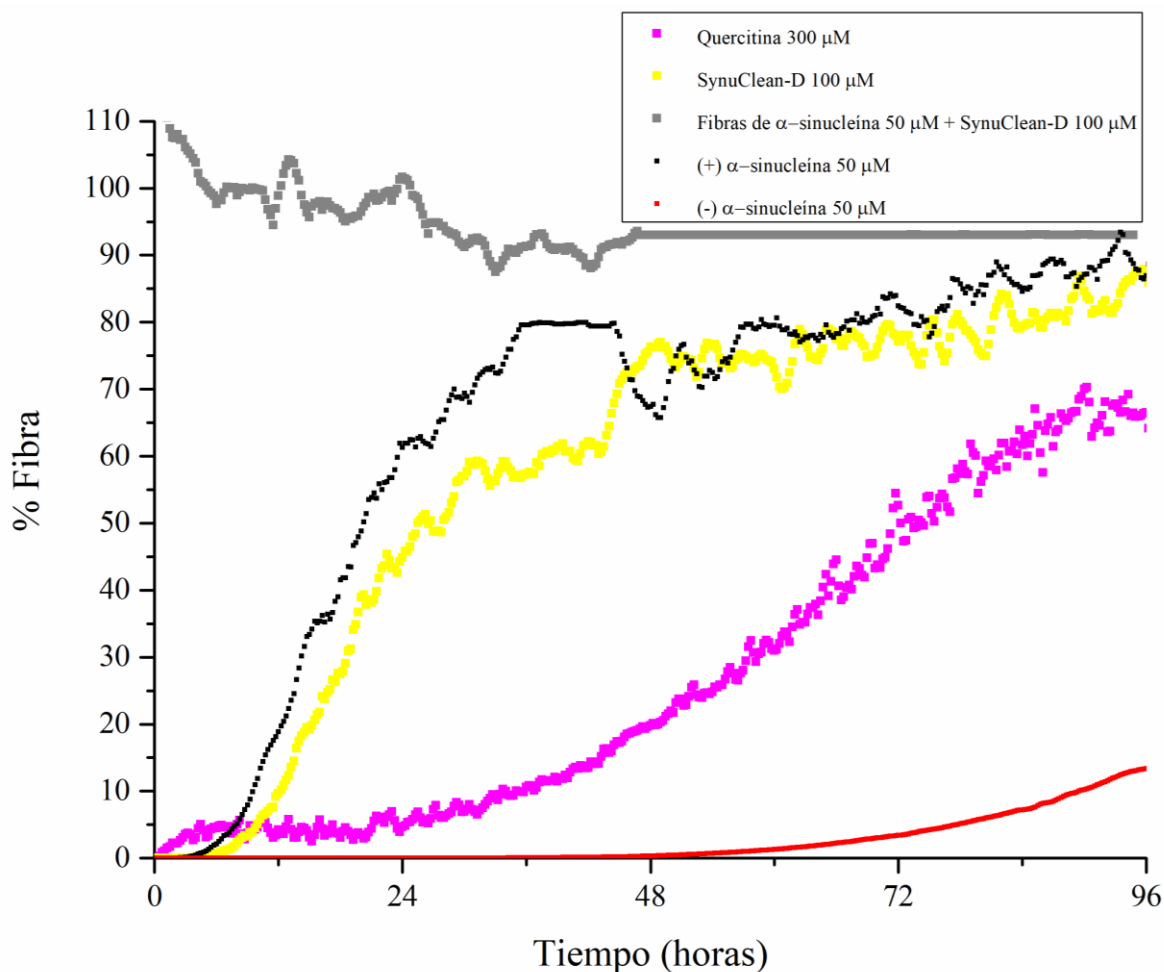


**Figura 15.** Cinética de agregación en microplaca PS recubierta de PEG. Se compara el porcentaje de

fibras de  $\alpha$ -sinucleína con el tiempo de incubación con quercitina, colato sódico, benzobromarona, 6° compuesto y lanosterol a 300  $\mu$ M y, SynuClean-D y ácido fólico, a 100  $\mu$ M.

A diferencia del resultado obtenido para SynuClean-D, se observó una inhibición significativa y clara del compuesto quercitina en la agregación de  $\alpha$ -sinucleína.

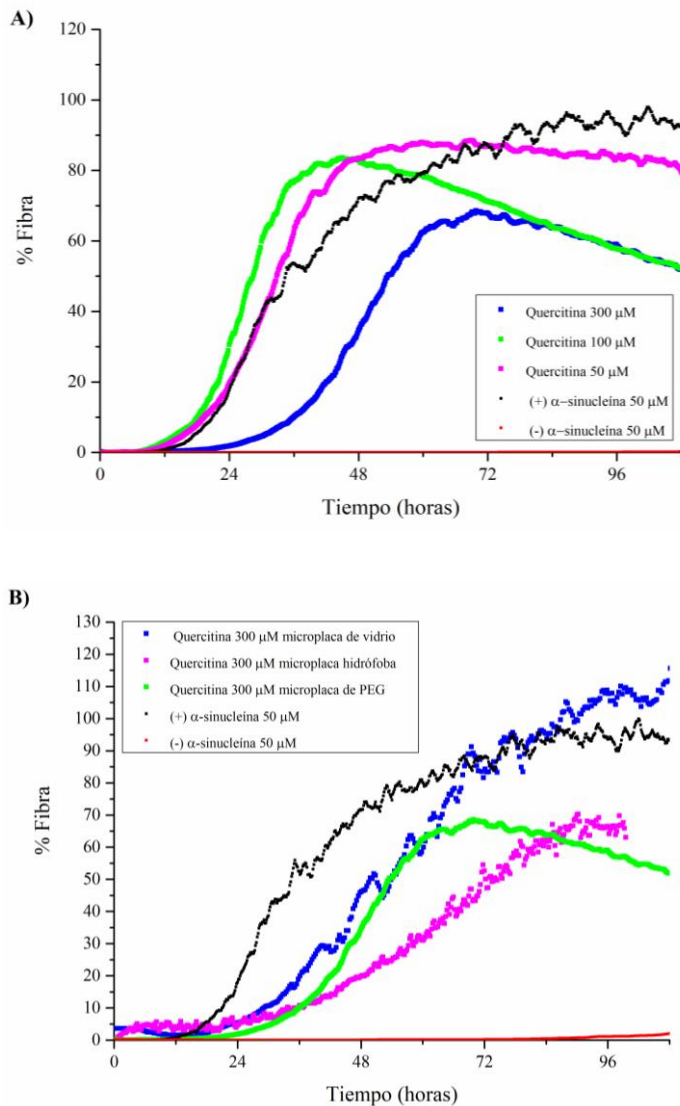
Con el fin de analizar si el uso de placas "non-binding" pudiese alterar el comportamiento de SynuClean-D, decidimos reproducir el experimento con el mismo tipo de microplacas y condiciones que se usaron en anteriores estudios [44, 48], con la excepción de que en nuestros experimentos se realizan en quiescencia y en los anteriormente publicados agitan de forma vigorosa y continuamente la solución de proteína. Así, se procedió a ensayar la inhibición de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de SynuClean-D a concentración de 100  $\mu$ M y de quercitina a 300  $\mu$ M en microplacas de PS, por lo tanto de material hidrófobo. Asimismo, se incubaron fibras ya formadas en presencia de SynuClean-D para comprobar si el compuesto las desagregaba como se ha visto anteriormente [48]. En estos experimentos, también se incluyeron muestras con quercitina a 300  $\mu$ M con el fin de analizar su efecto sobre la agregación de  $\alpha$ -sinucleína cuando los experimentos se realizan en placas con propiedades diferentes (Figura 16). En estos experimentos, también se incluyeron muestras con quercitina a 300  $\mu$ M con el fin de analizar su efecto sobre la agregación de  $\alpha$ -sinucleína cuando los experimentos se realizan en placas con propiedades diferentes.



**Figura 16.** Cinética de agregación en microplaca hidrófoba. Se compara el porcentaje de fibras de  $\alpha$ -sinucleína que se forman durante 96 horas de incubación con quercitina a 300  $\mu\text{M}$  y SynuClea-D a 100  $\mu\text{M}$ . Además, se muestra el porcentaje de fibra desagregada al ser incubada con SynuClea-D a 100  $\mu\text{M}$ .

A pesar de la utilización del mismo tipo de microplacas usadas en Pujols et al. [48], no se observó un efecto inhibitorio de SynuClea-D en la agregación de la proteína, ni en la estabilidad de las fibras pre-formadas. En contra, se vio que la quercitina tenía un efecto inhibitorio significativo, incluso aparentemente mayor que cuando se usaron placas recubiertas de PEG. Es sabido y reconocido que las superficies, particularmente las superficies hidrofóbicas, influyen en la agregación de  $\alpha$ -sinucleína [29, 62], particularmente en la nucleación primaria, [63], por lo que podemos afirmar que el contenedor donde se llevan a cabo las cinéticas de inhibición *in vitro* puede influir en gran medida en el proceso cinético de agregación de  $\alpha$ -sinucleína, como hemos podido

observar en este estudio. Por este motivo, aparte de los dos tipos anteriores de microplacas utilizadas para estudiar las cinéticas de agregación, incluimos un tercer tipo, las microplacas de PS con recubrimiento de vidrio. En la siguiente figura (Figura 17) se muestran las curvas de las cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína en presencia de 300, 100 y 50  $\mu$ M de quercitina obtenidas en una microplaca de 96 pocillos de PS recubierta de PEG (panel A) y una comparación de los efectos del compuesto a la máxima concentración analizada (300  $\mu$ M) en microplacas de recubrimiento hidrófobo y en microplacas con recubrimiento de PEG y con recubrimiento de vidrio, respectivamente (Figura 17, panel B).



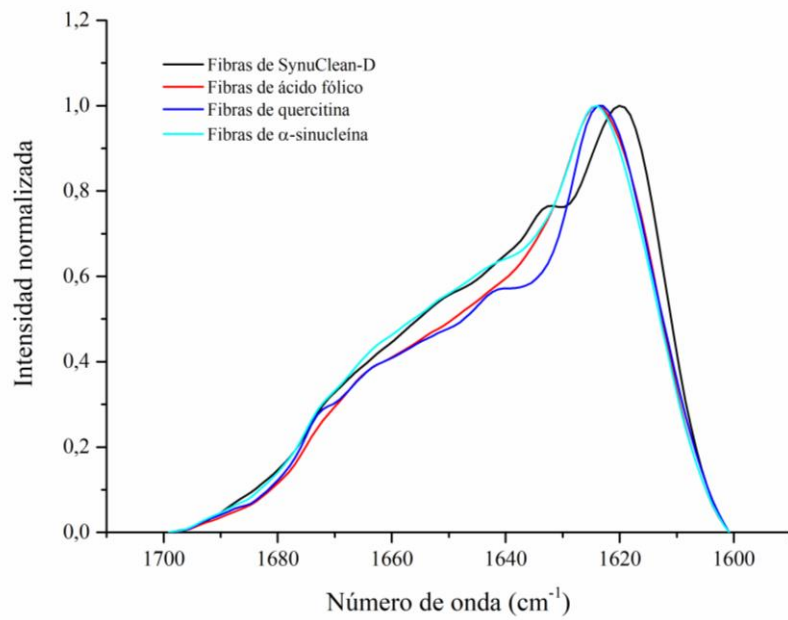
**Figura 17.** Comparación de cinéticas de agregación en presencia de quercitina en microplaca recubierta de PEG a diferentes concentraciones del compuesto (panel A) (ver cuantificación de rendimientos de formación de fibra al final de la reacción en Anexo, figura A8); y en presencia de quercitina a 300  $\mu$ M utilizando microplacas de un material hidrofóbico, recubiertas de PEG, o recubiertas de vidrio (panel B).

En la figura 17, panel B, se aprecia que la microplaca que más retrasa la formación de fibra en presencia de quercitina 300  $\mu\text{M}$  es la placa hidrófoba, mientras que en las dos placas hidrófilas (vidrio y PEG) se tarda mucho menos tiempo en alcanzar porcentajes de formación de fibra similares a las alcanzadas al final de la fase de crecimiento en las placas hidrófobas. De hecho, el rendimiento final de la formación de fibras parece que depende del tipo de placa utilizada, siendo de entorno el 70% (ver figura A8, en Anexos) cuando se utilizaron las microplacas hidrófobas o de recubrimiento de PEG o significativamente superior cuando se utilizaron microplacas aunque este análisis sobre la comparación del rendimiento final de formación de fibras en función del tipo de placa usada en las agregaciones es preliminar y requiere la realización de un mayor número de réplicas para tener resultados robustos y concluyentes. En todo caso, en este estudio es claro el papel inhibitorio de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína por el compuesto quercitina, aunque como agente que retrasa la cinética de agregación más que como agente que inhibe la formación de agregados.

#### **5.4 Caracterización de la estructura de las fibras**

Se tomaron muestras de los agregados formados en las cinéticas de agregación con ThT en microplaca de PS para hacer un estudio de su estructura secundaria por FT-IR con el objetivo de estimar la cantidad de estructura en lámina  $\beta$  de los agregados. Las fibras amiloides tienen una banda característica de lámina  $\beta$  intermolecular que suele aparecer en la región entre 1625-1615  $\text{cm}^{-1}$  con un contenido en este tipo de estructura para las fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína de en torno a 60% [60, 64]. Cuando se analizaron los espectros de FT-IR de los agregados obtenidos en presencia de los diferentes compuestos se observaron espectros muy similares al espectro de fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína en ausencia de compuesto, indicando que los compuestos no han inhibido la formación de fibras amiloides en las condiciones analizadas, ni han modificado significativamente su estructura. Es de resaltar que la quercitina a 300  $\mu\text{M}$ , aunque hemos observado que retrasa la agregación de la proteína, no cambia de forma significativa la estructura secundaria de los agregados de proteína formados después de 5-7 días de incubación de la proteína en las placas de PS con recubrimiento de PEG (Figura 18).





**Figura 18.** Espectro de FT-IR de fibras de  $\alpha$ -sinucleína obtenidas en ausencia de compuestos (en azul cian) o en presencia de SynuClean-D (en negro), ácido fólico (en rojo) o de quercitina (azul oscuro). Todas las fibras se obtuvieron en reacciones de agregación realizadas en microplaca de PEG.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio hemos observado que la quercitina, un flavonoide presente en frutas, verduras y vino, es el único de todos los compuestos analizados que retrasa la formación de fibras amiloides de  $\alpha$ -sinucleína cuando la agregación de la proteína se inicia a través de la superficie de teflón presente en la solución. Para estimar el contenido de lámina  $\beta$  de las fibras amiloides, que es su estructura característica, se utilizó espectroscopía de infrarrojo. Comparamos la estructura secundaria de los agregados de proteína generados en presencia de quercitina con las generadas en su ausencia y se vio que la composición de los agregados es muy similar. El mismo comportamiento se encontró con los agregados generados en presencia de otros compuestos que no retrasan la agregación, como el ácido fólico o SynuClean-D. De este modo, se puede afirmar que la quercitina a 300  $\mu$ M no es un completo inhibidor de la agregación amiloide, si no que retrasa los procesos iniciales. En este estudio se ha utilizado la forma oxidada de la quercitina, que se ha publicado previamente que tiene un efecto mayor que la forma reducida, dado que en la forma oxidada se eleva la hidrofilia de las proteínas y aumenta el potencial inhibidor de la agregación de fibras [47]. Por otro lado, se han estudiado previamente el efecto de otros flavonoides como inhibidores de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, como son la baicaleína o el epigallocatequina galato (EGCG) y se vio que éstos eran mucho más potentes que la quercitina [27]. Por tanto, parece que existe un efecto general de los flavonoides en la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, aunque la actividad específica de cada tipo de flavonoide parece cambiar ya que mientras la baicaleína induce la formación de agregados muy grandes que no adquieren la conformación amiloide [65], el EGCG actúa a nivel de los primeros oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína, atrapando una conformación oligomérica de pequeño tamaño y con estructura desordenada [15]. En cambio la quercitina, como hemos visto en este estudio, retrasa las primeras etapas de la agregación aunque el producto final son fibras amiloides similares en estructura a las formadas en ausencia de compuesto.

Por otro lado, en contra de lo descrito en la literatura [44, 48], no hemos observado ni inhibición de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína por el compuesto SynuClean-D, ni actividad desagregante de fibras pre-formadas. No podemos explicar en este punto la razón de la

discrepancia, pero en principio debería estar relacionada con la única diferencia aparente entre las condiciones experimentales utilizadas que es la diferencia en la agitación vigorosa de los experimentos realizados en Pujols et al [44, 48] en contra de los experimentos sin agitación, en quiescencia, realizados en este estudio.

En tercer lugar, tampoco se vio que el resto de compuestos (benzobromarona, ácido fólico, 6° compuesto, colato de sodio y lanosterol) mostraran efecto inhibitorio en la formación de fibra amiloide de  $\alpha$ -sinucleína. No obstante, se ha visto que la benzobromarona y el ácido fólico, junto con la quercitina, inhiben la agregación de la amilina, un péptido encargado de regular la cantidad de glucosa presente en sangre, y cuya agregación tiene lugar en la diabetes mellitus tipo II [50]. Además, el 6° compuesto inhibe la agregación del péptido  $\beta$  amiloide, involucrado en la formación de placas seniles extracelulares, características del Alzheimer [49]. Estos compuestos, por tanto, podrían ser específicos del tipo de proteína o péptido amiloidegénico. Otro compuesto que se identificó como inhibidor de péptido  $\beta$  amiloide es el alexidine dihidroclórico [49] que no fue analizado en las cinéticas de agregación al no ser estable en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.

Es relevante comentar que mientras se ha demostrado una actividad inhibitoria importante para la escualamina [51-53], el lanosterol, que es el precursor natural de este compuesto, no posee dicha actividad, por lo que parece que la cadena de espermidina ausente en el lanosterol y presente en la escualamina juega un papel esencial en la actividad inhibitoria de este último compuesto. En estudios anteriores se estudió la capacidad inhibitoria de la espermidina y se vio que actúa a nivel de monómero de  $\alpha$ -sinucleína, uniéndose a la región C-terminal cargada negativamente a través de las cargas positivas de la espermidina y rompiendo, así las interacciones electrostáticas intramoleculares de larga distancia que se postulan como clave para evitar el inicio del auto-ensamblaje la proteína [35].

Por último, en este estudio se ha puesto de manifiesto la relevancia de los protocolos experimentales en el análisis de posibles efectos de moléculas en la agregación amiloide de  $\alpha$ -sinucleína. Por un lado, y a diferencia de una mayoría de estudios sobre efectos de

compuestos en la actividad de una proteína, hemos estudiado la estabilidad de los compuestos de estudio en las condiciones de ensayo. De este modo, se ha hecho una estimación de las concentraciones de compuesto en las que la proteína no forma agregados y así estar lo más seguros posible de que el compuesto se une a la proteína en forma monomérica y no en una forma agregada de compuesto.

Por otro lado, respecto a las condiciones experimentales de las cinéticas, hemos visto la influencia del “contenedor” de las muestras de proteína en las cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína. En concreto, se ha visto que el material del que está hecho el contenedor y que está en contacto con la solución de proteína influye en las cinéticas de agregación y en los efectos de los inhibidores en este proceso. Así, la quercitina a 300  $\mu\text{M}$  retrasa la cinética hasta 12 horas más en la microplaca hidróba en comparación con las microplacas de recubrimiento hidrófilo (vidrio y PEG). Las placas de PS recubiertas de PEG (placas “low-binding” generalmente utilizadas en estudios de cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína) solamente retrasan la formación de fibras que, al sexto día de agregación, no muestra diferencias aparentes con las fibras formadas en ausencia de compuesto (aunque estas fibras permanecen en equilibrio con alrededor de 35% de monómero; por tanto el rendimiento de formación de fibras baja de más del 95% en ausencia de compuesto a aprox. 65% en presencia de quercitina a 300  $\mu\text{M}$  en placas de PS recubiertas de PEG). Ya que las superficies hidrofóbicas se han visto particularmente relevantes en la nucleación primaria de  $\alpha$ -sinucleína, los estudios sobre las cinéticas de agregación de esta proteína no deberían realizarse en placas o contenedores de materiales hidrofóbicos como las placas de PS. Por otro lado, en este estudio hemos visto que las agregaciones de  $\alpha$ -sinucleína y en concreto el efecto de la quercitina en las cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína se ven influenciadas por materiales que se suponían inertes (placas “low-binding”) por lo que habría que analizar en más profundidad estos efectos. Ya que se ha visto en el grupo en el que se realizó el estudio, que el recubrimiento de PEG tiene efectos en la capacidad de autoensamblaje de  $\alpha$ -sinucleína y dado los resultados obtenidos en este estudio, es necesario realizar más experimentos para ver qué tipo de placa hidrófila (PEG o vidrio) es más adecuada para estudiar el efecto inhibitorio de la quercitina. Tras caracterizar las fibras de proteína formadas tras la incubación con

quercitina por espectroscopía de infrarrojo concluimos que no hay diferencias significativas con la proteína incubada en ausencia del compuesto.

## 7. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

- Hemos estudiado la estabilidad de los ocho compuestos candidatos mediante DLS y hemos establecido el rango óptimo de concentraciones de compuesto adecuado para su análisis en las cinéticas de agregación de  $\alpha$ -sinucleína.
- De todos los compuestos estudiados, la quercitina es el único capaz de retrasar la formación de agregados amiloide en  $\alpha$ -sinucleína.
- El tipo de microplacas influye en el rendimiento de la cinética de agregación de  $\alpha$ -sinucleína incubada con quercitina a 300  $\mu$ M.
- No se ha observado a ningún compuesto inhibir completamente la formación de fibra, ni en atrapar conformaciones oligoméricas intermedias en nuestros experimentos.
- *We have studied the stability of the eight compound candidates through DLS and have established an optimum concentration range adequate for the aggregation kinetics with  $\alpha$ -synuclein.*
- *Among all the compounds analysed, quercetin is the only one able to delay the  $\alpha$ -synuclein aggregation.*
- *The coating of microplates has an important effect on the yielding of  $\alpha$ -synuclein aggregation reaction when incubated with 300  $\mu$ M quercetin.*
- *None of the eight compounds has been reported to inhibit  $\alpha$ -synuclein aggregation thoroughly or trap any oligomeric intermediate in our experiments.*

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Chiti F, Dobson CM: **Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease.** *Annual Review of Biochemistry* 2006, **75**(1):333-366.
2. Amaral MD: **CFTR and chaperones.** *Journal of Molecular Neuroscience* 2004, **23**(1):41-48.
3. Lomas DA, Carrell RW: **Serpinopathies and the conformational dementias.** *Nature Reviews Genetics* 2002, **3**(10):759-768.
4. Chiti F, Dobson CM: **Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade.** *Annual Review of Biochemistry* 2017, **86**(1):27-68.
5. Cremades N, Chen SW, Dobson CM: **Chapter Three - Structural Characteristics of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers.** In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Edited by Sandal M, vol. 329: Academic Press; 2017: 79-143.
6. Baldwin AJ, Knowles TPJ, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammass SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL *et al*: **Metastability of Native Proteins and the Phenomenon of Amyloid Formation.** *Journal of the American Chemical Society* 2011, **133**(36):14160-14163.
7. Eisenberg D, Jucker M: **The Amyloid State of Proteins in Human Diseases.** *Cell* 2012, **148**(6):1188-1203.
8. Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT *et al*: **Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers.** *Nature* 2007, **447**(7143):453-457.

9. Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CCF: **Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction**<sup>11</sup>Edited by **F. E. Cohen**. *Journal of Molecular Biology* 1997, **273**(3):729-739.
10. Cremades N, Dobson CM: **The contribution of biophysical and structural studies of protein self-assembly to the design of therapeutic strategies for amyloid diseases**. *Neurobiology of Disease* 2018, **109**:178-190.
11. Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S *et al*: **In vivo demonstration that  $\alpha$ -synuclein oligomers are toxic**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**(10):4194.
12. Karpinar DP, Baliya MBG, Kügler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, Kim H-Y, Taschenberger G, Falkenburger BH, Heise H *et al*: **Pre-fibrillar  $\alpha$ -synuclein variants with impaired  $\beta$ -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models**. *The EMBO Journal* 2009, **28**(20):3256-3268.
13. Cremades N, Cohen Samuel IA, Deas E, Abramov Andrey Y, Chen Allen Y, Orte A, Sandal M, Clarke Richard W, Dunne P, Aprile Francesco A *et al*: **Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of  $\alpha$ -Synuclein**. *Cell* 2012, **149**(5):1048-1059.
14. Chen SW, Drakulic S, Deas E, Ouberaï M, Aprile FA, Arranz R, Ness S, Roodveldt C, Guilliams T, De-Genst EJ *et al*: **Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during  $\alpha$ -synuclein fibril formation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015, **112**(16):E1994-E2003.



15. Fusco G, Chen SW, Williamson PTF, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N *et al*: **Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers.** *Science* 2017, **358**(6369):1440-1443.
16. Kim TD, Paik SR, Yang C-H: **Structural and Functional Implications of C-Terminal Regions of  $\alpha$ -Synuclein.** *Biochemistry* 2002, **41**(46):13782-13790.
17. de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alpérovitch A, Rocca WA: **Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997, **62**(1):10-15.
18. Dunnett SB, Björklund A: **Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease.** *Nature* 1999, **399**(6738):A32-A39.
19. Forno LS: **Neuropathology of Parkinson's Disease.** *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 1996, **55**(3):259-272.
20. McCann H, Stevens CH, Cartwright H, Halliday GM:  **$\alpha$ -Synucleinopathy phenotypes.** *Parkinsonism & Related Disorders* 2014, **20**:S62-S67.
21. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M:  **$\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies.** *Nature* 1997, **388**(6645):839-840.
22. Brundin P, Melki R, Kopito R: **Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010, **11**(4):301-307.

23. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B: **Seeding induced by  $\alpha$ -synuclein oligomers provides evidence for spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology.** *Journal of Neurochemistry* 2009, **111**(1):192-203.
24. Jucker M, Walker LC: **Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.** *Nature* 2013, **501**(7465):45-51.
25. Buell AK, Galvagnion C, Gaspar R, Sparr E, Vendruscolo M, Knowles TPJ, Linse S, Dobson CM: **Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in  $\alpha$ -synuclein aggregation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, **111**(21):7671-7676.
26. Knowles TPJ, Vendruscolo M, Dobson CM: **The amyloid state and its association with protein misfolding diseases.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014, **15**(6):384-396.
27. Meng X, Munishkina LA, Fink AL, Uversky VN: **Effects of Various Flavonoids on the  $\alpha$ -Synuclein Fibrillation Process.** *Parkinsons Dis* 2010, **2010**:650794-650794.
28. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T: **Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, **90**(23):11282.
29. Wang C, Shah N, Thakur G, Zhou F, Leblanc RM: **Alpha-synuclein in alpha-helical conformation at air-water interface: implication of conformation and**

- orientation changes during its accumulation/aggregation.** *Chem Commun (Camb)* 2010, **46**(36):6702-6704.
30. Jo E, McLaurin J, Yip CM, St George-Hyslop P, Fraser PE: **Alpha-synuclein membrane interactions and lipid specificity.** *Journal of Biological Chemistry* 2000.
31. McLean PJ, Kawamata H, Ribich S, Hyman BT: **Membrane Association and Protein Conformation of  $\alpha$ -Synuclein in Intact Neurons: EFFECT OF PARKINSON'S DISEASE-LINKED MUTATIONS.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(12):8812-8816.
32. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM: **Stabilization of  $\alpha$ -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes.** *Journal of Biological Chemistry* 1998, **273**(16):9443-9449.
33. Burré J: **The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein.** *J Parkinsons Dis* 2015, **5**(4):699-713.
34. Guerrero-Ferreira R, Taylor NMI, Mona D, Ringler P, Lauer ME, Riek R, Britschgi M, Stahlberg H: **Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils.** *eLife* 2018, **7**:e36402.
35. Bertoncini CW, Jung Y-S, Fernandez CO, Hoyer W, Griesinger C, Jovin TM, Zweckstetter M: **Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(5):1430-1435.

36. Iljina M, Garcia GA, Horrocks MH, Tosatto L, Choi ML, Ganzinger KA, Abramov AY, Gandhi S, Wood NW, Cremades N *et al*: **Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016, **113**(9):E1206.
37. Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA: **Kinetics of sickle hemoglobin polymerization: I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques.** *Journal of Molecular Biology* 1985, **183**(4):591-610.
38. Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA: **Kinetics of sickle hemoglobin polymerization: II. A double nucleation mechanism.** *Journal of Molecular Biology* 1985, **183**(4):611-631.
39. Ferrone F: **[17] Analysis of protein aggregation kinetics.** In: *Methods in Enzymology*. vol. 309: Academic Press; 1999: 256-274.
40. Arosio P, Knowles TPJ, Linse S: **On the lag phase in amyloid fibril formation.** *Physical Chemistry Chemical Physics* 2015, **17**(12):7606-7618.
41. 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):404-410.
42. Morris AM, Watzky MA, Finke RG: **Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2009, **1794**(3):375-397.
43. Biancalana M, Koide S: **Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2010, **1804**(7):1405-1412.

44. Pujols J, Peña-Díaz S, Conde-Giménez M, Pinheiro F, Navarro S, Sancho J, Ventura S: **High-Throughput Screening Methodology to Identify Alpha-Synuclein Aggregation Inhibitors.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**(3):478.
45. Hu R, Diao J, Li J, Tang Z, Li X, Leitz J, Long J, Liu J, Yu D, Zhao Q: **Intrinsic and membrane-facilitated  $\alpha$ -synuclein oligomerization revealed by label-free detection through solid-state nanopores.** *Scientific reports* 2016, **6**:20776-20776.
46. Cova I, Priori A: **Diagnostic biomarkers for Parkinson's disease at a glance: where are we?** *J Neural Transm (Vienna)* 2018, **125**(10):1417-1432.
47. Zhu M, Han S, Fink AL: **Oxidized quercetin inhibits  $\alpha$ -synuclein fibrillization.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2013, **1830**(4):2872-2881.
48. Pujols J, Peña-Díaz S, Lázaro DF, Peccati F, Pinheiro F, González D, Carija A, Navarro S, Conde-Giménez M, García J *et al*: **Small molecule inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation, disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2018, **115**(41):10481-10486.
49. López LC, Dos-Reis S, Espargaró A, Carrodegua JA, Maddelein M-L, Ventura S, Sancho J: **Discovery of Novel Inhibitors of Amyloid  $\beta$ -Peptide 1–42 Aggregation.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2012, **55**(22):9521-9530.
50. López LC, Varea O, Navarro S, Carrodegua JA, Sanchez de Groot N, Ventura S, Sancho J: **Benzbromarone, Quercetin, and Folic Acid Inhibit Amylin Aggregation.** *Int J Mol Sci* 2016, **17**(6):964.

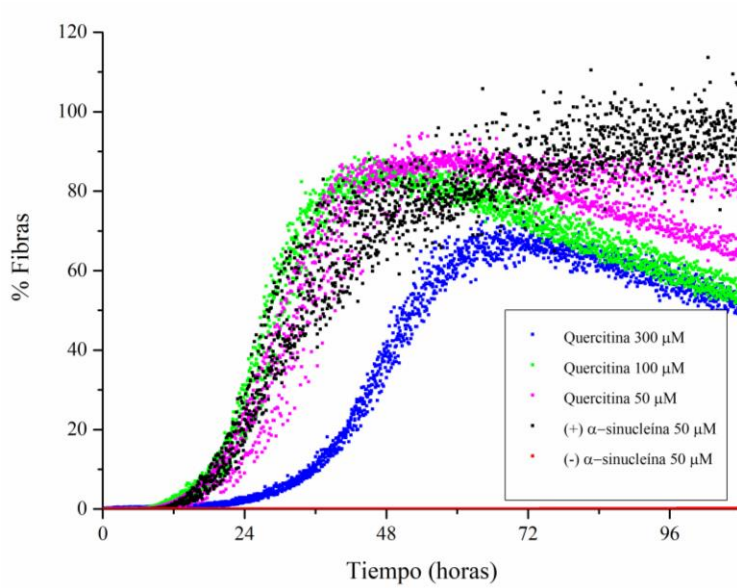
51. Moore KS, Wehrli S, Roder H, Rogers M, Forrest JN, Jr., McCrimmon D, Zasloff M: **Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(4):1354-1358.
52. Zasloff M, Adams AP, Beckerman B, Campbell A, Han Z, Luijten E, Meza I, Julander J, Mishra A, Qu W *et al*: **Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(38):15978-15983.
53. Perni M, Galvagnion C, Maltsev A, Meisl G, Müller MBD, Challa PK, Kirkegaard JB, Flagmeier P, Cohen SIA, Cascella R *et al*: **A natural product inhibits the initiation of  $\alpha$ -synuclein aggregation and suppresses its toxicity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017, **114**(6):E1009-E1017.
54. Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V: **Dependence of  $\alpha$ -Synuclein Aggregate Morphology on Solution Conditions.** *Journal of Molecular Biology* 2002, **322**(2):383-393.
55. Fauvet B, Mbefo MK, Fares M-B, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N *et al*:  **$\alpha$ -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer.** *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**(19):15345-15364.

56. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E: **The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target.** *Nat Rev Neurosci* 2013, **14**(1):38-48.
57. Eliezer D, Kutluay E, Bussell R, Browne G: **Conformational properties of  $\alpha$ -synuclein in its free and lipid-associated states**<sup>11</sup>Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology* 2001, **307**(4):1061-1073.
58. Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT: **NACP, A Protein Implicated in Alzheimer's Disease and Learning, Is Natively Unfolded.** *Biochemistry* 1996, **35**(43):13709-13715.
59. Hiramatsu H, Kitagawa T: **FT-IR approaches on amyloid fibril structure.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2005, **1753**(1):100-107.
60. Sarroukh R, Goormaghtigh E, Ruyschaert J-M, Raussens V: **ATR-FTIR: A “rejuvenated” tool to investigate amyloid proteins.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2013, **1828**(10):2328-2338.
61. Lendel C, Bertoncini CW, Cremades N, Waudby CA, Vendruscolo M, Dobson CM, Schenk D, Christodoulou J, Toth G: **On the Mechanism of Nonspecific Inhibitors of Protein Aggregation: Dissecting the Interactions of  $\alpha$ -Synuclein with Congo Red and Lacmoid.** *Biochemistry* 2009, **48**(35):8322-8334.
62. Gaspar R, Meisl G, Buell AK, Young L, Kaminski CF, Knowles TPJ, Sparr E, Linse S: **Secondary nucleation of monomers on fibril surface dominates  $\alpha$ -synuclein aggregation and provides autocatalytic amyloid amplification.** *Quarterly Reviews of Biophysics* 2017, **50**:e6.

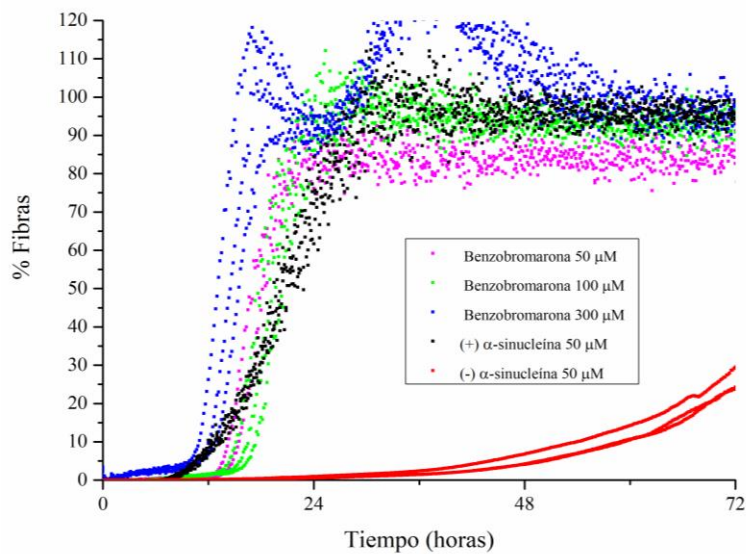
63. Campioni S, Carret G, Jordens S, Nicoud L, Mezzenga R, Riek R: **The Presence of an Air–Water Interface Affects Formation and Elongation of  $\alpha$ -Synuclein Fibrils**. *Journal of the American Chemical Society* 2014, **136**(7):2866-2875.
64. Barth A: **Infrared spectroscopy of proteins**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2007, **1767**(9):1073-1101.
65. Jiang M, Porat-Shliom Y, Pei Z, Cheng Y, Xiang L, Sommers K, Li Q, Gillardon F, Hengerer B, Berlinicke C *et al*: **Baicalein reduces E46K alpha-synuclein aggregation in vitro and protects cells against E46K alpha-synuclein toxicity in cell models of familiar Parkinsonism**. *Journal of neurochemistry* 2010, **114**(2):419-429.



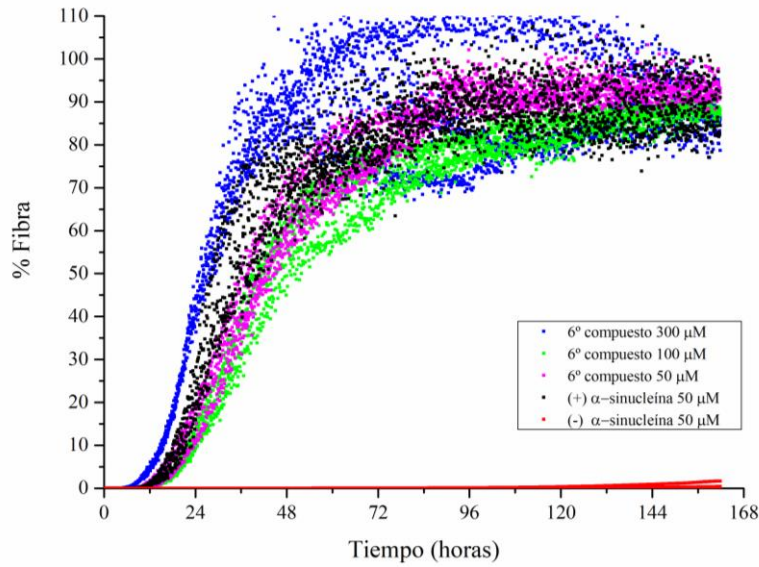
## ANEXOS



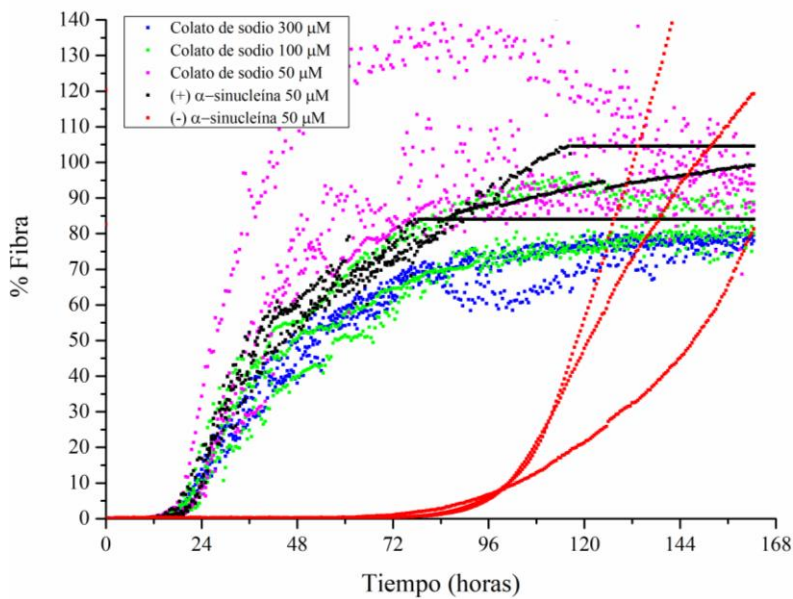
**Figura A1.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu$ M en presencia de **quercetina** a 300, 100 y 50  $\mu$ M en microplaca con recubrimiento de PEG durante 96 horas.



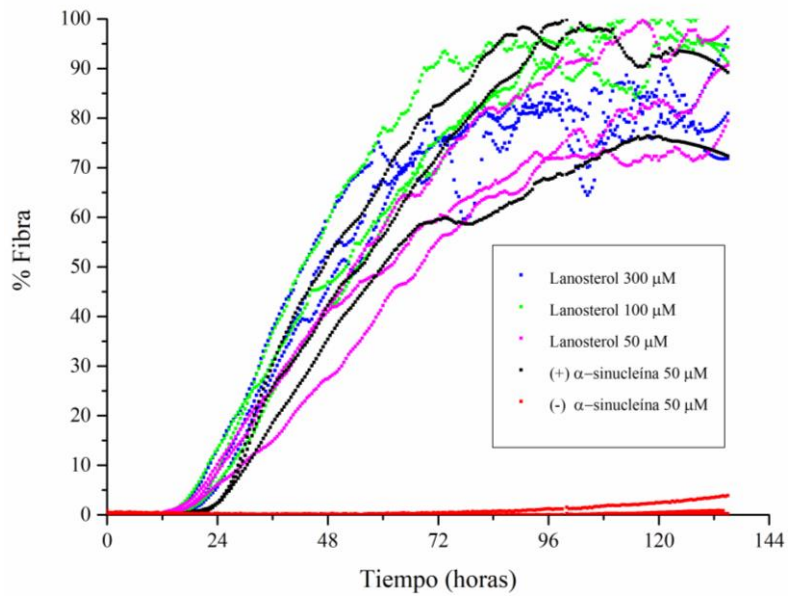
**Figura A2.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu$ M en presencia de **benzobromarona** a 300, 100 y 50  $\mu$ M en microplaca con recubrimiento de PEG durante 72 horas.



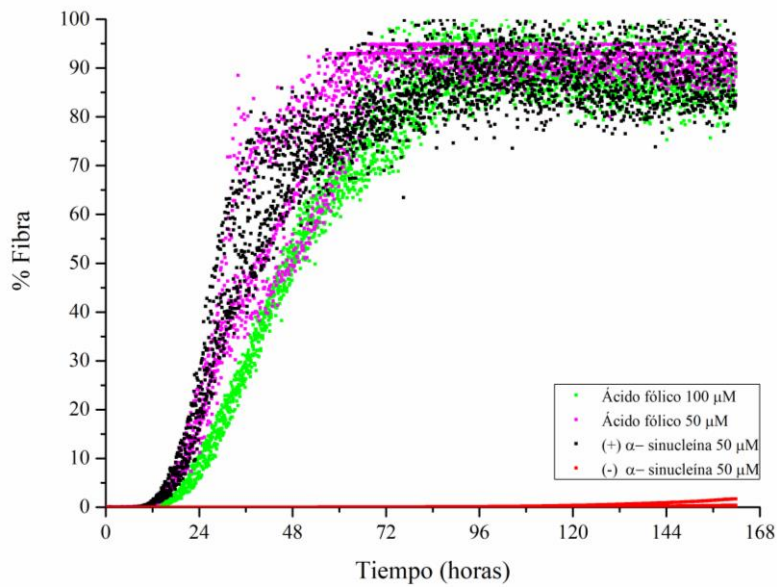
**Figura A3.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  en presencia de 6° compuesto a 300, 100 y 50  $\mu\text{M}$  en microplaca con recubrimiento de PEG. Se representa el porcentaje final de fibra durante 160 horas.



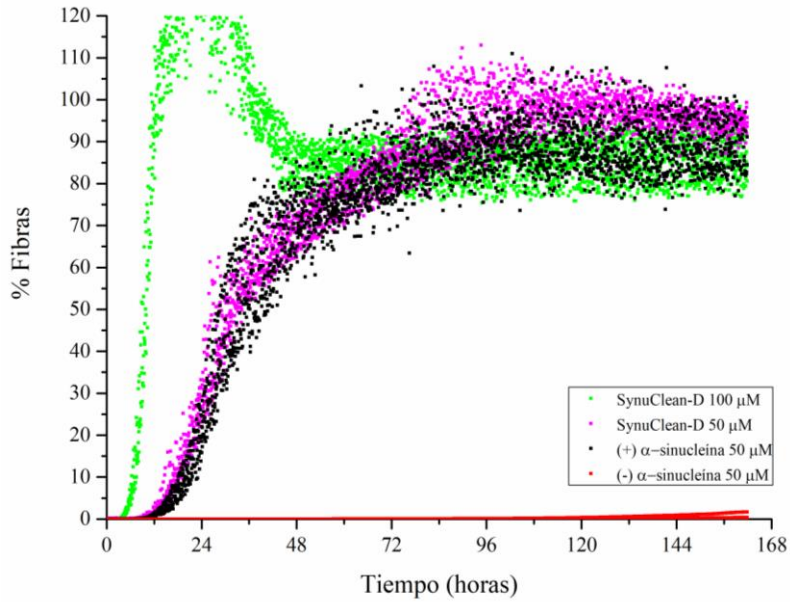
**Figura A4.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  en presencia de colato de sodio a 300, 100 y 50  $\mu\text{M}$  en microplaca con recubrimiento de PEG. Se representa el porcentaje final de fibra durante 160 horas.



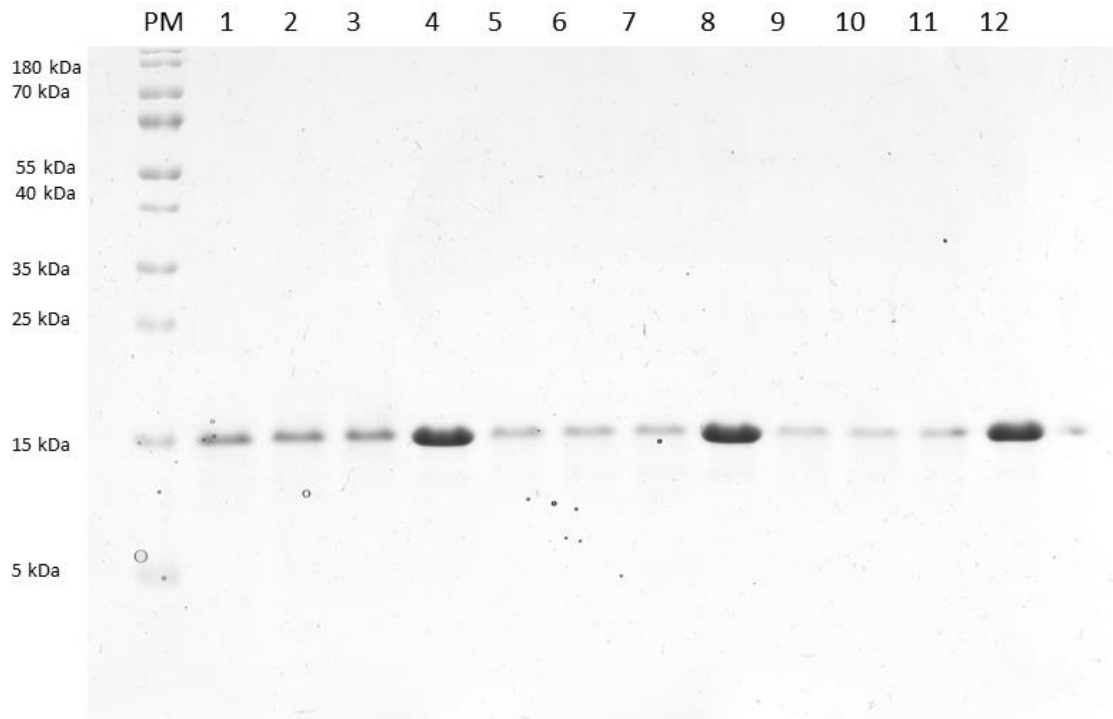
**Figura A5.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  en presencia de **lanosterol** a 300, 100 y 50  $\mu\text{M}$  en microplaca con recubrimiento de PEG. Se representa el porcentaje final de fibra durante 135 horas.



**Figura A6.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  en presencia de **ácido fólico** a 100 y 50  $\mu\text{M}$  en microplaca con recubrimiento de PEG. Se representa el porcentaje final de fibra durante 160 horas.



**Figura A7.** Triplicados de la curva sigmoidea de la cinética de la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  en presencia de SynuClean-D a 100 y 50  $\mu\text{M}$  en microplaca con recubrimiento de PEG. Se representa el porcentaje final de fibra durante 160 horas.



**Figura A8.** Gel utilizado para calcular el rendimiento en cada condición de agregación.

En la imagen se observan triplicados de  $\alpha$ -sinucleína a 50  $\mu\text{M}$  incubada con quercitina a 300, 100 y 50  $\mu\text{M}$ . Se calcula el porcentaje de monómero restante al final de reacción de agregación, con respecto a un control positivo de proteína en su forma monomérica. Conocido este porcentaje de monómero al final de la

reacción, podemos obtener el rendimiento de fibra obtenido. Este procedimiento se ha seguido para calcular los rendimientos de todas las cinéticas de agregación llevadas a cabo en este trabajo. Electroforesis SDS-PAGE 15% acrilamida. Calles 1-3:  $\alpha$ -sinucleína 50  $\mu$ M incubada con quercitina 300  $\mu$ M; calles 5-7:  $\alpha$ -sinucleína 50  $\mu$ M incubada con quercitina 100  $\mu$ M; calles 9-11:  $\alpha$ -sinucleína 50  $\mu$ M incubada con quercitina 50  $\mu$ M; calles 4, 8 y 12:  $\alpha$ -sinucleína 50  $\mu$ M (control +). PM: marcador de peso molecular.

